



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

**BESTIMMUNG DER „ORGANIC ANION TRANSPORTING POLYPEPTIDES“ IN  
OVARIALKARZINOMEN MITTELS IMMUNFLUORESCENZ-MIKROSKOPIE UND  
IMMUNHISTOCHEMIE**

angestrebter akademischer Grad

**Magistra der Pharmazie (Mag. pharm.)**

Verfasser/in: Cihangül Sanlioglu  
Matrikelnummer: 0401562  
Studienrichtung: Pharmazie (A449)  
Begutachter: Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Walter Jäger

Wien, im Januar 2011



## **Danksagung**

Die vorliegende Diplomarbeit entstand im Zeitraum März 2010 bis Juli 2010 in den Forschungslabors am Institut für Pathophysiologie, Zentrum für Physiologie, Pathophysiologie und Immunologie der Medizinischen Universität Wien am AKH Wien in Zusammenarbeit mit dem Department für Klinische Pharmazie und Diagnostik im Pharmazie-Zentrum der Universität Wien.

Ich möchte mich bei Herrn Ao. Univ. Prof. Dr. Walter Jäger (Department für Klinische Pharmazie und Diagnostik der Universität Wien) und Frau Ao. Univ. Prof. Dr. Theresia Thalhammer für die Vergabe des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die freundliche Unterstützung in wissenschaftlichen Fragestellungen herzlich bedanken. Ihnen habe ich es zu verdanken, dass die Durchführung meiner praktischen Arbeit am AKH möglich war.

Ein großer Dank gilt den Mitgliedern der Arbeitsgruppe am AKH, speziell Frau Mag. Juliane Riha für ihre kompetente Hilfe bei der Durchführung der praktischen Arbeiten zu dieser Diplomarbeit sowie meinen Arbeitskolleginnen Terezia und Ayse für das stets freundliche und kollegiale Arbeitsklima.

Meinen Eltern danke ich nicht nur für ihre große Geduld und ihre finanzielle Unterstützung bis zum Ende meiner Studienzeit, sondern auch dafür, dass sie meine Launen während des gesamten Studiums ertragen haben. Daher möchte ich an dieser Stelle diese Diplomarbeit meiner Mutter Kadriye und meinem Vater Recep widmen.

Schließlich gilt ein besonderer Dank meinen beiden Brüdern Ümit und Faruk, sowie all meinen Freunden und Verwandten. Diese Gelegenheit möchte ich auch nutzen, um mich vom ganzen Herzen bei meinen Freundinnen Ifa, Emine, Judith, Sharon, Saadet, Yasemin A., Hatice und Yasemin D. für ihre moralische Unterstützung zu bedanken.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>PROBLEMSTELLUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
2.1	<i>Anatomie und Funktion der Ovarien</i>	3
2.2	<i>Ovarialkarzinom</i>	3
2.2.1	Epidemiologie und Ätiologie	3
2.2.2	Histologie	5
2.2.2.1	Epitheliale Tumoren	7
2.2.2.2	Keimzelltumoren	8
2.2.2.3	Keimstrang-Stroma-Tumoren	9
2.2.2.4	Metastasen	10
2.2.3	Diagnostik	10
2.2.4	Therapie:	14
2.2.4.1	Operative Therapie:	14
2.2.4.2	Chemotherapie:	14
2.2.4.3	Strahlentherapie:	18
2.2.4.4	“Multidrug-Resistance“ - Chemotherapieresistenz:	18
2.2.5	Organic anion transporting polypeptides (OATPs):	20
2.3	<i>Pharmakogenetik: Einfluss auf Arzneimittelwirkungen:</i>	24
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN:</b>	<b>29</b>
3.1	<i>Immunfluoreszenz</i>	29
3.1.1	Prinzip	29
3.1.2	Vorbereitung	30
3.1.3	Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung an formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeschnitten	32
3.1.3.1	Untersuchungsmaterial	32
3.1.3.2	Färbeablauf	32
3.2	<i>Fluoreszenzmikroskopie</i>	36
3.2.1	Prinzip	36
3.2.2	Durchführung der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen	37
3.3	<i>Immunhistochemie</i>	38

3.3.1	Prinzip .....	38
3.3.2	Vorbereitung .....	38
3.3.3	Durchführung der Immunhistochemiefärbung an formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeschnitten.....	38
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>40</b>
4.1	<i>Nachweis der OATPs mittels Immunfluoreszenz.....</i>	40
4.1.1	Nachweis von OATP 1B1/1B3 in Ovarialkarzinomschnitten .....	42
4.1.2	Nachweis von OATP 2A1 in Ovarialkarzinomschnitten .....	45
4.1.3	Nachweis von OATP 2B1 in Ovarialkarzinomschnitten .....	49
4.1.4	Nachweis von OATP 3A1 in Ovarialkarzinomschnitten .....	50
4.1.5	Nachweis von OATP 4A1 in Ovarialkarzinomschnitten .....	52
4.1.6	Nachweis von OATP 5A1 in Ovarialkarzinomschnitten .....	53
4.1.7	Nachweis von OATP 6A1 in Ovarialkarzinomschnitten .....	56
4.2	<i>Nachweis von bestimmten Bio- und Tumormarkern mittels Immunfluoreszenz .....</i>	57
4.2.1	Nachweis von Alpha-Tubulin in Ovarialkarzinomschnitten.....	57
4.2.2	Nachweis von Vimentin in Ovarialkarzinomschnitten .....	58
4.3	<i>Nachweis der OATPs mittels Immunhistochemie.....</i>	59
4.3.1	Nachweis von OATP 1B1/1B3 mittels Immunhistochemie.....	59
4.3.2	Nachweis von OATP 2B1 mittels Immunhistochemie.....	61
4.3.3	Nachweis von OATP 4A1 mittels Immunhistochemie.....	62
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>69</b>
<b>8</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>70</b>
<b>9</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>70</b>
<b>10</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>71</b>
<b>11</b>	<b>CURRICULUM VITAE.....</b>	<b>77</b>

# 1 PROBLEMSTELLUNG

Krebs zählt in Österreich zu der zweithäufigsten Todesursache nach Herzkreislauf-Erkrankungen. Nach Angaben der Statistik Austria erkrankten jährlich in etwa 35.000 Österreicher daran. Trotz der vielen Fortschritte in Bezug auf Krebs ist eine kurative Behandlung der meisten Karzinome vor allem im fortgeschrittenen Stadium sowohl auf diagnostischem als auch auf therapeutischem Gebiet noch immer nicht möglich. Das Ovarialkarzinom stellt ein besonderes Problem dar. Ursache dafür ist zum einen ein Mangel an Screeningmaßnahmen – der Tumor wird in vielen Fällen erst spät erkannt - und zum anderen das Auftreten schwerwiegender und dosislimitierender Nebenwirkungen, die die Chemotherapie einschränken. Außerdem weist das Ovarialkarzinom ein progredientes, aggressives Tumorwachstum auf, wobei es schnell zu Therapieresistenzen, auch bekannt unter dem Namen Multi Drug Resistance (MDR) kommt. Viele Tumoren sprechen zunächst gut auf die Zytostatika-Therapie an, verlieren jedoch nach mehreren Zyklen ihre Sensibilität gegenüber der zuvor erfolgreichen Chemotherapie. Wie der Name auch befürchten lässt, richtet sich eine Vielfachresistenz von Tumorzellen nicht nur gegen das eingesetzte Zytostatikum, sondern auch gegen eine Vielzahl anderer Chemotherapeutika mit unterschiedlicher Struktur und Funktion. Diese Kreuzresistenz zwischen ganz verschiedenen Zytostatikagruppen ist ein häufig vorkommendes Phänomen; dadurch ist der Erfolg einer Therapie gegenüber den Chemotherapeutika limitiert. In vielen Fällen ist eine zu geringe Konzentration des Zytostatikums in der Zelle, ein Grund für die Chemoresistenz. Unterschiedliche Mechanismen werden dafür verantwortlich gemacht: Einerseits kann die Anzahl von Membranproteinen, die dafür sorgen, dass der Wirkstoff wieder aus der Zelle hinausgeschleust wird, erhöht werden, das heißt es kommt zu einer Überexpression solcher Transportproteine, oder es können weniger Membranproteine angefertigt werden, die die Substanz ins Zellinnere transportieren. Andererseits kann die Expression von Enzymen gesteigert oder vermindert werden, die dann zur Inaktivierung des Medikaments führen.

Zu den membranständigen Proteinpumpen, die für die Aufnahme von Pharmaka verantwortlich sind, gehören die Transportproteine für organische Anionen (OATPs,

„Organic Anion Transporting Polypeptides“). Sie transportieren eine große Anzahl von Substraten, einschließlich organischer Anionen und zahlreicher Arzneimittel in das Zellinnere und können daher in der Krebstherapie von Bedeutung sein. Bisher wurden die OATPs vor allem in der Leber untersucht. Sie könnten aber auch in soliden Tumoren wie dem Ovarialkarzinom wichtig sein. Diese Aufnahmetransporter könnten möglicherweise für neue Therapieansätze eine wichtige Rolle spielen. Dies könnte mithelfen, die Prognose des Ovarialkarzinoms zu verbessern.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher die zelluläre Lokalisation der verschiedenen OATPs im Tumorgewebe mittels der Immunfluoreszenz-Mikroskopie und der Immunohistochemie und ihre Zuordnung zu verschiedenen Zelltypen durch Markerproteine bestimmt werden.

## **2 EINLEITUNG**

### **2.1 Anatomie und Funktion der Ovarien**

Die Ovarien der geschlechtsreifen Frau sind mandelförmige, paarig angeordnete Drüsen, die seitlich an der Beckenwand liegen und über verschiedene Bandstrukturen mit der Beckenwand und der Gebärmutter verbunden sind. Während der Geschlechtsreife werden hier die Eizellen ausgebildet, die dann monatlich ausgestoßen werden (Ovulation). Neben der Heranreifung und Bereitstellung der Eizellen werden in den Eierstöcken die weiblichen Sexualhormone (Östrogene und Gestagene) produziert und anschließend in die Blutbahn sezerniert.<sup>1,2</sup> Die Eierstöcke werden von einer schwach ausgebildeten Bindegewebskapsel (Tunica albuginea) eingehüllt, die fest mit dem Peritonealepithel, einem einschichtig kubischen Epithel, verwachsen ist und kontinuierlich in das Stroma des Ovars übergeht. Das bindegewebige Stroma wird unterteilt in eine Rinden- (Cortex ovarii) und eine Markzone (Medulla ovarii). Sie besteht im Cortex ovarii aus charakteristischem zellreichem, sog. spinozellulärem Bindegewebe und im Medulla ovarii aus lockerem, faserigem Bindegewebe. Die zentrale Markzone ist reich an Nerven, Lymphgefäßen und Blutgefäßen, die am Hilus ein- beziehungsweise austreten.<sup>1,3,4</sup> In der Rindensubstanz befinden sich die verschiedenen Reifestadien der Ovarialfollikel sowie die aus den Tertiärfollikeln hervorgegangenen Gelbkörper (Corpora lutea).<sup>1,2,5</sup> Wenn bei einer geschlechtsreifen Frau keine Befruchtung stattfindet, wird das Corpus luteum nach etwa 10-12 Tagen abgebaut und durch ein Narbengewebe (Corpus albicans), das aus kollagenfaserreichem, zellarmem Bindegewebe besteht, ersetzt.<sup>1,2,3</sup>

### **2.2 Ovarialkarzinom**

#### **2.2.1 Epidemiologie und Ätiologie**

Die Häufigkeit des Ovarialkarzinoms steht mit jährlich rund 800 Neuerkrankungen in Österreich an fünfter Stelle der Häufigkeit bösartiger Tumoren bei der Frau (nach Mamma-, Korpus-, Zervix- und Magen-Darm-Karzinom). In den vergangenen 20 Jahren ist die Anzahl der Neuerkrankten um circa 20 % zurückgegangen.<sup>6,7</sup> Die größte Inzidenz

finden wir bei Frauen in der 6. und 7. Dekade.<sup>8,9</sup> Mit zunehmendem Lebensalter steigt die Häufigkeit maligner Tumoren an.<sup>10</sup> Auffallend ist die hohe Inzidenzrate in den westlichen Industrieländern, während in Japan und anderen asiatischen Ländern die niedrigsten Inzidenzraten registriert werden.<sup>9,11,12</sup> Prognostisch ist das Ovarialkarzinom das ungünstigste Genitalkarzinom, das die Haupttodesursache unter den gynäkologischen Tumoren darstellt, weil es aufgrund seines symptomlosen beziehungsweise symptomarmen Verlaufs erst im fortgeschrittenen Stadium (III und IV) diagnostiziert wird.<sup>8,13</sup> Eine Früherkennung ist meist nicht möglich. Es gibt bisher keine effektive Screeningmaßnahme zur rechtzeitigen Erkennung des Ovarialkarzinoms. Spätsymptome wie Stuhlunregelmäßigkeiten, Durchfälle, Obstipation, Meteorismus, Zunahme des Bauchumfangs sowie Kachexie sind im Wesentlichen durch Aszites und Darmbefall bedingt. Mit Ausnahme des vererbaren Ovarialtumors und des fortgeschrittenen Alters der Frau konnten bisher keine eindeutigen Risikofaktoren für die Erkrankung gefunden werden. Allerdings scheinen die Einnahme von Ovulationshemmern sowie Anovulation einen protektiven Effekt zu haben.<sup>4,8,13,14</sup> Solche Umstände, die mit einer Verhinderung des Eisprungs einhergehen, sind Schwangerschaften und Geburten, Stillzeiten, späte Menarche und frühere Menopause sowie der Einsatz von Kontrazeptiva. Möglicherweise ist auch die Abnahme der Inzidenz des Ovarialkarzinoms in den Industriestaaten eine Folge des gehäuften Einsatzes hormoneller Kontrazeptiva. Epidemiologischen Analysen zufolge erkranken Frauen mit weniger Kindern beziehungsweise weniger Schwangerschaften häufiger an einem Ovarialkarzinom.<sup>7,10,11</sup> Es besteht also ein Zusammenhang zwischen der Zahl der Ovulationszyklen und der Entstehung eines Ovarialtumors. Man nimmt an, dass es nach jeder Ovulation zur Verlagerung von Oberflächenepithel in das Ovarinnere kommt. Die Epithelzellen sind dann einer für sie unüblichen Umgebung von Wachstumsfaktoren ausgesetzt, in der sie demzufolge maligne entarten können.<sup>11,12,13,14</sup> Des Weiteren steigt das Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken mit der Zahl der erkrankten Familienangehörigen. Bei unbelasteter Anamnese liegt das persönliche Erkrankungsrisiko bei etwa 1 %, während es bei Personen mit zwei oder mehr Verwandten 1. Grades, die an einem Eierstockkrebs erkrankten, auf 40 % ansteigt.<sup>4,9</sup>

Bisher sind folgende familiäre Formen bekannt:

-) das **Mamma-Ovarialkarzinomsyndrom**, das zurückzuführen ist auf eine Mutation der Gene BRCA1/2 und

-) **das Lynch-II-Syndrom**, eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung mit Entwicklung eines kolorektalen Tumors.<sup>4,7,9,10,13,14</sup>

Etwa 95 % der Ovarialtumoren treten jedoch sporadisch auf, während 5 % aufgrund einer erblichen Vorbelastung entstehen. Weitere mögliche Risikofaktoren sind ein erhöhtes Lebensalter (>40 Jahre), kaukasische Rasse, Infertilität, hohes Alter bei der Erstgeburt, gleichzeitiges Vorliegen eines Mammakarzinoms und Rauchen.<sup>4,9,10</sup> Laut Angaben einer Studie des Nationalen Krebsinstitutes macht Übergewicht Frauen anfälliger für Eierstockkrebs, wobei hormonelle Faktoren hier eine große Rolle spielen.<sup>15</sup> Stress fördert ebenso den Eierstockkrebs und erleichtert die Bildung von Metastasen. Demnach sollen Stresshormone wie Adrenalin das Absterben von Krebszellen hemmen, die sich aus dem Tumorverband lösen und in die Körperperipherie ausgeschwemmt werden.<sup>16</sup>

## 2.2.2 Histologie

Die Ovarien enthalten 3 verschiedene Zelltypen: die epithelialen Zellen, Stromazellen und Keimzellen, die maligne entarten können. Je nachdem lassen sich die Ovarialtumoren anhand ihres unterschiedlichen histologischen Ursprungs in 3 Hauptgruppen unterteilen:

- **Epitheliale Tumoren**
- **Keimstrangstroma**
- **Keimzelltumoren**

Etwa 90 % aller bösartigen Ovarialkarzinome entstehen aus dem Epithel, das die Oberfläche des Ovars bildet, während die restlichen 10 % auf Keimstrangstromatumoren (6%) und Keimzelltumoren (4%) anfallen.<sup>11,13</sup> Darüber hinaus erfolgt eine Einteilung der echten Neoplasien in benigne und maligne sowie in Tumoren mit niedrigem malignem Potential (LMP) oder Borderline-Tumoren.<sup>4,8,18</sup>

Weltweit hat sich die von der WHO festgelegte Einteilung nach der Histogenese durchgesetzt. Es werden insgesamt 9 Gruppen mit jeweils verschiedenen Untergruppen unterschieden:<sup>17</sup>

**1) Epitheliale Tumoren (vom Oberflächenepithel ausgehend):**

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

**2) Keimzelltumoren (ausgehend von der Eizelle)**

- Dysgerminom
- Dottersacktumor
- Teratom
- Chorionkarzinom
- Embryonales Karzinom
- Polyembryom

**3) Keimstrang-Stroma-Tumoren (meist hormonproduzierend)**

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

**4) Lipidzelltumoren**

**5) Gonadoblastome**

**6) Bindegewebige Tumoren**

**7) Unklassifizierte Tumoren**

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

**9) Tumorähnliche Prozesse (Follikelzysten)**

### **2.2.2.1 Epitheliale Tumoren**

Die gutartigen epithelialen Tumoren werden als Zystadenome (Kystome), die bösartigen als Ovarialkarzinome bezeichnet, während die Borderline-Tumoren eine Sonderform des Ovars darstellen. In der Entstehung epithelialer Tumoren spielen Verletzungen des Oberflächenepithels während des Eisprungs mit Bildung von Zysten und Proliferationsvorgänge eine wichtige Rolle.<sup>14,17</sup>

#### ***Seröse Ovarialtumoren***

Sie sind die häufigsten Ovarialkarzinome gefolgt von muzinösen, endometroiden Karzinomen und Klarzellkarzinomen. Diese Tumoren treten meist beidseitig auf. Gekennzeichnet sind sie durch zystische Hohlräume, die papilläre Tumorformationen an der Innenseite erkennen lassen und eine gelbliche Flüssigkeit enthalten. 60 % der serösen Ovarialtumoren sind benigne (seröses Zystadenom), 10-15 % sind seröse Karzinome geringen Malignitätsgrades (seröse Borderline-Tumoren) und 20-30 % invasive (bösartige) Karzinome.<sup>4,17</sup>

#### ***Muzinöse Ovarialtumoren***

Die muzinösen Ovarialtumoren weisen ein charakteristisches, schleimbildendes Epithel und ähnlich den serösen Karzinomen zystische und solide Anteile auf. Muzinöse Tumoren treten meist unilateral auf und sind in circa 70 % benigne (muzinöses Zystadenom), in 20 % Borderline-Tumoren und in 10 % maligne Tumoren.<sup>4,17</sup>

#### ***Endometroide Tumoren***

Die endometroide Tumordifferenzierung ist dem Adenokarzinom des Endometriums mit seinen unterschiedlichen Differenzierungsgraden ähnlich. Endometroide Tumoren sind sehr selten gutartig; sie zählen neben den klarzelligigen Tumoren zu den aggressiven Tumoren mit schlechter Prognose. Etwa 15 % aller Ovarialkarzinome sind endometroide Karzinome. Zu den endometroiden Tumoren zählen auch die malignen mesodermalen (Müller`schen) Mischtumoren, die charakterisiert sind durch eine synchrone Entartung der epithelialen und mesenchymalen Komponenten.<sup>4,11,17</sup>

### ***Klarzellige Ovarialkarzinome***

Klarzellige Ovarialkarzinome weisen von allen bösartigen Ovarialtumoren die weitgehend schlechteste Prognose auf. Sie weisen ein drüsig-papilläres und solides Wachstumsmuster auf.<sup>17</sup>

### ***Brenner Tumoren***

Brenner Tumoren sind meist gutartig und auf das Ovar begrenzt. Histologisch werden faserreiche Stromagebilde mit rundlichen Epithelzellnestern nachgewiesen.<sup>4,17</sup>

## **2.2.2.2 Keimzelltumoren**

Keimzelltumoren sind die zweithäufigste Gruppe nach den epithelialen Ovarialtumoren und meist gutartige, zystische Teratome. Etwa 5 % aller Ovarialkarzinome sind maligne Keimzelltumoren. Ihr Altersgipfel liegt im Kindes- und Jugendalter. Sie gehen wie der Name es schon sagt von den Keimzellen aus. Am häufigsten anzutreffen sind das Dysgerminom, das Teratom und der Dottersacktumor. Keimzelltumoren sprechen sehr gut auf eine cisplatinhältige, hochdosierte Chemotherapie an.

### ***Dysgerminom***

Das Dysgerminom ist der am meisten vorkommende bösartige Keimzelltumor, der auch häufig während einer Schwangerschaft auftreten kann. Etwa 80 % der Dysgerminome sind auf ein Ovar begrenzt. Meist sind der LDH- und HCG-Spiegel erhöht. Diese Serumparameter können daher in einigen Fällen als brauchbarer diagnostischer Marker verwendet werden. Histologisch betrachtet, handelt es sich bei dieser Form des Ovarialtumors um Tumorzellen mit klarem Zytoplasma. Das Dysgerminom weist ein spärliches Bindegewebe, das von Lymphozytenansammlungen durchsetzt ist.

### ***Dottersacktumor (endodermaler Sinustumor)***

Bei diesem Tumor handelt es sich um ein graugelbes, oft hämorrhagisches und zystisch-nekrotisches Gewebe. Der Dottersacktumor tritt im Durchschnittsalter von 20

Jahren auf. Das  $\alpha$ -Fetoprotein (AFP) ist hier häufig erhöht und kann daher als Tumormarker verwendet werden.

### ***Unreife zystische Teratome***

Sie entstehen aus den Keimzellen nach der ersten Meiose. Teratome, die Zysten aufweisen, werden als Dermoidzysten bezeichnet. Sie enthalten in ihren Zysten Haare, Talgdrüsen mit Talg und Zähne sowie andere Gewebstypen. Als diagnostischer Parameter kann das  $\alpha$ -Fetoprotein herangezogen werden.

### ***Chorionkarzinom und Embryonales Karzinom***

Diese Untergruppen sind sehr seltene Malignome, die häufig in gemischten Zelltumoren anzutreffen sind. Oft sind der  $\alpha$ -Fetoprotein- und HCG-Spiegel erhöht und als Tumormarker verwertbar.<sup>4,9,17,18,19</sup>

### **2.2.2.3 Keimstrang-Stroma-Tumoren**

Diese Tumoren entstehen aus den Keimsträngen und aus dem Mesenchym der embryonalen Gonaden. Viele Keimstrang-Stroma-Tumoren bilden Steroidhormone und können einen Hyperöstrogenismus beziehungsweise einen Hyperandrogenismus mit Virilisierungserscheinungen hervorrufen. Granulosazelltumoren und Thekome sind östrogenproduzierende Tumoren, während Sertoli-Leydig-Zell-Tumoren vermehrt Androgene bilden.<sup>14,18</sup>

### ***Granulosazelltumoren***

Granulosazelltumoren sind die häufigsten östrogenproduzierenden Tumoren. Aufgrund der übermäßigen Östrogenproduktion kommt es zu einer glandulär-zystischen Hyperplasie des Endometriums als Begleitphänomen. Der fortbestehende Östrogenstimulus kann letztendlich zur Entstehung eines Endometriumkarzinoms führen. Außerdem sind auch Spätrezidive, die selbst viele Jahre nach primärer operativer Entfernung auftreten können, typisch für diese Erkrankung. Granulosazelltumoren sind meist einseitig und weisen makroskopisch eine graugelbe

Farbe durch Lipoideinlagerungen auf. Laborchemisch sind der Östrogenspiegel erhöht, als spezifischer Marker kann das Inhibin, das von den Granulosazellen gebildet wird, herangezogen werden.<sup>4,9,14,18</sup>

### ***Thekazellumoren***

Diese Tumoren sind ausnahmslos gutartig.<sup>4</sup>

### ***Sertoli-Leydig-Zell-Tumoren***

Hier handelt es sich um seltene Tumoren, die vermehrt Androgene produzieren. Diese übermäßige Androgensekretion kann zu einer Oligo- bis Amenorrhö führen und eine zunehmende Virilisierung mit Bartwuchs und Tieferwerden der Stimme herbeiführen. Im Serum ist der Androgenspiegel (Testosteron, Androstendion) erhöht.<sup>4,18</sup>

#### **2.2.2.4 Metastasen**

Etwa 10 % der malignen Ovarialtumoren sind Metastasen. Primärtumor ist am häufigsten ein Endometriumkarzinom, ein Mammakarzinom oder ein gastrointestinaler Tumor. Metastasen treten meist bilateral auf. Der Krukenberg-Tumor stellt eine besondere Form der Ovarialmetastasen dar. Es handelt sich hierbei um eine Metastase eines gastrointestinalen Karzinoms, die sich über den Peritonealraum manifestiert. Die metastatischen Geschwülste entstehen im Ovarialstroma, das durch einzelne oder kettenartig angeordnete Karzinomzellen mit intrazellulärer Schleimbildung ("Siegelringzellen") durchsetzt ist.

Bei unbekanntem Primärtumor verkürzt sich die Überlebenszeit auf circa 6 Monate, während sie bei bekanntem Ausgangsort der Erkrankung auf etwa 28 Monate steigt.<sup>4,14</sup>

### **2.2.3 Diagnostik**

Neben der Erkennung eines Ovarialkarzinoms ist auch die Unterscheidung zwischen einer Ovarialzyste und einer echten Ovarialneoplasie sowie deren Dignität wichtig für die am besten geeignete Behandlungsmethode der Patientin.

Um den Ovarialtumor genauer zu charakterisieren, wird er in unterschiedliche Stadien unterteilt. Die Klassifizierung erfolgt nach bestimmten Kriterien, wobei hauptsächlich folgende drei Gesichtspunkte maßgebend sind:<sup>4,20</sup>

- **die TumorgroÙe (T)**
- **die Beteiligung der Lymphknoten (N: „Nodus“ für Lymphknotenbefall)**
- **das Vorhandensein von Metastasen (M)**

Anhand der TNM-Klassifikation können Aussagen für die Behandlung und Prognose gemacht werden. Die Ziffern hinter den Buchstaben (T, N und M) geben einen Hinweis auf Größe und Ausdehnung des Ovarialtumors (T 1-3), auf die Anzahl und Lage der befallenen Lymphknoten (N 0-3) und auf das Vorliegen oder Fehlen von Metastasen (M 0-1). Jedoch ist erst nach operativer Entfernung des Tumors eine exakte Beurteilung des TNM-Stadiums möglich.

Neben der TNM-Klassifikation gibt es auch die sogenannte FIGO-Stadieneinteilung. Ähnlich dem TNM-System wird auch hier die örtliche Tumorausbreitung, der Befall von Lymphknoten und benachbarter Organe sowie Metastasen berücksichtigt.<sup>9,11,20</sup>

**Tabelle 1: FIGO-Stadieneinteilung für das Ovarialkarzinom.**<sup>8,9,14,18</sup>

<b>Stadium I:</b>	Tumor beschränkt auf Ovarien
<b>IA</b>	auf ein Ovar begrenzt, Kapsel intakt, kein Aszites
<b>IB</b>	auf beide Ovarien begrenzt, Kapsel intakt, kein Aszites
<b>IC</b>	auf beide Ovarien begrenzt mit Kapselruptur; Tumor an Oberfläche oder maligne Zellen im Aszites oder bei Peritonealspülung
<b>Stadium II:</b>	Tumor befällt ein oder beide Ovarien mit Ausdehnung auf das kleine Becken
<b>IIA</b>	Ausbreitung oder Metastasen auf oder in den Uterus oder die Tuben
<b>IIB</b>	Ausbreitung auf andere Gewebe des Beckens
<b>IIC</b>	Ausbreitung im Becken, zusätzlich maligne Zellen im Aszites oder mit einer positiven Peritonealzytologie nach Peritonealspülung
<b>Stadium III:</b>	Befall eines oder beider Ovarien mit Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens oder regionären Lymphknotenmetastasen
<b>IIIA</b>	Mikroskopische Peritonealmetastasen, inkl. Metastasen auf Leberkapsel, Lymphknoten sind negativ
<b>IIIB</b>	Makroskopische Peritonealmetastasen (<2cm), Metastasen auf Leberkapsel, Lymphknoten sind negativ
<b>IIIC</b>	Makroskopische Peritonealmetastasen (>2cm) und positive regionäre Lymphknoten
<b>Stadium IV:</b>	Fernmetastasen (zB: Leberparenchym, Lunge), maligner Pleuraerguss

Als diagnostische Untersuchungsverfahren dienen die Ultraschalluntersuchung, die Computertomographie, die NMR und die transvaginale Sonographie. Die klinische Untersuchung beginnt mit einer bimanuellen Palpation (mit der einen Hand tastet man von außen die Bauchdecke, mit der anderen Hand tastet man von vaginal), hierbei können größere Tumoren erkannt werden.<sup>4,9,11</sup> Die Transvaginalsonographie dient nicht nur der Erkennung des Tumors, sondern auch zur Dignitätseinschätzung. Zu beachten ist, dass jede neu aufgetretene Ovarialzyste in der Postmenopause verdächtig ist auf ein Ovarialkarzinom und abgeklärt werden muss!<sup>4,8,14</sup>

Als ergänzende Untersuchungen bei Verdacht auf Malignität oder bei zunächst unklaren Befunden zur Abklärung des Abdomens kommen folgende Verfahren in Frage:

- die CT oder MRT in Frage.
- Aszitespunktion
- Suche nach Metastasen: Röntgenthorax, Koloskopie
- Harnweguntersuchung, Brustuntersuchung, Rektoskopie, Blutuntersuchungen zum Beispiel auf Tumormarker.<sup>8</sup> Beim Ovarialtumor ist das sogenannte **CA 125** („Cancer Antigen“) der wichtigste Tumormarker. Das „CA 125“ ist ein Glykoprotein, das besonders von serösen Ovarialtumoren gebildet wird und bei den meisten Patientinnen mit fortgeschrittenem Tumorstadium erhöht ist. Erhöhte Werte finden sich auch bei anderen Tumoren und bei entzündlichen Vorgängen des Peritoneums sowie bei Leberzirrhose und Pankreatitis. Deshalb dient die Bestimmung des Tumormarkers hauptsächlich der Verlaufskontrolle nach einem chirurgischen Eingriff oder einer Chemotherapie, nicht aber der Dignitätsbestimmung von Ovarialkarzinomen. Eine Erhöhung des CA 125 deutet immer auf ein Rezidiv des Ovarialtumors hin.<sup>8,9,14</sup>

**Tumorausbreitung:** Bei der Ausbreitung des Ovarialkarzinoms sind eine intraperitoneale, lymphogene und eine hämatogene Form zu unterscheiden:

- ***Intraperitoneale Ausbreitung:*** Der Tumor breitet sich in der Bauchhöhle aus. Dies erfolgt durch Ablösung der Tumorzellen aus der Ovarialoberfläche, die durch die Zirkulation der Peritonealflüssigkeit im Peritoneum verteilt werden.

- **Lymphogene Ausbreitung:** Der zweite Metastasierungsweg erfolgt über die pelvinen und paraaortalen Lymphknoten.
- **Hämatogene Ausbreitung:** Diese Form kommt eher selten vor.<sup>4,9,11,14</sup>

## 2.2.4 Therapie:

### 2.2.4.1 Operative Therapie:

Die primäre Therapie des Ovarialtumors besteht in der vollständigen Tumorsektion, das heißt alles sichtbare Tumorgewebe in der Bauchhöhle muss entfernt werden. Dementsprechend wird eine Laparatomie (die Bauchhöhle wird geöffnet, um einen abdominal-chirurgischen Eingriff an den inneren Organen durchzuführen) zur vollständigen Entfernung des gesamten Tumorgewebes vorgenommen. Besteht jedoch noch Kinderwunsch, können im Stadium FIGO Ia das kontralaterale Ovar und die Gebärmutter belassen werden. Bei diesem Vorgehen ist aber die Rezidivrate deutlich erhöht, daher müssen Patientinnen darauf hingewiesen werden. Der Eingriff kann dann nach abgeschlossener Familienplanung komplettiert werden. Die Standardoperation ist die Entfernung von Uterus und Ovarien, von Lymphknoten im Becken und entlang der Bauchschlagader, von befallenem Bauchfell sowie der Entfernung des großen Netzes durch einen offenen Bauchschnitt. Beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom erfolgt nach einer kompletten Tumorentfernung eine anschließende Kombinationschemotherapie.<sup>4,13,14,18</sup>

### 2.2.4.2 Chemotherapie:

Da die meisten Patientinnen bei Operationen schon ein fortgeschrittenes Stadium mit Tumorausbreitung aufweisen, ist die Gesamtprognose des Karzinoms ungünstig. Somit kommt nach der chirurgischen Diagnostik der Zytostatikatherapie eine zentrale Rolle zur Behandlung des Ovarialkarzinoms zu.<sup>4,8,13,14</sup> **Standardtherapie** ist heutzutage eine auf 6 Zyklen angesetzte **Kombinationstherapie von Paclitaxel mit Carboplatin**, wobei ein Zyklus einer Gabe entspricht und in einem Intervall von 3 Wochen erfolgt.<sup>4,14,18</sup>

Diese moderne Chemotherapie hat sich im Vergleich zu früheren Regimen durchgesetzt und gilt heute als beste Behandlung, da sie höchste Wirksamkeit (75% Remissionen) mit vergleichsweise erträglichen Nebenwirkungen verbindet. Bis vor einigen Jahren wurde Cisplatin in Mono- und Kombinationschemotherapie bevorzugt eingesetzt. Wegen seiner erheblichen Nebenwirkungen, wie Nephro-, Neuro- und Ototoxizität sowie Übelkeit, wurde Cisplatin jedoch durch sein Analogon Carboplatin ersetzt.<sup>9,18</sup> Paclitaxel gehört zur Gruppe der Taxane, die von verschiedenen Eibenarten gebildet werden. Der Wirkstoff kommt vor allem in der pazifischen Eibe vor. Seine Wirkung beruht darauf, dass es an  $\beta$ -Tubulin bindet und nachfolgend eine Stabilisierung der Mikrotubuli eintritt. Dadurch wird der Abbau von Mikrotubuli gehemmt; Paclitaxel fungiert also als ein Mitosehemmer. Wirksam sind aber auch alkylierende Substanzen wie Cyclophosphamid, die bis vor Einführung des Cisplatins als Standard in der zytostatischen Behandlung von Patientinnen galten. Weiters werden auch Doxorubicin und Etoposid zur Chemotherapie eingesetzt. Zu beachten ist, dass die Zytostatika-Therapie genügend hoch dosiert ist und konsequent durchgeführt werden muss.<sup>9,17</sup> Je nachdem, in welcher Phase einer Ovarialtumorerkrankung eine Zytostatika-Therapie durchgeführt wird, unterscheidet man eine:

- **neoadjuvante (primäre) Chemotherapie:** zur Tumorreduktion vor einem chirurgischen Eingriff oder einer Bestrahlung.
- **adjuvante Chemotherapie:** wird im Anschluss an eine Operation oder Bestrahlung durchgeführt, um Tumorresiduen und Mikrometastasen zu entfernen. Die adjuvante Zytostatika-Therapie ist in allen Stadien indiziert mit einer einzigen Ausnahme: Patientinnen, die sich im frühen Stadium (FIGO Ia) befinden, können ohne adjuvante Therapie weiterhin betreut werden, da die Überlebensprognose auch ohne chemotherapeutische Behandlung bei 90-95 % liegt.
- **palliative Chemotherapie:** zur medikamentösen Therapie bei Progression und Rezidiv. Ein Wiederauftreten des Tumorwachstums in der Bauchhöhle tritt häufig trotz Fortschritte in der Primärtherapie bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom auf, vor allem dann, wenn der Tumor nicht komplett entfernt werden konnte.<sup>4,11,21</sup>

Folgende Formen des Rezidivs sind zu unterscheiden:

- **platin sensitives Ovarialkarzinomrezidiv:** wenn nach mehr als 6 Monaten nach Abschluss einer vorausgehenden platinhaltigen Therapie ein Rezidiv auftritt.
- **Platinrefraktäres Rezidiv:** bei Patientinnen mit einem Rezidiv innerhalb von 6 Monaten nach Primärtherapieabschluss.<sup>22</sup>

*Welche Therapie ist nun optimal für eine Frau mit rezidivierendem Ovarialkarzinom, die auf eine zuvor Platin-basierende Chemotherapie nicht angesprochen hat?*

Trotz anfänglich hoher Ansprechraten auf die Kombinationstherapie Carboplatin mit Paclitaxel oder auf die Monotherapie mit Carboplatin kommt es bei einem großen Anteil der Patientinnen zu einem Rückfall, was natürlich eine therapeutische Herausforderung darstellt. Ziel ist es daher laut dem Journal *Current Oncology* potentielle Wirkstoffe für Frauen mit rezidivierendem, epithelalem Ovarialkarzinom zu finden. Verschiedene Chemotherapien für Patientinnen mit wiederkehrendem Ovarialkarzinom wurden in 13 randomisierten Studien verglichen. An den Studien nahmen ausschließlich Patientinnen mit rezidivierendem Ovarialkarzinom teil, die auf die first-line Therapie nicht angesprochen haben. Folgende Kriterien wurden dabei unter anderem beachtet: Alter der Patientinnen, Vorhandensein von Aszites, Art der vorangegangenen Chemotherapie, Chemotherapiefreies- und Platinfreies Intervall. In 5 der 13 Studien konnte bei Patientinnen mit einem platin sensitiven Ovarialkarzinomrezidiv eine deutlich verbesserte Ansprechrate und ein erhöhtes Gesamtüberleben mit einer platinbasierten Kombinationstherapie im Vergleich zu einer Monotherapie mit Carboplatin allein gezeigt werden. Die durchschnittliche Überlebenszeit bei Patientinnen unter Monotherapie mit Carboplatin betrug 17-24 Monate. Die Toxizität wurde in allen 13 randomisierten Studien beobachtet und wie erwartet war die Kombinationstherapie mit höheren Raten an unerwünschten Ereignissen assoziiert. Schwerwiegende Nebenwirkungen vor allem hämatologischer Natur traten also laut Studien mit einer Kombinationstherapie häufiger auf als mit einer Monotherapie. Unerwünschte Wirkungen im Zusammenhang mit einer Paclitaxel-Applikation waren Alopezie (62-100% der Patientinnen), neurotoxische Effekte (5-42% der Patientinnen), schwere Leukämie (4-24% der Patientinnen) und starke Übelkeit und Erbrechen (2-6% der Patientinnen). Folgende Nebenwirkungen

traten während der Behandlung mit Carboplatin auf: schwerwiegende hämatologische Erkrankungen (15% der Patientinnen), starke Übelkeit und Erbrechen (10% der Patientinnen) sowie Alopezie (2-25% der Patientinnen).<sup>14,19,22</sup> Ferner wurden die Resultate einer Studie veröffentlicht, in welcher die Kombination von Carboplatin mit Gemcitabin zu einem längeren progressionsfreien Überleben und verbesserten Ansprechraten führte.

Die *gynecology cancer disease site group* (Gynecology Cancer DSG), die evidenzbasierte Berichte produziert, schlägt unter anderem folgende Empfehlungen vor:

**1)** Falls keine Kontraindikationen vorliegen, sollte eine Kombinationstherapie einer Monotherapie mit Carboplatin vorgezogen werden.

**2)** Wenn jedoch eine platinhaltige Kombinationschemotherapie nicht indiziert ist, zum Beispiel aufgrund einer Toxizität, so sollte eine Monotherapie in Betracht gezogen werden. Carboplatin hat Studien zufolge ein überschaubares Toxizitätsprofil.

**3)** Bei Patientinnen mit einem platinrefraktären Rezidiv ist die Prognose ungünstig. Hier wird versucht mit anderen aktiven Substanzen wie zum Beispiel dem Topoisomerase-I-Hemmer Topotecan, dem pegylierten liposomalen Doxorubicin oder auch mit Tamoxifen zu behandeln. Diese Patientinnen scheinen aber nicht von einer platinfreien Kombinationschemotherapie zu profitieren, da sie keinen zusätzlichen Vorteil bringen. Im Vergleich zu Paclitaxel oder pegyliertem Doxorubicin wurde während der Therapie mit Topotecan eine höhere Inzidenz an hämatologischen Erkrankungen beobachtet.<sup>22,23</sup>

Seit 2009 ist ein neuer Wirkstoff – Trabectedin, auch mit dem Handelsnamen Yondelis bekannt - für die Behandlung von Patientinnen mit platinsensitivem, rezidivierendem Ovarialkarzinom in Kombination mit dem liposomalen Doxorubicin auf dem Markt zugelassen. Patientinnen sollen auf die Second-Line Therapie mit Trabectedin gut ansprechen.<sup>24</sup>

Eine Zytostatika-Behandlung ist unverzüglich zu beenden, sobald schwerwiegende unerwünschte Wirkungen wie Kardiotoxizität, Nephrotoxizität oder Myelosuppression auftreten. Die moderne Chemotherapie hat die früher oft durchgeführte Bestrahlung stark zurückgedrängt.<sup>14</sup>

### 2.2.4.3 Strahlentherapie:

Durch die Erfolge der wirksamen Kombinationschemotherapie der letzten Jahre ist die Strahlentherapie als Therapieoption beim Ovarialkarzinom stark zurückgedrängt worden. Studien haben zudem gezeigt, dass eine Ganzabdomenbestrahlung nicht wirksamer ist als eine platinhaltige Therapie. Daher ist die Strahlentherapie heutzutage keine Standardtherapie beim Ovarialkarzinom. Als sinnvoll betrachtet man die Gesamtabdomenbestrahlung nur bei postoperativen Tumorresten von weniger als 4 mm. Der Vorteil der Bestrahlung liegt in der relativ kurzen Wirkdauer von 6 Wochen. Nachteile sind strahleninduzierte Gewebeveränderungen und Akutreaktionen, wie Diarrhoe, Übelkeit und Meteorismus sowie Leukopenie.<sup>9,11,14,19</sup>

### 2.2.4.4 "Multidrug-Resistance" - Chemotherapieresistenz:

Der Heilung eines Tumors steht oft wie schon erwähnt nicht nur das Auftreten schwerwiegender und vor allem dosisbegrenzender Nebenwirkungen der Zytostatika entgegen, sondern auch die Tumorresistenz. Zu unterscheiden sind:

- **die primäre Chemoresistenz:** der Tumor spricht von Anfang an nicht oder nur ungenügend auf die Chemotherapie an, und
- **die sekundäre Chemoresistenz:** nach anfänglichem Ansprechen des Tumors tritt im Laufe der Zeit eine Resistenz auf. Diese Form der Resistenz entwickelt sich meist bei solchen malignen Tumoren, bei denen mit Zytostatika keine rasche vollständige Remission erreicht werden konnte.<sup>25</sup>

Viele verschiedene Mechanismen sind dabei an der Vielfachresistenz beteiligt:

- **Membranäre Transportproteine:** Viele Chemotherapeutika überwinden zelluläre Barrieren, um an ihren Wirkort zu gelangen und dort ihre Wirkung zu entfalten. Für diesen Transportprozess sind Transportproteine, die integrale Bestandteile der Zellmembran sind, zuständig. Das P-170-Glykoprotein beispielsweise ist ein spezielles Eiweißmolekül und das bekannteste Mitglied der ABC-Transporter-

Superfamilie, das in der Zellmembran der meisten normalen Zellen verankert ist und als Pumpe funktioniert. Seine Aufgabe ist es, toxische Substanzen aus dem Zellinneren durch einen Pumpmechanismus hinauszubefördern. Das Glykoprotein wird durch das MDR-1-Gen ("Multi Drug Resistance Gene") kodiert. Kommt es zu einer erhöhten Expression des MDR-1-Gens und dadurch gesteigerter Produktion des P-170-Glykoproteins, so werden Fremdstoffe, wie auch Zytostatika, vermehrt aus der Zelle gepumpt, bevor sie ihre zellschädigende Wirkung entfalten können. In resistenten Tumorzellen trifft man auf eine erhöhte Konzentration des P-170-Glykoproteins. Über die Solute Carrier (SLC-) Familie, zu der auch die organischen Anionen transportierenden Polypeptide (OATPs) zählen, ist im Vergleich zu den ABC-Transportern noch wenig bekannt, ihre Bedeutung hat aber in den letzten Jahren rasant zugenommen. In den folgenden Kapiteln werden die OATPs noch im Detail besprochen.<sup>26,27,28,29,30,31</sup>

- **Mutationen:** Aufgrund der genetischen Instabilität maligner Zellen entstehen ständig Mutationen, was auch häufig der Grund für die unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Zytostatika ist. Eine Mutation des Tumorsuppressorgens p53, das die Zellen mit irreparabel beschädigter DNA in die Apoptose schickt, führt zu seiner Inaktivierung, sodass sich auch Tumorzellen, die durch Zytostatika geschädigt wurden, weiterhin teilen können. Umgekehrt führt eine Überaktivität des bcl-2-Gens, eines Gens, das den programmierten Zelltod verhindert, auch zu einer Chemoresistenz.
- **Enzyme:** Enzyme können im Inneren der Zelle manche Zytostatika chemisch verändern und aktivieren, so dass sie erst dann ihre Wirkung entfalten. In Tumorzellen können diese Enzymsysteme fehlen, was zu einer Resistenz führt. Andererseits können Zytostatika ihre Wirkung ausüben, indem sie für die Tumorzelle wichtige Enzymsysteme blockieren. Wenn jedoch diese Zielenzyme vermehrt synthetisiert werden, kann die Zytostatika-Wirkung aufgehoben und somit Resistenz erworben werden.<sup>21,27,28,29,30</sup>

Aufgrund dieser unterschiedlichen Resistenzmechanismen versucht man das Auftreten einer Resistenz durch verschiedene Maßnahmen zu verhindern oder zu verzögern. Folgende Maßnahmen werden ergriffen:

1. **Kombinationschemotherapie** mit unterschiedlichen Wirkungsmechanismen und Angriffspunkten der Zytostatika
2. möglichst **hohe Dosierung** der Chemotherapeutika
3. **kurze Intervalle** zwischen den Therapiezyklen<sup>29</sup>

### 2.2.5 Organic anion transporting polypeptides (OATPs):

Die für den Transport von organischen und anorganischen Substanzen notwendigen Transporter werden in 2 große Superfamilien unterteilt:

- die „*ATP-binding Cassette Transporters*“ (ABC-Transporter-Superfamilie) und
- die „*Solute Carrier Family Transporters*“ (SLCs).

Die Pharmakokinetik in den einzelnen Organen wird unter anderem durch Influx- und Efflux-Prozesse dieser Transporter bestimmt. Die **ABC-Transporter** dienen vor allem dem Export von Arzneimitteln, wobei sie an Adenosintriphosphat angewiesen sind, um den Transport aus der Zelle zu bewerkstelligen und die dafür notwendige Energie durch ATP-Hydrolyse beziehen.<sup>30,31</sup>

Die **SLC-Transporter** sind in erster Linie für den Import von Arzneimitteln zuständig. Sie sind aber auch als Transporter zum bidirektionalen Transport befähigt, die als ionengekoppelte Antiporter und Symporter fungieren. Der Transport ist hier an einen elektrochemischen Gradienten gekoppelt. Insgesamt gibt es 47 Familien (SLC 1 bis SLC 47), die in Menschen, Mäusen und Ratten identifiziert worden sind.

Die Superfamilie **SLC 21A** kodiert für die **organic anion transporting polypeptides (OATPs)**, die Na<sup>+</sup>-unabhängige Transporter darstellen. Zu den Aufnahmetransportern gehören neben den OATPs auch die SLC 22 Superfamilie, die wiederum unterteilt werden in die **OATs (organic anion transporters)**, die **OCTs (organic cation transporters)**, den **Harnsäure Transporter (URAT)** und in **unbekannte Substrat Transporter**.<sup>26,32,33,38</sup> Die OATs fungieren meistens als Austauscher, die den Eintritt eines organischen Anions mit dem Austritt eines anderen organischen Anions koppeln.

Sie werden vorwiegend in der Niere, im Plexus choroideus und in der Leber exprimiert. In der Niere sind sie hauptsächlich für die Elimination vieler Arzneistoffe verantwortlich. Insgesamt gibt es 6 verschiedene OATs, die eine überlappende Substratspezifität und Gewebeverteilung aufweisen.<sup>32</sup> Die OATs vermitteln unter anderem den Transport von Methotrexat, NSAIDs, antiviralen Wirkstoffen und Cephalosporinen in der Niere. Darüber hinaus gibt es die **MCTs (Monocarboxylate transporters, SLC 16)** und die **PEPTs (proton/peptide co-transporters, SLC 15A)**.<sup>26,32,33,34</sup>

**Tab. 2: Tabelle mit ausgewählten SLC-Transportern und ihren Liganden**<sup>34</sup>

<i>Unterfamilie</i>	<i>Anzahl der Transporter</i>	<i>Name</i>	<i>Liganden</i>
SLC3	A1,A2	Aminosäuretransporter (neutral)	L-Dopa
SLC7	A1-A14	Aminosäuretransporter (kationisch)	
SLC15	A1-A4	Oligopeptid- und H <sup>+</sup> /Peptidtransporter	ACE-Hemmer, $\beta$ -Lactamantibiotika
SLC16	A1-A14	Monocarbonsäuretransporter (MCT)	Benzoessäure, kurzkettige Fettsäuren, Milchsäure
SLC21/SLCO	A1-A11	Organischer Anionentransporter (OAT)	$\beta$ -Lactamantibiotika, Fexofenadin, Prostaglandine
SLC22	A1-A18	Organischer Anionen- und Kationentransporter	Penicilline, Verapamil, Chinidin, Dopamin

Die Mitglieder der OATP-Familie wurden in pharmakologischer Hinsicht am ausführlichsten untersucht. Im gesunden Körper sind OATPs für den Zellstoffwechsel lebensnotwendig. Sie befördern eine breite Palette von amphipathischen Substraten einschließlich organischer Anionen und zahlreicher Arzneimittel wahrscheinlich im Austausch mit reduziertem Glutathion, Glutathion-S-Konjugaten oder Bikarbonat in das Zellinnere. Sie vermitteln unter anderem die Membranpassage von Statinen, ACE-Hemmern, von Rifampicin sowie von Zytostatika wie Paclitaxel und Methotrexat. Der Transport über die OATPs läuft elektronenneutral ab und ist abhängig vom pH-Wert.<sup>26</sup> Mittlerweile sind 52 OATP Mitglieder bekannt, wobei 36 davon sich im Menschen, in der Ratte und in der Maus finden. Aufgrund des enormen Wissenszuwachses, der Entdeckung neuer Mitglieder der SLC21A-Superfamilie und der Uneinheitlichkeit der

alten Nomenklatur wurde ein neues Nomenklatorsystem von der **HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC)** eingeführt. Die humanen Gene werden durch das Präfix **SLCO** gekennzeichnet. Die entsprechenden Genprodukte, also die Proteine, werden wie bereits erwähnt als **OATP** bezeichnet, während die murinen Gene und Genprodukte mit Kleinbuchstaben – also **slco** und **oatp** - geschrieben werden. Insgesamt besteht die **humane OATP-Familie** aus **11 Mitgliedern**, die dann je nach Sequenzhomologie (mit über 40 % Übereinstimmung in der Gensequenz) in **6 Familien** untergliedert werden (OATP1, OATP2,...); erkennbar an den Zahlen 1-6. Diese werden wiederum in Subfamilien (mit über 60 % Gensequenzübereinstimmung), erkennbar an den Subfamilienbuchstaben (zum Beispiel OATP 1A, OATP 1B,...), unterteilt und weiters mit individuellen Gennummern versehen (zum Beispiel OATP 1A2, OATP 1B1,...).<sup>35,36</sup>

Allen OATP gemeinsam ist, dass sie **12 Transmembrandomänen** mit unterschiedlichen intra- und extrazellulären Abschnitten besitzen, wobei das carboxy- und aminotermale Ende zytosolisch liegt. Auffällig ist die fünfte von den sechs extrazellulären Schleifen, die mehrere N-Glykoylierungsstellen und viele konservierte Cystein-Reste, die der Zinkfingerstruktur der DNA-bindenden Proteine ähnelt, aufweist. Die Aufnahmetransportproteine bestehen in Summe aus 643-722 Aminosäuren.<sup>26,35,37,38</sup>

Die OATPs weisen ein heterogenes Substratspektrum auf, das sowohl endogene Substanzen wie Gallensäuren, Schilddrüsenhormone, Eikosanoide, Steroide oder cAMP, als auch exogene Substrate wie verschiedene Xenobiotika der Klasse der Zytostatika, Antibiotika, NSAIDs oder Opiode umfasst.<sup>36,37,38</sup> Die meisten OATP-Transporter werden in einer Vielzahl von Geweben wie Leber, Nieren, Darm, Herz, Plazenta und Gehirn exprimiert, während die Expression der Transporter der Subklasse OATP 1B1 (OATP 2/ OATP-C) und 1B3 (OATP 8) vorwiegend in der Leber überwiegt.<sup>35,38,39,40</sup> OATP 1A2 zeigt ihre höchste Expressionsrate im Gehirn und in den Hoden. OATP 2B1 (OATP-B) und OATP 4A1 (Oatp-E) dagegen kommen ubiquitär in vielen Geweben vor.<sup>35,38,41</sup>

Einige OATPs, vor allem die Transporter der Subfamilie OATP 1, weisen eine sehr geringe Substratspezifität auf. Im Gegensatz dazu gibt es Transporter mit einer sehr eng gefassten Substratspezifität, die sehr viel selektiver transportieren. Hier stehen spezifische physiologische Funktionen in den einzelnen Geweben und Organen im Vordergrund.<sup>26,35,38</sup>

## ***Merkmale der humanen OATP Mitglieder***

- In der **OATP1-Familie** finden sich die 3 Subfamilien OATP1A, OATP1B und OATP1C.

Die Subfamilie **OATP1A** mit seinem einzigen humanen Vertreter **OATP1A2 (OATP-A)** weist höchste Expressionsraten im Gehirn, das erstmals aus einer cDNA-Bibliothek einer menschlichen Leber isoliert wurde. OATP1A2 weist das breiteste Substratspektrum unter all den humanen OATPs dar. Seine Expression in der Blut-Hirn-Schranke scheint eine wichtige Rolle im Transport von Wirkstoffen und neuroaktiven Peptiden ins Gehirn zu spielen.<sup>35</sup>

In der Subfamilie **OATP1B** sind 2 humane Mitglieder bekannt, nämlich **OATP1B1 (OATP-C)** und **OATP1B3 (OATP-8)**. OATP1B1 wurde aus der menschlichen Leber kloniert und stellt ein aus 691 Aminosäuren bestehendes Glykoprotein dar. Es weist 80% Sequenzhomologie mit dem OATP1B3 Transporter auf. OATP1B1 wird ausschließlich an der basolateralen (sinusoidalen) Plasmamembranseite der Hepatozyten exprimiert, daher wird angenommen, dass dieser Transporter eine wesentliche Rolle in der hepatischen Clearance von albumingebundenen amphipatisch organischen Komponenten spielt. OATP1B3 weist eine ähnlich breite Substratspezifität wie OATP1B1 auf und wird ebenso vorwiegend an der sinusoidalen Membranseite der Hepatozyten exprimiert.

Die Subfamilie **OATP1C** umfasst das einzige Mitglied **OATP1C1 (OATP-F)**, das aus dem menschlichen Gehirn isoliert wurde.<sup>35,37</sup>

- Die **OATP2-Familie** besteht aus den 2 Subfamilien **OATP2A** und **OATP2B** mit insgesamt 5 individuellen Genen im Menschen, in der Maus und in der Ratte.

Die Subfamilie umfasst den **OATP2A1-Transporter**, der auch **PGT (prostaglandin transporter)** genannt wird, welcher ein Protein aus 643 Aminosäuren darstellt. Obwohl OATP2A1 aus der Niere kloniert wurde, weist seine mRNA höchste Expressionsraten im Herzen, im Skelettmuskel und im Pankreas auf. Zu seinen Substraten zählen in erster Linie Prostaglandine wie PGE<sub>2</sub>. Der Transporter scheint daher indirekt an der Regulation des extrazellulären Prostaglandin-Gehaltes beteiligt zu sein. Das zweite Mitglied dieser Familie ist **OATP2B1**, das ursprünglich aus dem menschlichen Gehirn

isoliert wurde. OATP2B1 wird in der Leber am stärksten exprimiert, gefolgt von der Milz, der Plazanta, der Lunge, der Niere, dem Herzen, dem Ovar, dem Dünndarm und dem Gehirn. In der Leber wird der Transporter ausschließlich an der basolateralen Plasmamembranseite der Hepatozyten exprimiert. Dementsprechend ist OATP2B1 das dritte an der sinusoidalen Hepatozytenmembran lokalisierte OATP.<sup>35,37</sup>

- In der **OATP3-Familie** findet sich als einzige Untergruppe die **OATP3A-Subfamilie**. Diese Subfamilie umfasst den humanen **OATP3A1**-Transporter (**OATP-D**), der ubiquitär in den verschiedensten Geweben vorkommt und häufig in Krebszelllinien detektiert werden konnte.<sup>35</sup>
- Die **OATP4-Familie** wird in die 2 Subfamilien **OATP4A** und **OATP4C** untergliedert, wobei OATP4A mit seinem einzigen Vertreter **OATP4A1** ubiquitär exprimiert wird in Leber, Herz, Placenta und Pankreas, wohingegen **OATP4C1** nierenspezifisch zu sein scheint.<sup>35</sup>
- In der **OATP5-Familie** ist über das einzige Mitglied **OATP5A1** noch wenig bekannt.<sup>37</sup>
- Die **OATP6-Familie** mit seinem einzigen humanen Vertreter **OATP6A1** kommt vorwiegend in den Hoden vor.<sup>35</sup>

Das OATP-Transportsystem befindet sich also ubiquitär in den verschiedensten Organen, das durch die wachsende Anzahl bekannter Substrate einen zunehmend höheren Stellenwert in der Pharmakokinetik gewinnt.<sup>36,38,40,42</sup>

## **2.3 Pharmakogenetik: Einfluss auf Arzneimittelwirkungen:**

### ***Das Wechselspiel der OATPs mit Stoffwechsellenzymen und nukleären Rezeptoren***

Die Wirkstoffkonzentration eines Medikaments im Organismus wird von den pharmakokinetischen Faktoren: Absorption, Distribution, Metabolisierung und Elimination bestimmt, die auch unter der Bezeichnung ADME zusammengefasst werden können. Für viele Wirkstoffe ist die Leber das Hauptorgan für den Metabolismus und die Elimination. In der Leber wird der Stoffwechsel durch ein Zusammenspiel von Transport- und Metabolisierungsvorgängen bestimmt. In letzter Zeit haben genetische

Unterschiede beziehungsweise Polymorphismen vieler Proteine wie Stoffwechsellzyme und Transporter an Bedeutung zugenommen. Dies betrifft vor allem die an der Biotransformation beteiligten Enzyme, die sogenannten **Cytochrom-P450-Enzyme**, und die Transportproteine.<sup>30,42</sup> Das Cytochrom-P450-Enzymsystem, vor allem die CYP3A-Subfamilie, wird für die Verstoffwechslung von nahezu 50 % aller therapeutisch eingesetzten Medikamente verantwortlich gemacht. Eine Vielzahl von genetischen Varianten der Isoenzyme des Cytochrom-P450-Systems sind beschrieben worden, die die Wirksamkeit von Arzneimitteln durch Induktion oder Hemmung der Enzymaktivität beeinflussen und somit ein Spektrum individuell differierender Effekte zeigen können.

Für das Transportsystem sind ebenso genetische Varianten, die die Transportfunktion in vitro beeinflussen, beschrieben worden. Klinische Studien konnten beispielsweise zeigen, dass Polymorphismen des OATP-C- beziehungsweise OATP 1B1- Transporters einen Einfluss auf die hepatische Clearance des Medikaments Pravastatin haben. Polymorphismen beeinflussen somit in erheblichem, lange unterschätztem Ausmaß die interindividuellen Reaktionen des Organismus auf die Medikamente. Besondere Bedeutung hierbei kommt den nukleären Rezeptoren, welche als ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren die Expression von Zielgenen durch Binden an regulatorische Regionen (Promoter oder Enhancer) beeinflussen. Insgesamt gibt es 49 Mitglieder dieser Kernrezeptorfamilie, die drei gemeinsame strukturelle Merkmale aufweisen:

- Am N-Terminus ist eine Aktivatorfunktionsdomäne (AF-1) verantwortlich für die ligandenunabhängige Aktivierung der Transkription
- Eine DNA-Bindungsdomäne (DBD), die mit den entsprechenden response elements der Ziel-DNA interagiert und die Transkription moduliert
- Die Ligandenbindungsdomäne (LBD) ist C-terminal lokalisiert<sup>42,43</sup>

Hervorzuheben sind die nukleären Hormonrezeptoren **PXR (Pregnan-X-Rezeptor, NR1I2)** und **CAR (konstitutiver Androstan-Rezeptor)**, die auch als intrazelluläre Xenosensoren bezeichnet werden. Sie regulieren als Heterodimere mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR) die Transkription ihrer Zielgene. Der Pregnan X Rezeptor (PXR) ist für die Regulation der Expression diverser Gene, die an der Entgiftung verschiedener

Arzneistoffe beteiligt sind, zuständig. Dazu gehören unter anderem die Mitglieder der organischen Anionen transportierenden Polypeptide und der Cyp-450 Familie. Insbesondere die OATP 1B-Subfamilie mit ihren Mitgliedern 1B1 und 1B3, die in der Leber gesteigert exprimiert werden, können eine Vielzahl von Liganden für die Kernrezeptoren wie dem PXR und CAR transportieren. Dementsprechend können die OATP 1B Transporter indirekt die Expression der Gene für den Arzneistoffmetabolismus über eine Modulation der intrazellulären Konzentration von PXR- und CAR-Liganden regulieren. Darüber hinaus wurden wie schon erwähnt eine Reihe von funktionell wichtigen Polymorphismen, sogenannte SNPs (single nucleotide polymorphisms), in OATP 1B Transportern beschrieben.<sup>26,42,43,44</sup>

Im Folgenden wird der Einfluss diverser OATP-Transporter und ihrer genetischen Varianten auf das pharmakokinetische Profil von Arzneistoffen beschrieben. Zahlreiche genetische Varianten konnten für OATP 1B1 und 1B3, ferner für OATP 2B1, identifiziert werden.

Die gesteigerte hepatische Aufnahme von Statinen scheint durch den OATP-1B-Transporter vermittelt zu sein. In vitro-Studien haben gezeigt, dass diese Transportproteinklasse, vor allem das Mitglied OATP 1B1, bei der hepatozellulären Aufnahme von Rosuvastatin, Pravastatin, Atorvastatin, Cerivastatin und Fluvastatin eine große Rolle spielt. Statine (3-HMG-CoA-Reductasehemmern) bewerkstelligen ihren Cholesterin-senkenden Effekt, indem sie die hepatische HMG-CoA-Reductase hemmen. Eine Reihe von unterschiedlichen Allelen des **OATP 1B1** wurden identifiziert, die eine reduzierte Transportaktivität von endogenen Komponenten wie zum Beispiel Estron-3-sulfat oder Estradiol-17 $\beta$ -Glucuronid darstellen. Zu den Substraten von OATP 1B1 gehören neben diesen endogenen Komponenten und den Statinen auch das Antidiabetikum Nateglinid oder der aktive Metabolit SN-38 des Zytostatikums Irinotecan, der zur Behandlung des Colonkarzinoms eingesetzt wird. Etliche Studien zeigten, dass das Allel SLCO 1B1\*1b eine erhöhte Transportaktivität für Statine im Vergleich zu dem Wildtyp SLCO 1B1\*1a- Allel zeigt. Ähnliche Resultate konnten auch für Nateglinid aufgeführt werden. Neueste Untersuchungen zeigen, dass Individuen mit genetisch bedingter, funktionell eingeschränkter Aktivität des organischen Anionentransporters 1B1 aufgrund der erhöhten Plasmaspiegel ein höheres Risiko für Statin-induzierte Myopathie und Rhabdomyolyse (Untergang von Muskelzellen der quergestreiften

Muskulatur) tragen. Man vermutet auch, dass OATP 1B1 in der Regulation der Cholesterin-Synthese beteiligt ist. Das Allel SLCO 1B1\*1b wird mit einer erhöhten Cholesterin-Syntheserate in Zusammenhang gebracht.<sup>38,42</sup>

**OATP 1B3** ist das zweite Mitglied der OATP-1B-Subfamilie, das in der Leber ein erhöhtes Expressionsmuster aufweist, aber auch in anderen Geweben wie der Placenta, der Prostata und dem Colon detektiert wurde. OATP 1B3 teilt eine Vielzahl von Substraten mit OATP 1B1, allerdings weist es eine niedrigere Affinität auf. Es gibt nur wenige Substrate, die ausschließlich durch OATP 1B3 transportiert werden, wie zum Beispiel das gastrointestinale Peptidhormon CCK-8 und das Herzglykosid Digoxin. Ähnlich dem SLCO 1B1 Gen wurden auch für das SLCO 1B3-Gen viele natürlich auftretende SNPs beschrieben. Studien, die die Auswirkungen von genetischen Varianten in OATP 1B3 auf die Pharmakokinetik von Telmisartan untersuchten, konnten keine Unterschiede in der Aufnahme und Clearance des Arzneistoffes deutlich machen. Ähnliche Resultate zeigten auch Paclitaxel und Docetaxel, was wiederum vermuten lässt, dass Polymorphismen in OATP 1B3 als Einflussvariable in der Disposition ihrer Substrate eine geringe Rolle spielen. Darüber hinaus wird OATP 1B3 im Prostatakarzinom vermehrt exprimiert. Ihre genetischen Varianten c.334>G und c.688G>A werden in Zusammenhang mit einer niedrigeren Transportaktivität für Testosteron gebracht und scheinen somit ein positiv prognostischer Faktor für das Überleben der Patienten mit dieser Erkrankung zu sein.<sup>38,42</sup>

**OATP 2B1** ist das einzige Mitglied der humanen OATP-2B-Subfamilie der solute carriers. Im Gegensatz zu den Mitgliedern der OATP-1B-Subfamilie ist die Substratspezifität für OATP 2B1 viel mehr begrenzt, obwohl es ubiquitär in vielen Geweben wie dem Dünndarm, dem Colon, der Leber, dem Pankreas, dem Herz, der Testes und der Plazenta sowie in den Thrombozyten vorkommt. Neueste Untersuchungen zeigen, dass OATP 2B1 in der Disposition vom oralen Renin-Inhibitor Aliskiren, weiters von Atorvastatin, Rosuvastatin, Fluvastatin, Amiodaron und Glibenclamid von wichtiger Bedeutung ist. Derzeit konnten nur wenige genetische Varianten im SLCO 2B1 identifiziert werden, wobei der Einfluss dieser SNPs auf den therapeutischen Effekt vieler Arzneistoffe noch untersucht werden muss.<sup>38,42</sup>

Im Anschluss an die aufgeführten Polymorphismen in OATPs soll nun das Zusammenspiel der OATP-1B-Transporter und der nukleären Rezeptoren PXR und

CAR diskutiert werden. Die potentielle Beteiligung der OATP-1B-Transporter in der Regulation der CYP-Enzyme via nukleärer Rezeptoren hat damit zu tun, dass viele Liganden, beispielsweise Rifampicin, mit hoher Affinität für diese Kernrezeptoren bekannt sind als Substrate von OATP 1B1. Im Falle von Rifampicin wirkt der Aufnahmetransporter OATP 1B1, indem es das Ausmaß des Wirkstoffeintritts in die Hepatozyten ändert und dadurch die Menge an verfügbarem Wirkstoff für die PXR-medierte Transaktivierung der hepatischen Zielgene erhöht. Zudem belegen weitere Studien, die SLCO 1b2 knockout-Mäuse nutzten, eine signifikant reduzierte Rifampicin-Konzentration in der Leber bei Abwesenheit dieses Transporters. Darüber hinaus zeigten Studien in Mäusen, dass eine Begleittherapie mit Rifampicin die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) von Atorvastatin erhöht.<sup>42</sup>

Ciclosporin A ist ein potenter Inhibitor von Arzneistofftransportern einschließlich OATP 1B1 und ebenso bekannt für die Hemmung von CYP 3A4. Ein weiterer gut untersuchter CYP 3A4- Inhibitor und OATP 1B1-Hemmer ist Clarithromycin, der bei einer Begleittherapie die Konzentration an Pravastatin erheblich erhöht. Ähnliche Resultate konnten auch für Gemfibrozil gezeigt werden. Die Elimination von Bosentan, einem dualen Endothelin-Rezeptor-Antagonist, geschieht überwiegend durch CYP 3A4 – und 2C9-abhängige Metabolisierung. Die gleichzeitige Gabe von Ketoconazol - ein starker CYP 3A4-Inhibitor - führte zu einem zweifachen Anstieg der Bosentan-Konzentration, während Rifampicin – ein relativ schwacher CYP 3A4-Inhibitor – imstande war, die Bosentan-Plasmakonzentration auf das 6,5fache zu erhöhen. Repaglinid gilt neben Bosentan als weiteres Substrat des OATP-1B-Transporters, das durch CYP 3A4 verstoffwechselt wird. Bidstrup et al zeigten, dass Rifampicin die Aufnahme von Repaglinid um 50% reduziert, wenn Repaglinid gleichzeitig mit Rifampicin verabreicht wird, während die Reduktion 80% betrug, wenn Repaglinid 24 Stunden nach Applikation der letzten Dosis von Rifampicin eingenommen wurde.

Die Bedeutung der Transportproteine für Arzneimittel-Interaktionen sowie für physiologische, toxikologische und pathophysiologische Vorgänge nimmt weiter zu, somit stellen die OATPs einen bedeutenden Forschungszweig dar, die für neue verbesserte Therapieoptionen in Frage kommen könnten.<sup>42</sup>

## 3 MATERIAL UND METHODEN:

### 3.1 Immunfluoreszenz

#### 3.1.1 Prinzip

Diese Methode dient zum Nachweis bestimmter Antigene mithilfe von Antikörpern, die mit einem Fluoreszenzmarker versehen sind. Die Immunfluoreszenztechnik wird unterteilt in die direkte und die indirekte Immunfluoreszenzfärbung.

- **Direkte Immunfluoreszenz:** Der eingesetzte primäre Antikörper ist an ein Fluorochrom gekoppelt und bindet spezifisch an Epitope auf einem Antigen; dadurch können bestimmte Proteine sichtbar gemacht werden.
- **Indirekte Immunfluoreszenz:** In diesem Fall ist der erste Antikörper (Primärantikörper) nicht an ein Farbstoff gekoppelt. Er bindet zwar an die gesuchte Antigen-Region, kann jedoch noch nicht mikroskopisch dargestellt werden. Dafür ist ein zweiter Antikörper (Sekundärantikörper), der einen Fluoreszenzfarbstoff trägt, von Nöten, der sich gegen eine spezifische Region des Primärantikörpers richtet und folglich an diesen bindet. Die indirekte Immunfluoreszenz ist im Vergleich zur direkten Immunfluoreszenz um einiges empfindlicher. Sie erlaubt mehr Flexibilität, da viele Primärantikörper mit demselben markierten Sekundärantikörper kombiniert werden können. Man braucht also nicht für jedes einzelne Antigen einen eigenen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper herzustellen und erspart sich dadurch einen Produktions- und Kostenaufwand. Daher kommt die indirekte Methode eher zur Anwendung und auch hier wird im Folgenden nur auf die indirekte Immunfluoreszenz eingegangen.<sup>45</sup>

Die Antikörper stammen aus den verschiedensten Wirten wie zum Beispiel Mäusen, Ziegen, Ratten oder Hasen, die mit dem entsprechenden Antigen geimpft werden, wobei je nach Immunisierungstechnik mono- beziehungsweise polyklonale Antikörper hergestellt werden. Bei der indirekten Immunfluoreszenz ist die immunisierte Tierart von großer Bedeutung, da das Blut des Tieres, aus dem der Erstantikörper gewonnen wird, Immunglobuline enthält, gegen welche sich der Zweitantikörper richten muss. Daher

muss der auf den Primärantikörper gerichtete Sekundärantikörper aus demselben Wirt stammen. Mittels Fluoreszenzmikroskopie können dann die gesuchten Proteine lokalisiert und detektiert werden. Es können mehrere Proteine gleichzeitig markiert werden, jedoch unter der Bedingung, dass die Primärantikörper aus unterschiedlichen Wirten und die Sekundärantikörper mit verschieden-farbigem Fluoreszenz-Wellenlängen eingesetzt werden. Man spricht hier von einer Doppel- beziehungsweise Dreifachfärbung.<sup>45</sup>

### 3.1.2 Vorbereitung

Für die Immunfluoreszenzfärbung müssen folgende Lösungen hergestellt werden

- **PBS (phosphate buffered saline)**

*Verwendete Reagentien:*

- 0,20g KCl (Endkonzentration 2,7 mM)
- 8,01g NaCl (Endkonzentration 137 mM)
- 0,21g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Endkonzentration 1,5 mM)
- 1,44g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2 H<sub>2</sub>O (Endkonzentration 8,1 mM)

Die Salze werden in 1000 ml Aqua bidest. gelöst und der pH mittels pH-Meter gemessen. Nötigenfalls muss der pH-Wert mit 0,1 N NaOH oder HCl auf 7,4 eingestellt werden. Anschließend wird die Lösung in einer geeigneten Flasche auf 4° C gelagert. PBS wird in den Zwischenschritten der Färbung als Spülmittel zur Entfernung der überschüssigen Lösungen verwendet.

- **PBS-Tween 20 0,1%**

1000 ml PBS + 1 ml Tween 20. PBS-Tween ist ebenso wie PBS wichtig für die Waschvorgänge.

- **Xylol-Ethanol-Reihe**

Xylol wird zur Entparaffinierung und die Ethanol-Reihe bestehend aus absolutem, 96%igem, 70%igem, 50%igem und 30%igem Ethanol zur Rehydratisierung der Paraffinschnitte verwendet.

- **Citratpuffer**

10 mM Citratpuffer, pH 6, hat eine antigendemaskierende Wirkung.

Zusammensetzung: 8,5 ml Stammlösung A und 41,5 ml Stammlösung B werden zu 500 ml mit Aqua dest. aufgefüllt und nötigenfalls auf einen pH-Wert von 6 eingestellt.

Verwendete Reagentien:

1. für **Stammlösung A** : 0,1 M Zitronensäure ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ , Merck 244)  
21,01g in 1000 ml Aqua dest.
2. für **Stammlösung B** : 0,1 M Natriumcitrat ( $C_6H_5O_7Na_3 \cdot H_2O$ , Sigma C-8532)  
29,41g in 1000 ml Aqua dest.

- **5 % BSA (bovine serum albumin) in PBS**

Diese 5 %ige Rinderserumalbumin-Lösung wird als Block-Puffer und für die Permeabilisierung sowie für Antikörper-Verdünnungen verwendet. 5g BSA wird in 100ml PBS unter ständigem Rühren für etwa eine Stunde gelöst. Die hergestellte Lösung wird anschließend in Falcon-Röhrchen mit 15 ml Füllmenge aliquotiert und bei  $-20^\circ C$  tiefkühlgelagert.

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

DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der spezifisch an die DNA bindet und Komplexe bildet, wodurch stark fluoreszierende Kerne entstehen. Dadurch können Zellkerne selektiv lokalisiert werden. Der Farbstoff wird in Aqua bidest.. oder PBS gelöst und 1:10.000 oder 1:100.000 verdünnt und anschließend bei  $-20^\circ C$  gelagert.

- **Mowiol**

Mowiol 4-88 ist ein Polyvinylalkohol mit sehr hoher Klebkraft, das in der Histologie als Einbettmittel zur Herstellung von Dauerpräparaten verwendet wird. Es eignet sich sehr gut zur Fluoreszenzmikroskopie, da seine Eigenfluoreszenz sehr gering ist.

6g Glycerin werden in einem Falcon-/Zentrifugenröhrchen eingewogen, 2,4g Mowiol hinzugefügt und auf einem Magnetrührer gerührt. Das Einbettmittel wird bei Raumtemperatur so lange gerührt, bis es sich mit Glycerin gut benetzt und löst. Anschließend werden 6 ml Aqua dest. zugesetzt. Die Lösung wird am Vortexer durchmischt und dann auf einem Schüttelgerät für 2 Stunden bei Raumtemperatur

geschüttelt. Nach Zusatz von 12 ml 0,2 M Tris/ HCl, pH 8,5 und 0,02 % Natriumazid lässt man die Mischung für 3 Stunden in einem auf 50°C erwärmten Wasserbad inkubieren unter gelegentlichem Schütteln, um die Flocken aufzulösen. Durch Zentrifugieren (5000 \* g für 15 min) können dann die nicht gelösten Bestandteile entfernt werden. Zum Schluss wird die Lösung noch sterilfiltriert (0,2 µm Pore), auf jeweils 1 ml in Eppendorf-Gefäße aliquotiert und bei 4°C gelagert.

### **3.1.3 Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung an formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeschnitten**

#### **3.1.3.1 Untersuchungsmaterial**

Die Immunfluoreszenz-Färbungen wurden an Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Ovarialkarzinomgewebeproben, die aus der Klinik für Gynäkologie in Wien (AKH) stammen, durchgeführt. Die Gewebeprobenentnahme erfolgte während einer Routineoperation, wobei die Zustimmung der Patientinnen zur Verwendung der Gewebeschnitte für Forschungszwecke eingeholt wurde. Ein positives Votum der Ethikkommission lag vor. Die immunzytochemischen Untersuchungen wurden an 4 µm Schnitten durchgeführt.

#### **3.1.3.2 Färbeablauf**

- Trocknen der Schnitte für 25 min im Brutschrank (60°C)

- **Entparaffinierung und Rehydratisierung der Schnitte**

Das Paraffin der Gewebeschnitte muss vorerst in Xylol (3x10 min) gründlich entfernt werden, da die unspezifische Hintergrundfärbung bei Vorhandensein von Paraffinresten erhöht wird. Anschließend werden die Schnitte einer absteigenden Alkoholreihe zur Rehydratisierung und Entfernung des Xylols unterworfen (2x5 min in absolutem Ethanol, dann jeweils 5 min in 96 %, 70 %, 50 % und 30 % Ethanol).

- Spülen in PBS bzw. PBS-Tween (3x5 min)

- **Antigendemaskierung der Schnitte mit Citratpuffer**

Die Fixierung der Gewebeschnitte mit Formaldehyd führt zu einer Verringerung oder Verhinderung der Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Bindung des Antikörpers an das entsprechende Epitop wird somit erschwert. Die maskierten Gewebeantigene müssen daher mittels Citratpuffer freigelegt werden. Zunächst füllt man ein hitzestabiles Plastikgefäß mit 10 mM Citratpuffer auf und erwärmt ihn in einem Dampfgerar für 10min. Die Schnitte werden dann ins Gefäß gestellt, für 15 min in Citratpuffer ( ~98°C, pH6) sprudelnd gekocht und anschließend auf Raumtemperatur etwa 20 min zum Abkühlen stehen gelassen. Zuletzt spült man die Präparate in Waschpuffer PBS/PBS-Tween (2x5 min).

- Die Objektträger werden herausgenommen und die Schnitte mit einem saugfähigen Kleenex-Tuch getrocknet. Das Gewebe wird anschließend mit einem Dako-Pen Fettstift umrandet und die Probe beschriftet. Zu beachten ist, dass das Gewebe nicht so lange trocken bleiben darf, daher ist ein zügiges Arbeiten notwendig.

- **Permeabilisieren und Blocken**

Die Schnitte werden nun mit ausreichend Block-Puffer beziehungsweise 5% BSA in PBS (blocking buffer, BB) bedeckt (ca. 100-150 µl pro Schnitt) und für 30 min in einer feuchten Kammer lichtgeschützt und bei Raumtemperatur inkubiert. Als dunkle, feuchte Kammer dient eine Pipettenspitzen-Box, die mit einer Alufolie umwickelt und einem feuchten Filterpapier ausgelegt ist.

Dieser Schritt ist erforderlich, um die Zellwände zu permeabilisieren und für die Antikörperlösungen durchgängig zu machen. Außerdem führt die BSA-Lösung zu einem Abblocken von unspezifischen Proteinen, wodurch eine unerwünschte Bindung der Antikörper an unspezifische Gewebsbestandteile verhindert und eine unklare Hintergrundfärbung somit ausgeschlossen wird.

Die Objektträger werden dann zum Ablaufen der Serum-Lösung schräg gestellt und mit einem Zellstoff abgetupft. Während der Inkubationszeit müssen die entsprechenden Verdünnungen der Primärantikörper in BSA 5% in Eppendorf-Gefäßen hergestellt werden. Alle Primär- und Sekundärantikörper werden vor ihrem Gebrauch in verdünnter

Form 5 min bei 14.000 rpm (4°C) in einer Minizentrifuge zentrifugiert. Die Antikörper sollten immer kurz vor ihrer Verwendung vorbereitet und auf Eis gestellt werden.

- **Inkubation mit dem Primärantikörper**

Nun wird der in BSA (5%) verdünnte primäre Antikörper auf die Präparate aufgebracht (pro Schnitt 100 – 150 µl), wobei das Verdünnungsverhältnis je nach Antikörper differiert, und entweder für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über die Nacht bei 4°C im Kühlraum in der dunklen feuchten Kammer inkubiert. Die Objektträger werden dann aus der Kammer entnommen und in PBS-Tween beziehungsweise PBS (3x 10 min) gewaschen, um den nicht gebundenen Anteil der Antikörperlösung zu entfernen.

In der Zwischenzeit sind die Verdünnungen der sekundären Antikörper in BB herzustellen, wobei ab diesem Schritt im Dunklen gearbeitet werden muss, da die fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper lichtempfindlich sind.

**Tab.3: Liste der verwendeten Primärantikörper**

<i>Primär-Antikörper</i>	<i>Firma</i>	<i>Produktnummer</i>	<i>Immunisiertes Tier</i>
OATP1B1/1B3	ProGen	651140	Maus
OATP1B1	Acris	BM5542	Maus
OATP2A1	Cayman Chemical	160200	Kaninchen
OATP 2B1	Atlas Ab	HPA 020659	Kaninchen
OATP3A1	Acris	ARP43934_P050	Kaninchen
OATP4A1	Santa Cruz	sc-51169	Ziege
OATP5A1	Atlas Ab	HPA 025062	Kaninchen
OATP6A1	Acris	NBP1-37102	Kaninchen
α-Tubulin	Santa Cruz	sc-8035 AC	Maus
CD34	NeoMarkers	MS-363-P0	Maus
CK19	NeoMarkers	MS-394-P	Maus
Vimentin	Abbiotec	251809	Maus
OATP 2A1-blocking peptide	Cayman Chemical	10005388	Kaninchen

- **Inkubation mit dem Sekundärantikörper**

Im folgenden Schritt wird der sekundäre Antikörper auf die Schnitte gegeben; die Arbeitsschritte sind ident mit denen des Erstantikörpers. Die Inkubation kann hier je nach Antikörper 30 min bis 1 Stunde dauern. Wie bereits erwähnt muss der Sekundärantikörper gegen das Immunglobulin des für die Antikörperbildung immunisierten Tieres gerichtet sein. Nach Ende der Inkubationszeit wäscht man die Präparate 2-3x 10 min in PBS-Tween/ PBS.

**Doppelfärbungen:** Für den gleichzeitigen Nachweis von mehreren Antigenen müssen verschiedene Primärantikörper eingesetzt werden. Man spricht hier von einer Mehrfachfärbung, je nachdem wie viele Antikörper verwendet werden.

Bei der Doppelfärbung unterscheidet man 2 Methoden:

die **sequentielle** und die **parallele** Doppelfärbung.

Bei der sequentiellen Methode wird vorher der erste Primärantikörper und anschließend der gegen ihn gerichtete Sekundärantikörper aufgetragen. Dann bringt man wiederum Blockpuffer (BSA 5%) auf die Proben auf, um die restlichen unspezifischen Bindungsstellen, die durch den Erstantikörper nicht besetzt wurden, zu blockieren. Erst dann erfolgt das Auftragen des zweiten Primär- und Sekundärantikörpers.

Bei der zweiten Methode wird parallel gefärbt, das heißt beide Primärantikörper werden gleichzeitig auf die Schnitte aufgetragen. Voraussetzung hierfür ist jedoch, dass die Erstantikörper aus verschiedenen Spezies gewonnen worden sind. Im Anschluss daran erfolgt die Färbung mit den entsprechenden Sekundärantikörpern.

**Tab.4: Liste der verwendeten Sekundärantikörper**

<b>Sekundär-Antikörper</b>	<b>Firma</b>	<b>Gegen Proteine, isoliert aus</b>	<b>Immunisiertes Tier</b>
Alexa Fluor 488	Invitrogen	Ziege	Kaninchen
Alexa Fluor 488	Invitrogen	Ziege	Maus
Alexa Fluor 488	Invitrogen	Affe	Ziege
Alexa Fluor 568	Invitrogen	Ziege	Kaninchen
Alexa Fluor 568	Invitrogen	Ziege	Maus
Alexa Fluor 647	Invitrogen	Ziege	Kaninchen

- **Kernfärbung**

Im Anschluss an die Antikörper-Färbungen wird eine Kernfärbung mittels DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) durchgeführt, um die Zellkerne sichtbar zu machen. DAPI ist ein blauer Fluoreszenzfarbstoff, der sich selektiv an die DNA bindet und Komplexe bildet. Die Schnitte werden nach dem Waschvorgang mit einem Kleenex-Tuch abgetupft und mit DAPI in einer Verdünnung 1:10.000 beziehungsweise 1:100.000 in PBS für 10 min in der feuchten, dunklen Kammer inkubiert. Natürlich muss man auch hier auf den Lichtschutz achten. Nach der Inkubationszeit wäscht man die Schnitte 4x 10 min in PBS-Tween/ PBS und taucht dann die Präparate kurz in Aqua bidest. ein.

- **Eindeckeln mit Mowiol**

Die Standardeinbettung für Immunfluoreszenzpräparate erfolgt mit Mowiol. 1 Tropfen (ca. 15 µl) Mowiol wird auf den Schnitt gegeben und anschließend mit einem Deckgläschen verschlossen. Falls Luftbläschen entstanden sind, müssen diese mithilfe einer Präpariernadel durch vorsichtiges Drücken auf das Deckglas entfernt werden. Das Einbettmedium schützt somit längerfristig vor einem Austrocknen und die Intensität der Fluoreszenzfärbungen bleibt für einen gewissen Zeitraum erhalten. Die Gewebeschnitte können nun zur Auswertung der Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

## **3.2 Fluoreszenzmikroskopie**

### **3.2.1 Prinzip**

Die Fluoreszenzmarker in den zu untersuchenden Präparaten werden durch eine bestimmte Wellenlänge angeregt. Dabei werden die Elektronen des Fluorochroms auf ein höheres Energieniveau angehoben. Die Elektronen können sich aber nicht auf diesem Energieniveau halten, kehren augenblicklich auf ihr Ausgangsenergieniveau zurück und strahlen infolgedessen Licht einer längeren Wellenlänge ab. Das Anregungslicht wird durch das Objektiv zum Untersuchungsmaterial gelenkt und das längerwellige Emissionslicht gelangt dann durch das Okular zum Auge. Mithilfe eines Anregungsfilters am Mikroskop wird die für die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes

nötige Wellenlänge isoliert, während durch einen Reflektor sichergestellt wird, dass nur das abgestrahlte Licht durchgelassen und durch das Okular beobachtet wird.

### **3.2.2 Durchführung der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen**

Die mikroskopischen Untersuchungen erfolgten mit einem Fluoreszenzmikroskop, an dem eine AxioCam Kamera und das Software-Programm AxioVisio Release 4.6.3 (Fa. Zeiss, Oberkochen, Deutschland) angeschlossen waren, in einem abgedunkelten Raum, um eine zusätzliche Ausbleichung zu vermeiden. Für die Auswertung der Immunfluoreszenz hat man Licht bestimmter Wellenlängen eingesetzt; als Lichtquelle diente eine Quecksilberdampflampe.

**Durchführung:** Nach dem Eindeckeln wird der Objektträger am Objektisch in die Halterung eingespannt und mit dem Grobtrieb nach oben gedreht, wobei das Objektiv den Objektträger nicht berühren darf (Glasbruchgefahr). Anschließend wird durch das Okular bei einer 10fachen Vergrößerung geschaut und mittels Feintrieb das Bild scharf gestellt. Dann stellt man durch Drehen des Objektivrevolvers die 40fache Vergrößerung ein. Zuvor befeuchtet man das Deckglas mit einem Tropfen Wasser (Wasserimmersion mit eintauchenden Objektiven). Man taucht das Objektiv in den Tropfen ein und stellt wiederum mittels Feintrieb das Bild scharf. Das Gewebe kann nun durch das Okular betrachtet oder ein Fluoreszenzbild mit der AxioCam Kamera aufgezeichnet werden. Dafür müssen im AxioVisio Programm vor Beginn der Bildaufnahme die Filter und Reflektoren eingestellt werden. Im Dialogfenster der Mikroskop-Einstellungen wählt man zunächst durch Anklicken auf die Leiste "Mehrdimensionale Bildaufnahme" die notwendigen Fluoreszenzfarbstoffe, mit denen die Sekundärantikörper markiert sind, und legt dann die Einstellungen für die Aufnahme der jeweiligen Kanäle fest: Reflektor oder Shutter : "Auf", sowie nach Beendigung der Aufnahme: Reflektor oder Shutter : "Zu". Außerdem versucht man die kürzestmögliche Belichtungszeit für jeden einzelnen Kanal zu wählen, um die Präparate einer möglichst geringen Lichtbelastung auszusetzen. Der nächste Schritt ist nun die Bildaufnahme. Zunächst öffnet man die Blende der Kamera und stellt das Bild der Liveaufnahme nochmals scharf, da die AxioCam Kamera einen anderen Fokus aufweist. Das AxioVisio-Programm erfasst dann alle Kanäle der Reihe nach und fügt die Aufnahmen zu einem Gesamtfarbbild

zusammen. Zum Schluss kann die Aufnahme in ein Bildformat (JPEG, TIFF oder BMP) umgewandelt werden und steht nun für die Auswertung zur Verfügung.

### **3.3 Immunhistochemie**

#### **3.3.1 Prinzip**

Bei immunhistochemischen Verfahren werden die Antikörper statt mit Fluoreszenzfarbstoffen (Immunfluoreszenz) mit Enzymen markiert, die dann eine Farbreaktion katalysieren. Analog zu den Immunfluoreszenzfärbemethoden wird auch hier zwischen direkten und indirekten Verfahren unterschieden, wobei auch hier der indirekten Methode aufgrund ihrer höheren Sensitivität der Vorzug gegeben wird. Das an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzym kann mithilfe eines Substrates histochemisch sichtbar gemacht werden. Üblicherweise dient als Markerenzym die Horse Radisch Peroxidase (HRP, Meerrettichperoxidase), die nach Zugabe eines Substrates, einem Chromogen (3,3'-Diaminobenzidin), über die Bildung eines farbigen Endproduktes nachgewiesen wird.

#### **3.3.2 Vorbereitung**

Für die immunhistochemischen Färbungen müssen analog zu den Immunfluoreszenzfärbungen die im Kapitel Immunfluoreszenz bereits erwähnten Lösungen hergestellt werden: **PBS, PBS-Tween 0,1 %, BSA 10 %, Xylol-Ethanol-Reihe** sowie **Citratpuffer** und **Mowiol**.

Zusätzlich zu diesen Lösungen muss eine **3%ige Wasserstoffperoxid-Lösung in Methanol** zubereitet werden.

#### **3.3.3 Durchführung der Immunhistochemiefärbung an formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeschnitten**

Die Paraffinschnitte werden für eine Stunde im Brutschrank (60°C) getrocknet und 3x in Xylol inkubiert. Die entparaffinisierten Gewebepräparate stellt man dann für 10 min in eine Küvette mit 3%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung in Methanol zur Blockierung der physiologisch im Gewebe vorkommenden endogenen Peroxidase. Die Schnitte werden wiederum in der

absteigenden Ethanol-Reihe für jeweils 2 min rehydratisiert und in PBS gewaschen. Der Farblauf ist grundsätzlich identisch mit dem der bereits erklärten Immunfluoreszenzfärbung. Nach einer Antigendemaskierung mit Citratpuffer erfolgt eine Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen mit 10%igem BSA. Daraufhin trägt man den primären Antikörper auf und inkubiert über die Nacht. Dem Waschvorgang mit PBS-Tween/PBS folgt das Aufbringen des enzymmarkierten (HRP), hydrophilen Polymers, an welches die Zweitantikörper konjugiert wurden. Nach dem Spülen in PBS (2x 5min) trägt man das Substrat DAB-Chromogen für 4 min auf und wäscht die Schnitte anschließend 2x 5min in destilliertem Wasser. Zum Schluss wird eine Kernfärbung mit Hämatoxylin (5 min Inkubationszeit) durchgeführt. Die Objektträger werden in Aqua bidest. eingetaucht und in Mowiol eingebettet. Die Präparate können nun unter dem Mikroskop betrachtet werden.

## 4 ERGEBNISSE

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde das Expressionsmuster von den Transportern aus der Familie der Organischen Anionen-transportierenden Polypeptide (OATPs) untersucht. **OATP1B1** (OATP-C), **OATP1B3** (OATP-8), **OATP2A1** (PGT), **OATP2B1** (OATP-B), **OATP3A1** (OATP-D), **OATP4A1** (OATP-E), **OATP5A1** (OATP-J) und **OATP6A1** (OATP-I), sowie verschiedene Biomarker (CK19, CD34 oder Vimentin) wurden auf Proteinebene mittels indirekter Immunfluoreszenz an Ovarialschnitten von Patientinnen mit Ovarialkarzinom bestimmt. Zusätzlich erfolgte ein Nachweis der OATPs an Ovarialkarzinomschnitten mittels Immunhistochemie. Die Studien wurden im Rahmen des von der EC geförderten OVCAD Projektes durchgeführt.

### 4.1 *Nachweis der OATPs mittels Immunfluoreszenz*

Die oben genannten OATPs wurden, wie schon im Kapitel Material und Methoden erwähnt, mithilfe spezifischer Antikörper in der Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Die Gewebsschnitte wurden zunächst mit einem Primärantikörper inkubiert, der gegen das bestimmte Antigen gerichtet ist. Anschließend erfolgte die Kopplung des Erstantikörpers mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper, der spezifisch am primären Antikörper bindet. Die Schnitte wurden dann im Fluoreszenzmikroskop betrachtet, wobei ausgewählte Stellen auf den Schnitten über die mit dem Zeiss-Mikroskop gekoppelten AxioCam-Kamera aufgenommen wurden.

Damit eine bessere Identifizierung der Lokalisation der transmembranären Aufnahmetransporter im Gewebe in bestimmten Zellen und subzellulären Strukturen möglich wird, wurden zusätzlich Antikörper gegen bestimmte Zellstrukturen eingesetzt. Hierbei wurden Primärantikörper gegen CK19, CD34,  $\alpha$ -Tubulin sowie Vimentin ausgewählt, die jedoch nicht aus demselben Wirt wie der auf die OATPs gerichteten Erstantikörper stammen durften, damit eine Kreuzreaktion ausgeschlossen wird.

Die Markierung der Epithelzellen im Ovar erfolgt über **Zytokeratin 19**, das als Intermediärfilament ein wichtiger Bestandteil des Zytoskeletts ist. Epitheliale

Ovarialtumoren scheinen ein verändertes Zytokeratin-Expressionsmuster aufzuweisen, daher stellen Zytokeratine stabil exprimierte Merkmale in Tumorzellen dar. Der Marker CK19 ist charakteristisch für epitheliale Zellen nicht nur in den Ovarien, sondern auch in der Leber und findet sich zum Beispiel in Gallengangszellen.

**Vimentin** gehört ebenso zur Gruppe der Intermediärfilamente, das im Zytoplasma von Mesenchymzellen vorkommt. Meist findet sich eine Koexpression von Vimentin und Cytokeratin bei epithelialen Läsionen, die eine Umwandlung in Zellen mesenchymaler Struktur durchmachen. Dies erfolgt in fortgeschrittenen Tumoren, wie zum Beispiel in endometroiden Tumoren, die eine Unterform des Ovarialkarzinoms darstellen. Dabei ist eine Anwendung des Vimentin-Antikörpers in Kombination mit anderen Markern wie dem CK19 sinnvoll. Vimentin ist ein wichtiger Marker für die Diagnose von malignen Tumoren auch bei anderen Geweben.

Als Gefäßmarker wird **CD34 (CD“Cluster Of Differentiation“)** verwendet. Die Gefäßendothelien werden mithilfe des Oberflächenproteins CD34 angefärbt. Die Tumoren sind in der Regel gut vaskularisiert. Anhand von CD34 kann dadurch die Vaskularisierung beurteilt werden.

Weiters wurde noch  **$\alpha$ -Tubulin** bestimmt, das sich in allen Zellen befindet. Es ist am Aufbau der Mikrotubuli beteiligt, das ein Bestandteil des Zytoskeletts der Zelle darstellt. Gemeinsam mit  $\beta$ -Tubulin bildet  $\alpha$ -Tubulin Dimere, die sich zu kettenartigen Protofilamenten anlagern. Somit spielt  $\alpha$ -Tubulin eine wichtige Rolle in Zellteilungsvorgängen, Substanztransport, Endozytose und anderen zellulären Vorgängen.

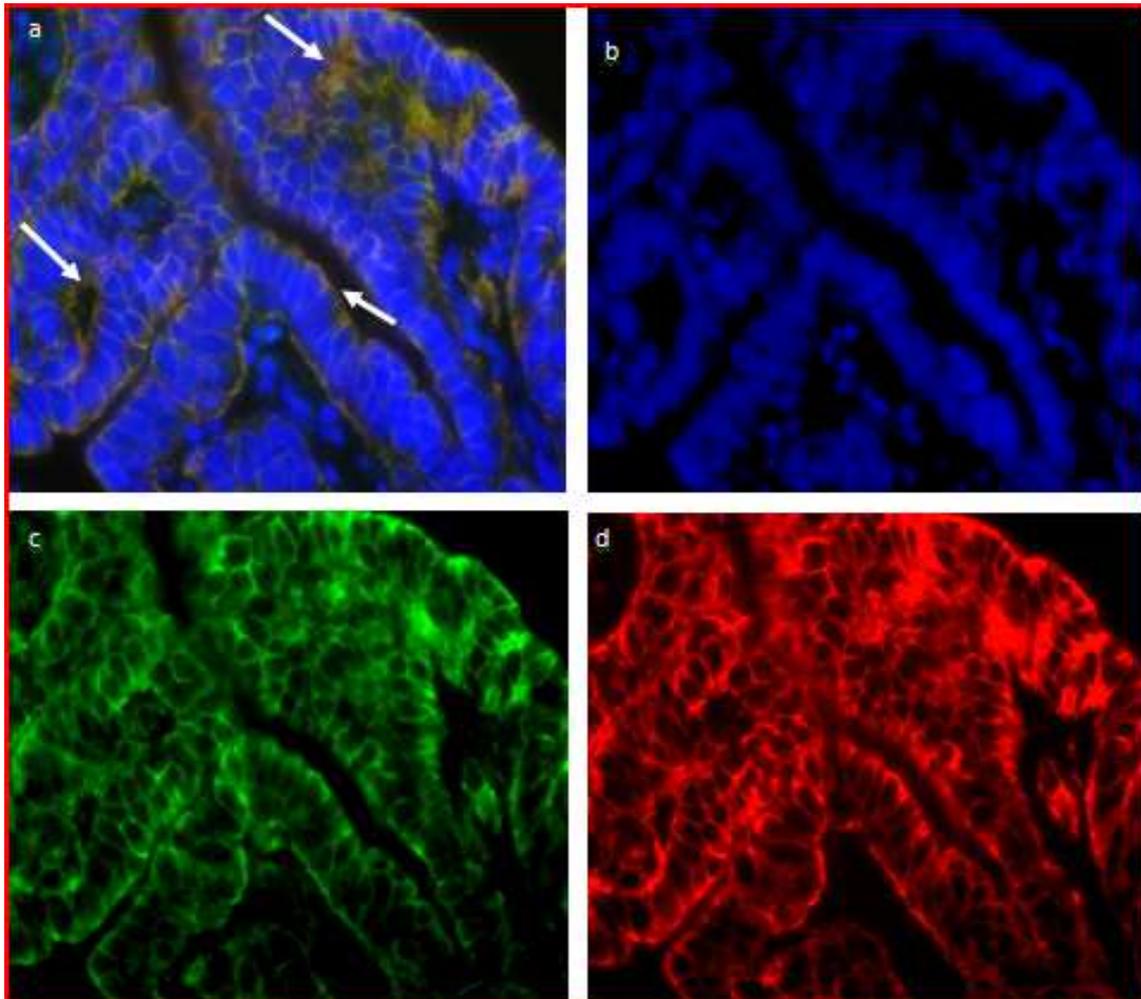
Die oben erwähnten Biomarker wurden mittels Alexa Fluor 568 (Texas Red) gekoppelten Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist, nachgewiesen. In der gefilterten Bildaufnahme tritt die Fluoreszenz als rotes Leuchten hervor.

Die Zellkerne wurden mit dem blau fluoreszierenden DNA-Farbstoff DAPI angefärbt. Die Ergebnisse wurden anschließend durch das Zeiss-Fluoreszenzmikroskop dokumentiert. Alle vorliegenden Abbildungen wurden mit der AxioCam-Digitalkamera aufgenommen, wobei die Messungen im FITC-, TexasRed- und DAPI-Kanal durchgeführt wurden. Den Fluorochromen wurden dabei folgende Farben zugeordnet: rot (Alexa Fluor 568), grün (Alexa Fluor 488), türkisblau (Alexa Fluor 647) und blau (Dapi-Kernfärbung).

#### **4.1.1 Nachweis von OATP 1B1/1B3 in Ovarialkarzinomschnitten**

In Abbildung 1 wurde eine Immunfluoreszenzfärbung an einem Paraffinschnitt von einem Ovarialkarzinomgewebe untersucht. Gezeigt ist die Doppelfärbung von OATP1B1/1B3 (der Antikörper erkennt beide Proteine) und CK 19 in 40-facher Vergrößerung. Die Ergebnisse wurden sowohl als Übereinanderlagerung aller beteiligten Fluoreszenzfarben als auch zusätzlich als Einzelbilder dargestellt.

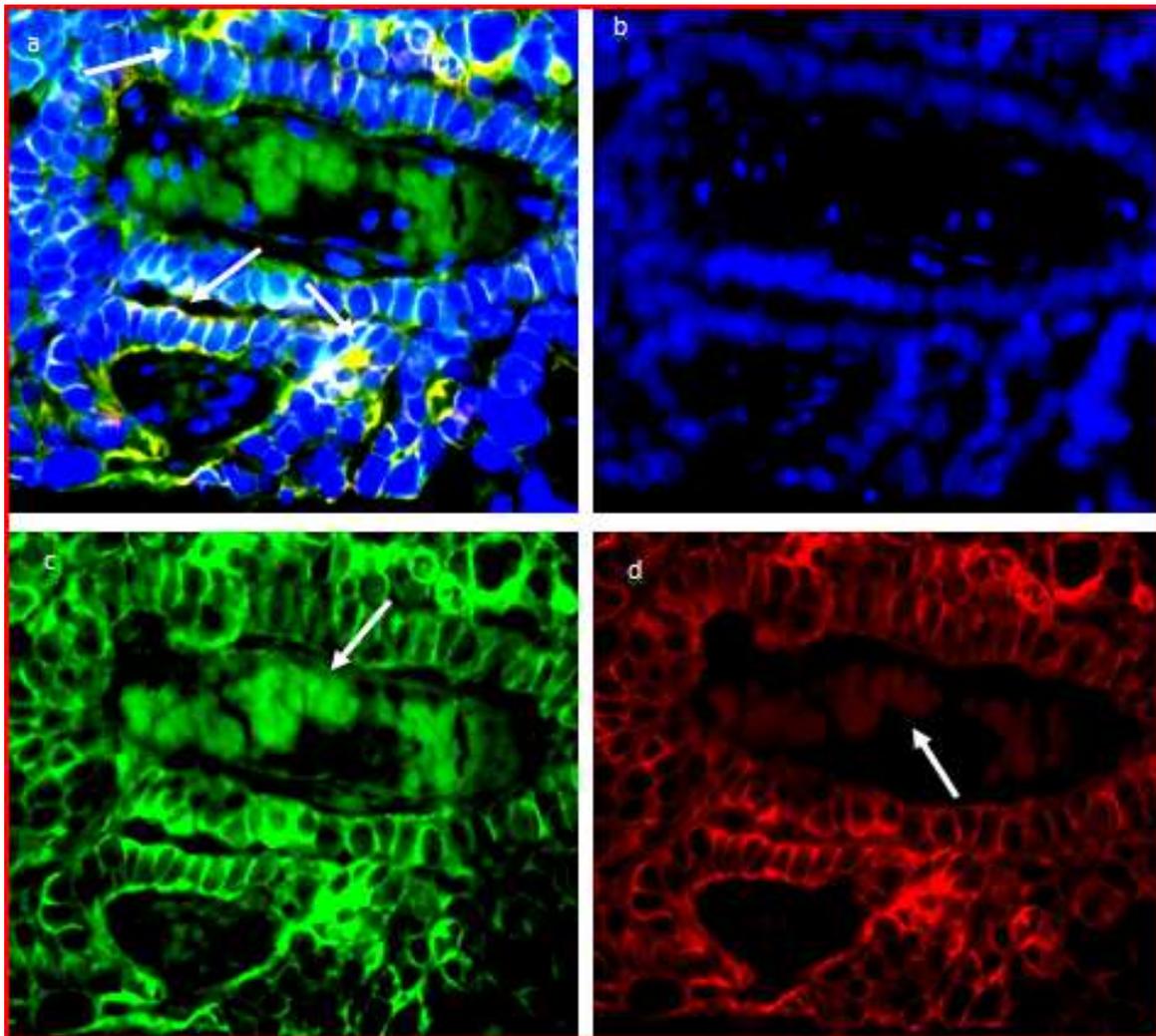
Der Primärantikörper, der gegen das OATP 1B1/1B3-Transportprotein gerichtet ist, wurde in einer Verdünnung von 1:50 aufgetragen, da mit dieser Verdünnung die besten Ergebnisse erzielt werden konnten, währenddessen das unverdünnte Auftragen des Antikörpers laut Vorschrift des Herstellers zu einer unspezifischen Hintergrundfärbung führte und daher nicht zu empfehlen ist. Die CK19 positiven Epithelzellen sind rot dargestellt, während OATP 1B1/1B3 im grünen Kanal sichtbar ist. Bei der Überlappung der beiden Kanäle kommt es zu einer Überlagerung der Fluoreszenzsignale. Besonders um den Zellkern herum, der mittels DAPI in den Aufnahmen als blauer Fluoreszenzsignal zu sehen ist, entsteht eine gelborange Mischfarbe (Pfeile), die auf das Vorliegen von OATP 1B1/1B3 in den CK19 positiven epithelialen Zellen hinweist.



**Abb. 1: Nachweis von OATP 1B1/1B3 (grüne Färbung) und CK19 (rote Färbung) mittels Doppelimmunfluoreszenz im Ovarialgewebe. (Anwendung eines OATP 1B1/1B3 Maus-Antikörpers und eines Alexa Fluor 488-gekoppelten Zweitantikörpers sowie eines CK 19 Antikörpers und eines Alexa Fluor 568-gekoppelten Sekundäntikörpers), 40x Vergrößerung**  
 a) Überlagerung: OATP 1B1/1B3 mit CK19, Pfeile zeigen eine Überlagerung von CK 19 mit dem OATP 1B1/1B3 in Zellen mit epithelialem Charakter; b) Blau: Zellkerne; c) Grün: OATP 1B1/1B3; d) Rot: CK 19

Die Abbildungen 2 und 3 stellen weitere Detailaufnahmen aus demselben Präparat wie Abbildung 1 dar. In Abbildung 2 sind Erythrozyten zu erkennen, die sowohl im grünen, als auch im roten Kanal fluoreszieren. Die Erythrozyten liegen in einem Follikel. Die Belichtungszeiten lagen bei etwa 800 ms für Alexa Fluor 488, 900 ms für Alexa Fluor 568 und 5 ms für DAPI. Für den Primäntikörper, der gegen CK 19 gerichtet ist, wurde bei allen Immunfluoreszenzfärbungen eine einheitliche Verdünnungskonzentration von

1:500 verwendet, der DNA-Farbstoff DAPI dagegen in einer Verdünnung 1:10 000 aufgetragen. Auch hier ist die intensive Gelbfärbung (a) deutlich zu erkennen, die auf das Vorhandensein des OATP 1B1/1B3 in den Zellen mit epithelialelem Charakter hinweist.



**Abb. 2: Nachweis von OATP 1B1/1B3 (grüne Färbung) und CK19 (rote Färbung) mittels Doppelimmunfluoreszenz im Ovarialgewebe. (Anwendung eines OATP 1B1/1B3 Maus-Antikörpers und eines Alexa Fluor 488-gekoppelten Zweitantikörpers sowie eines CK 19 Antikörpers und eines Alexa Fluor 568-gekoppelten Sekundärantikörpers), 40x Vergrößerung**

a) Überlagerung: OATP 1B1/1B3 mit CK19, Pfeile zeigen eine Überlagerung von CK 19 mit dem OATP 1B1/1B3; b) Blau: Zellkerne; c) Grün: OATP 1B1/1B3, Pfeile stellen die Erythrozyten im grünen Kanal dar; d) Rot: CK 19, Pfeile stellen die Erythrozyten im roten Kanal dar; in c und d sind Erythrozyten mit einem Pfeil markiert

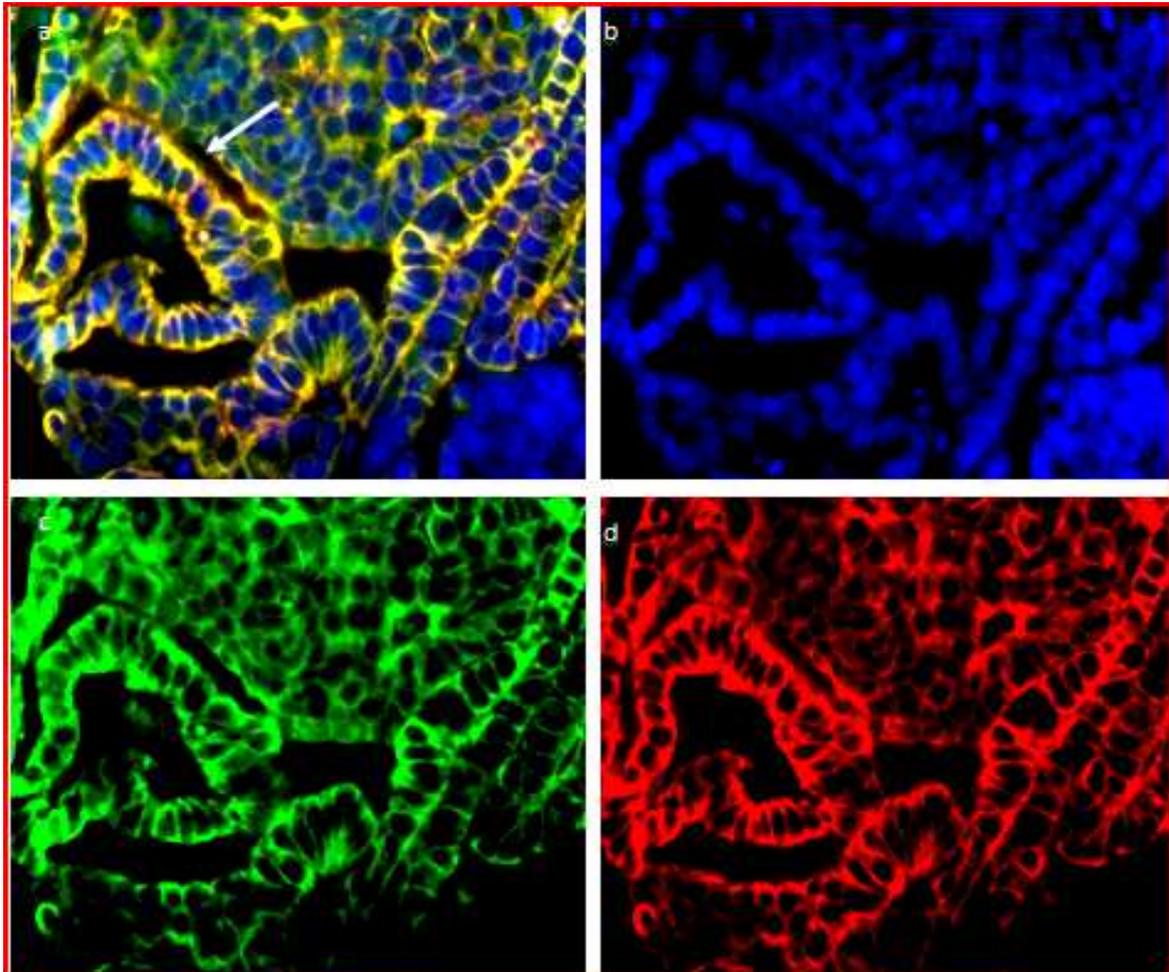


Abb. 3: Nachweis von OATP 1B1/1B3 (grüne Färbung) und CK19 (rote Färbung) mittels Doppelimmunfluoreszenz im Ovarialgewebe. (Anwendung eines OATP 1B1/1B3 Maus-Antikörpers und eines Alexa Fluor 488-gekoppelten Zweitantikörpers sowie eines CK 19 Antikörpers und eines Alexa Fluor 568-gekoppelten Sekundärantikörpers), 40x Vergrößerung

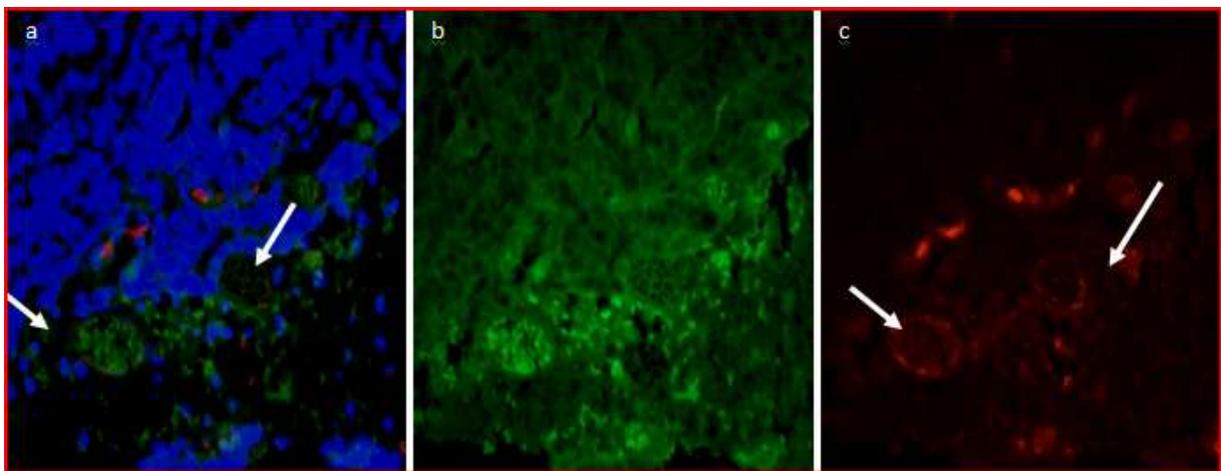
a) Überlagerung: OATP 1B1/1B3 mit CK19, Pfeile zeigen eine Überlagerung von CK 19 mit dem OATP 1B1/1B3; b) Blau: Zellkerne; c) Grün: OATP 1B1/1B3; d) Rot: CK 19

#### 4.1.2 Nachweis von OATP 2A1 in Ovarialkarzinomschnitten

Es wurden verschiedenste Verdünnungen mit dem polyklonalen aus Kaninchenserum gewonnenen Primärantikörper, der gegen den Prostaglandintransporter (OATP 2A1) gerichtet ist, ausprobiert, wobei die optimale Verdünnung 1:1000 betrug.

In Abbildung 4 wird eine Doppelfärbung zur Sichtbarmachung von OATP 2A1 und CD34 in einem Ovarialkarzinomgewebeschnitt in einer 40fachen Vergrößerung dargestellt.

Dabei ist die Expression von OATP 2A1 durch eine Grünfärbung und die von CD34 durch eine Rotfärbung zu erkennen. Den Primärantikörper gegen OATP 2A1 hat man 1:100 verdünnt. Die zu geringe Verdünnung des Erstantikörpers hat deshalb zu unspezifischen Reaktionen geführt wie aus der Abbildung zu erkennen ist. Mit CD 34 wurden die Gefäße markiert, wobei wiederum die Erythrozyten durch ihre rote Fluoreszenz (Abb c) in Erscheinung treten. Erythrozyten stören in der Immunfluoreszenzmikroskopie, da sie sowohl im grünen als auch im roten Kanal fluoreszieren. Die einheitliche Verdünnung für den Gefäßmarker CD 34 betrug 1:50.



**Abb. 4: Nachweis von OATP 2A1 (grüne Färbung) und CD34 (rote Färbung) mittels Doppelimmunfluoreszenz im Ovarialgewebe. (Anwendung eines OATP 2A1 Kaninchen-Antikörpers und eines Alexa Fluor 488-gekoppelten Zweitantikörpers sowie eines CD 34 Antikörpers und eines Alexa Fluor 568-gekoppelten Sekundärantikörpers), 40x Vergrößerung**  
a) Überlagerung: OATP 2A1 mit CD 34, Pfeile zeigen die rot markierten Gefäße mit den grün fluoreszierenden Erythrozyten an; b) Grün: OATP 2A1; c) Rot: CD 34, Pfeile zeigen die rot markierten Gefäße mit den rot fluoreszierenden Erythrozyten an.

Bei der Überlagerung von CD34 mit OATP 2A1 zeigt sich eine leicht gelb-orange Färbung, die auf die Expression des Transportproteins im Bereich des Gefäßendothels hindeutet. Die Abbildung 5 zeigt ein Übersichtsbild (zwei Präparatausschnitte), in dem die rot markierten Gefäße deutlich zu erkennen sind. Diese Aufnahmen wurden mittels dem TissueFacs Gerät in einer 10 fachen Vergrößerung dokumentiert. Wieder wurde CD34 als ein spezifischer Gefäßmarker für die Immunfluoreszenzfärbungen gewählt.

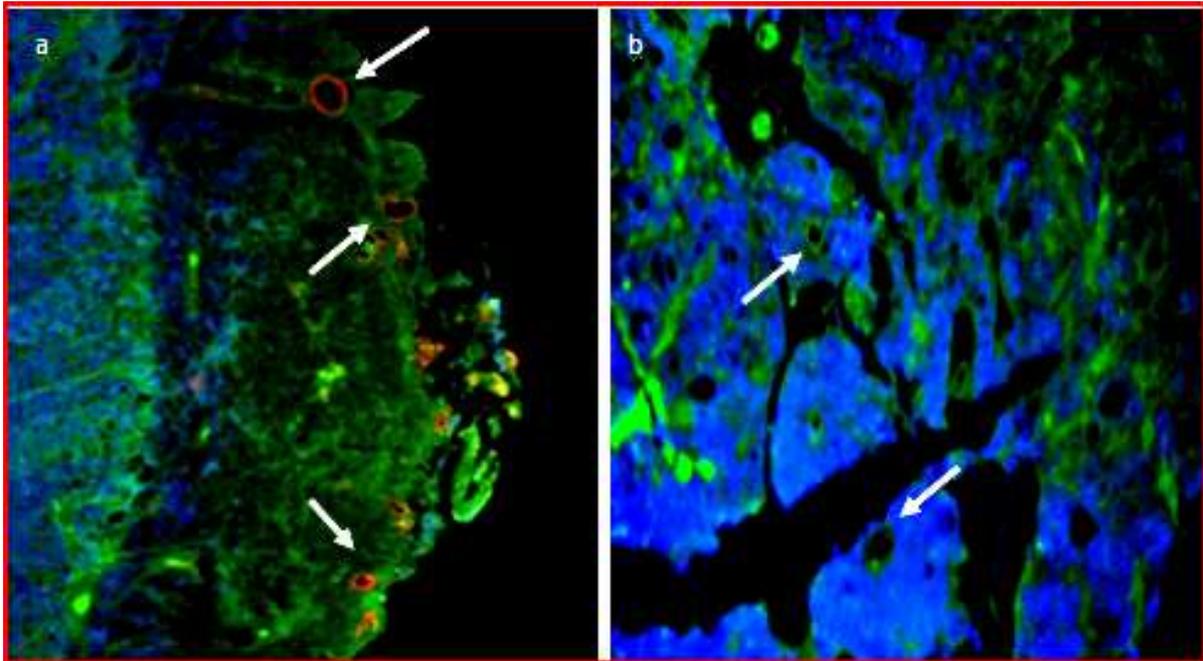


Abb. 5: Nachweis von OATP 2A1 (grüne Färbung) und CD34 (rote Färbung) mittels Doppelimmunfluoreszenz im Ovarialgewebe. (Anwendung eines OATP 2A1 Kaninchen-Antikörpers und eines Alexa Fluor 488-gekoppelten Zweitantikörpers sowie eines CD 34 Antikörpers und eines Alexa Fluor 568-gekoppelten Sekundärantikörpers)

- a) Präparat 1: OATP 2A1 mit CD 34, Pfeile zeigen die rot markierten Gefäße an  
 b) Präparat 2: OATP 2A1 mit CD 34, Blaufärbung der Kerne, Pfeile zeigen die rot markierten Gefäße

Der Prostaglandin-Transporter (Verdünnung 1:1000) wird auch in Abbildung 6 gezeigt.

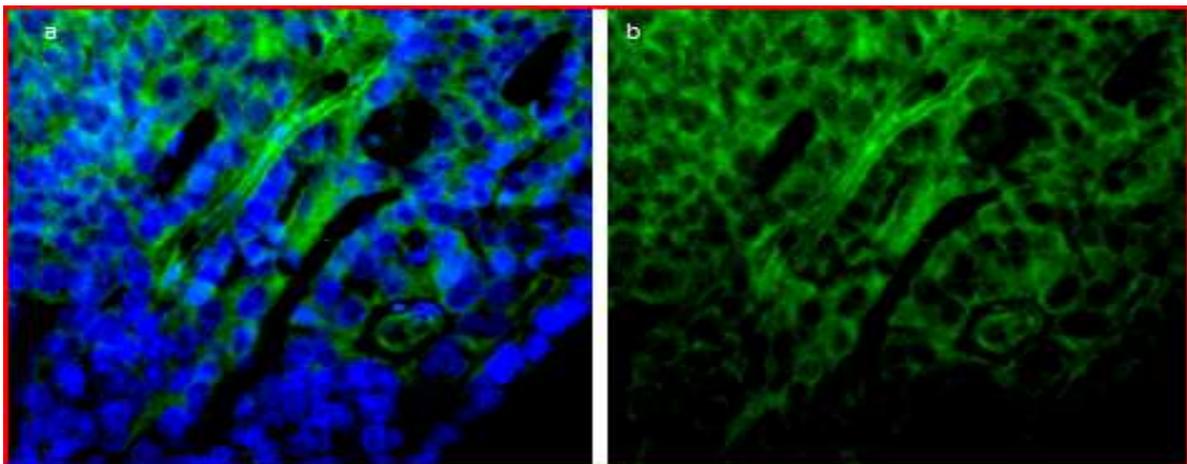
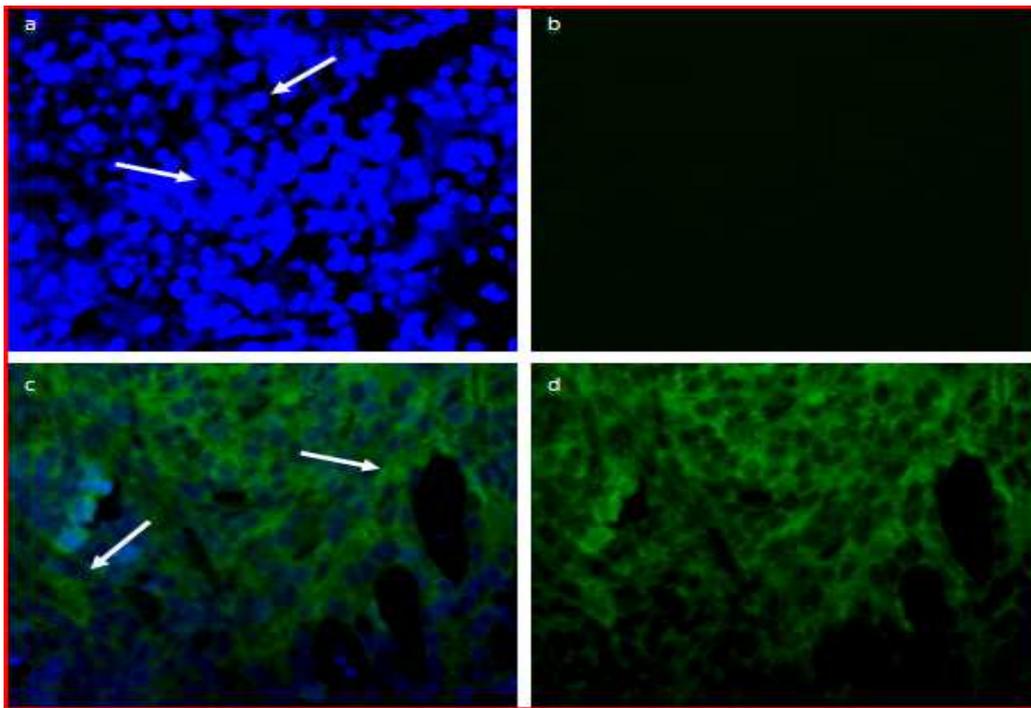


Abb. 6: Nachweis von OATP 2A1 (grüne Färbung) mittels Immunfluoreszenz im Ovarialgewebe. (Anwendung eines OATP 2A1 Kaninchen-Antikörpers und eines Alexa Fluor 488-gekoppelten Zweitantikörpers), 40x Vergrößerung

- a) Grün: OATP 2A1, Blau: Zellkerne; b) Grün: OATP 2A1

Um die Spezifität des polyklonalen, aus Kaninchenserum gewonnenen Primärantikörpers gegen OATP 2A1 nachzuweisen, wurde dieser Erstantikörper in Gegenwart des eines „*Prostaglandin Transporter Blocking Peptides*“ (Verhältnis 1:1) untersucht. Durch das Blocking Peptide sollen Bindestellen des primären Antikörpers besetzt werden und dann kann der Sekundärantikörper nicht mehr daran binden. Es kommt daher zu keiner Fluoreszenzreaktion. Wie auch in Abbildung 7 zu sehen ist, erscheint die Bildaufnahme im grünen Kanal in der Negativkontrolle (b) erwartungsgemäß schwarz, während in der Positivkontrolle (c,d) der OATP 2A1 Nachweis im grünen Kanal sichtbar ist. Das Ausbleiben einer positiven Reaktion ist nicht auf die Abwesenheit des Antigens – in diesem Falle des Prostaglandin-Transporters – sondern durch Zugabe des Blocking Peptides bedingt. Die Zellkernfärbung erfolgte wiederum mittels DAPI (blau).

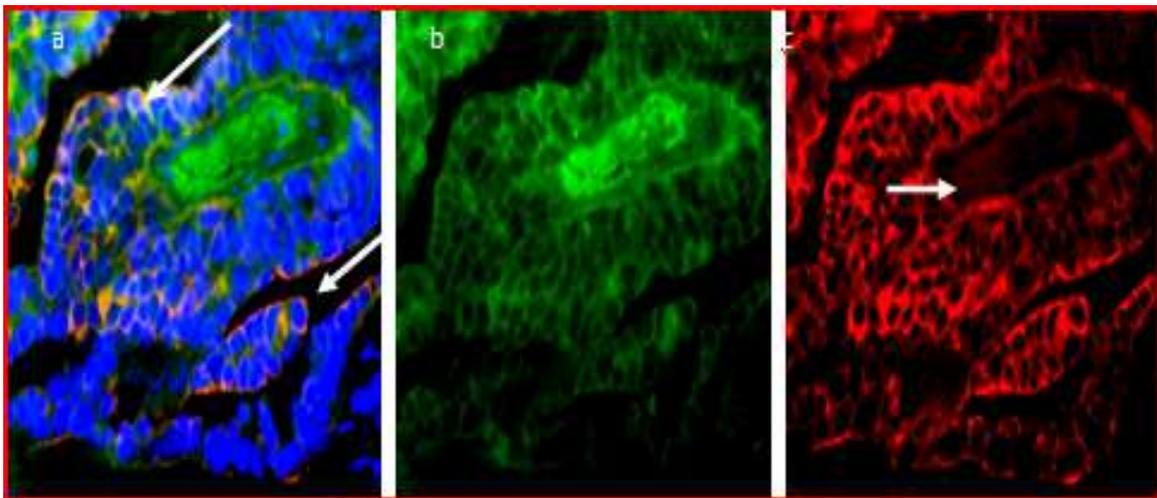


**Abb. 7: Immunfluoreszenznachweis von OATP 2A1 plus Prostaglandin-Transporter Blocking Peptide im Ovarialgewebe. (Anwendung eines OATP 2A1 Kaninchen-Antikörpers plus Prostaglandin-Transporter Blocking Peptide und eines Alexa Fluor 488-gekoppelten Zweitantikörpers)**

**a) Negativkontrolle: Pfeile: zeigen nur die blauen Zellkerne; b) Negativkontrolle: kein Fluoreszenznachweis; c) Positivkontrolle: Pfeile zeigen den OATP 2A1-Nachweis (grün) und die blauen Zellekerne; d)Positivkontrolle: zeigen den OATP-2A1-Nachweis im grünen Kanal**

### 4.1.3 Nachweis von OATP 2B1 in Ovarialkarzinomschnitten

In Abbildung 8 sieht man eine Doppelfärbung von OATP 2B1 und CK 19 mittels spezifischer Antikörper in der Immunfluoreszenz Mikroskopie. Für den anti-OATP 2B1 – Antikörper wurde eine Verdünnung von 1:100 verwendet. CK19 wurde 1:500 verdünnt. Nekrotisiertes Gewebe, wie in Abb. a und b deutlich zu sehen ist, kann unspezifische Hintergrundreaktionen geben. Die Zellkerne sind mit DAPI blaugefärbt. Zu erwähnen ist noch, dass eine längere Belichtungszeit erforderlich war, um handfeste Bildaufnahmen dokumentieren zu können, dies lag jedoch an der Quecksilberdampflampe des Fluoreszenzmikroskops, die sehr empfindlich ist und eine ziemlich kurze Lebensdauer hat. Es ist hier die Rede von Belichtungszeiten von 2000 ms für FITC, 1500 ms für Texas Red und 30 ms für DAPI. Die Überlagerung von CK19 mit OATP 2B1 ergibt in der Fluoreszenzfärbung ein gelb-oranges Expressionssignal, was wiederum zeigt, dass OATP 2B1 in den CK19-exprimierenden Zellen mit epithelialelem Charakter vorkommt.



**Abb.8: Nachweis von OATP 2B1 (grüne Färbung) und CK19 (rote Färbung) mittels Doppelimmunfluoreszenz im Ovarialgewebe. (Anwendung eines OATP 2B1 Kaninchen-Antikörpers und eines AlexaFluor 488-gekoppelten Zweitantikörpers sowie eines CK19 Antikörpers und eines AlexaFluor 568-gekoppelten Sekundärantikörpers); 40x Vergrößerung**  
a) Überlagerung: OATP 2B1 mit CK 19, Pfeile zeigen eine Überlagerung von CK 19 mit dem OATP 2B1 an; b) Grün: OATP 2B1; c) Rot: CK 19

#### 4.1.4 Nachweis von OATP 3A1 in Ovarialkarzinomschnitten

In den Abbildungen 9 und 10 sind die Doppelfärbungen von OATP 3A1 und CK19 in Ovarialkarzinomen einer 40fachen Vergrößerung dargestellt. Der Antikörper, der gegen OATP 3A1 gerichtet ist, wurde in einer Verdünnung 1:5 eingesetzt. Die Überlagerung von CK19 mit OATP 3A1 zeigt eine deutliche Gelbfärbung, was auf das Vorkommen von OATP 3A1 in den Epithelzellen hinweist. Die Zellkerne sind mit DAPI gegengefärbt.

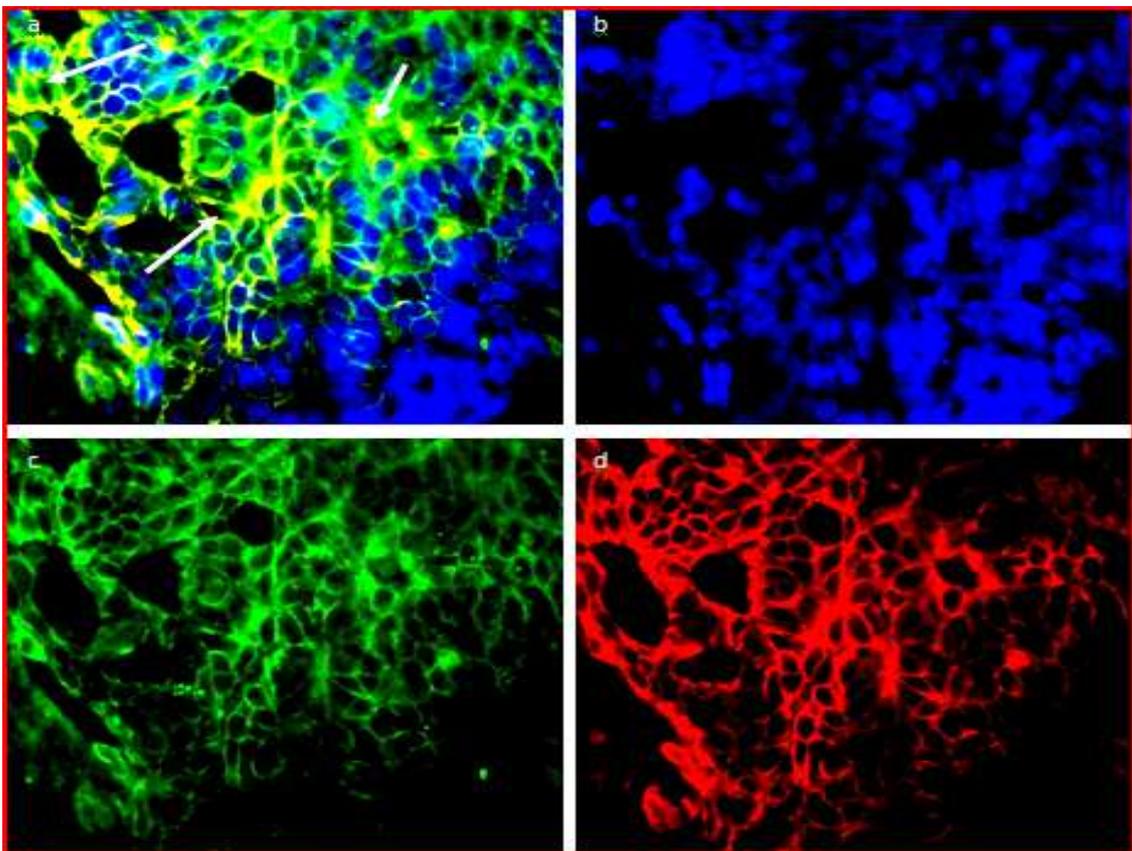


Abb. 9: Nachweis von OATP 3A1 (grüne Färbung) und CK19 (rote Färbung) mittels Doppelimmunfluoreszenz im Ovarialgewebe. (Anwendung eines OATP 3A1 Ziegen-Antikörpers und eines Alexa Fluor 488-gekoppelten Zweitantikörpers sowie eines CK19 Maus-Antikörpers und eines Alexa Fluor 568-gekoppelten Sekundärantikörpers); 40x Vergrößerung

a) Überlagerung: OATP 3A1 mit CK19, Pfeile zeigen eine Überlagerung von CK 19 mit dem OATP 3A1 in Zellen mit epithelialem Charakter; b) Blau: Zellkerne; c) Grün: OATP 3A1; d) Rot: CK 19

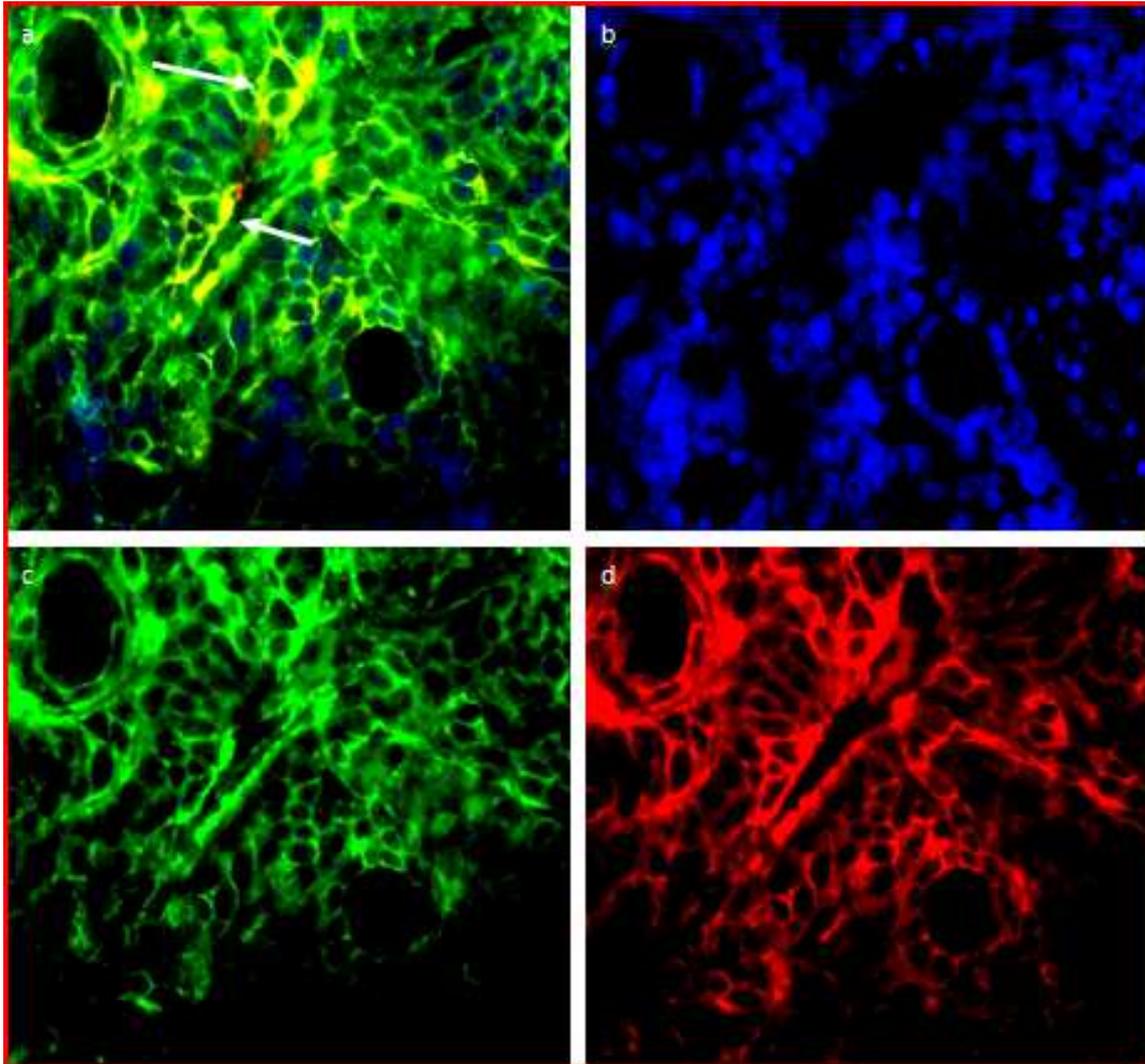


Abb. 10: Nachweis von OATP 3A1 (grüne Färbung) und CK19 (rote Färbung) mittels Doppelimmunfluoreszenz im Ovarialgewebe. (Anwendung eines OATP 3A1 Ziegen-Antikörpers und eines Alexa Fluor 488-gekoppelten Zweitantikörpers sowie eines CK19 Maus-Antikörpers und eines Alexa Fluor 568-gekoppelten Sekundärantikörpers); 40x Vergrößerung  
 a) Überlagerung: OATP 3A1 mit CK19, Pfeile zeigen eine Überlagerung von CK 19 mit dem OATP 3A1 in Zellen mit epithelialem Charakter; b) Blau: Zellkerne; c) Grün: OATP 3A1; d) Rot: CK 19

#### 4.1.5 Nachweis von OATP 4A1 in Ovarialkarzinomschnitten

Die Abbildungen 11 und 12 stellen eine Doppelfärbung von OATP 4A1 und CK19 in einem Ovarialkarzinom, das eine weitgehende Dedifferenzierung aufweist, in 40facher Vergrößerung dar. Der Primärantikörper gegen OATP 4A1 wurde in einer Verdünnung 1:20 aufgetragen. Die deutliche Gelbfärbung (a) deutet wieder auf das Vorkommen von OATP 4A1 in den epithelialen Ovarialkarzinomzellen hin.

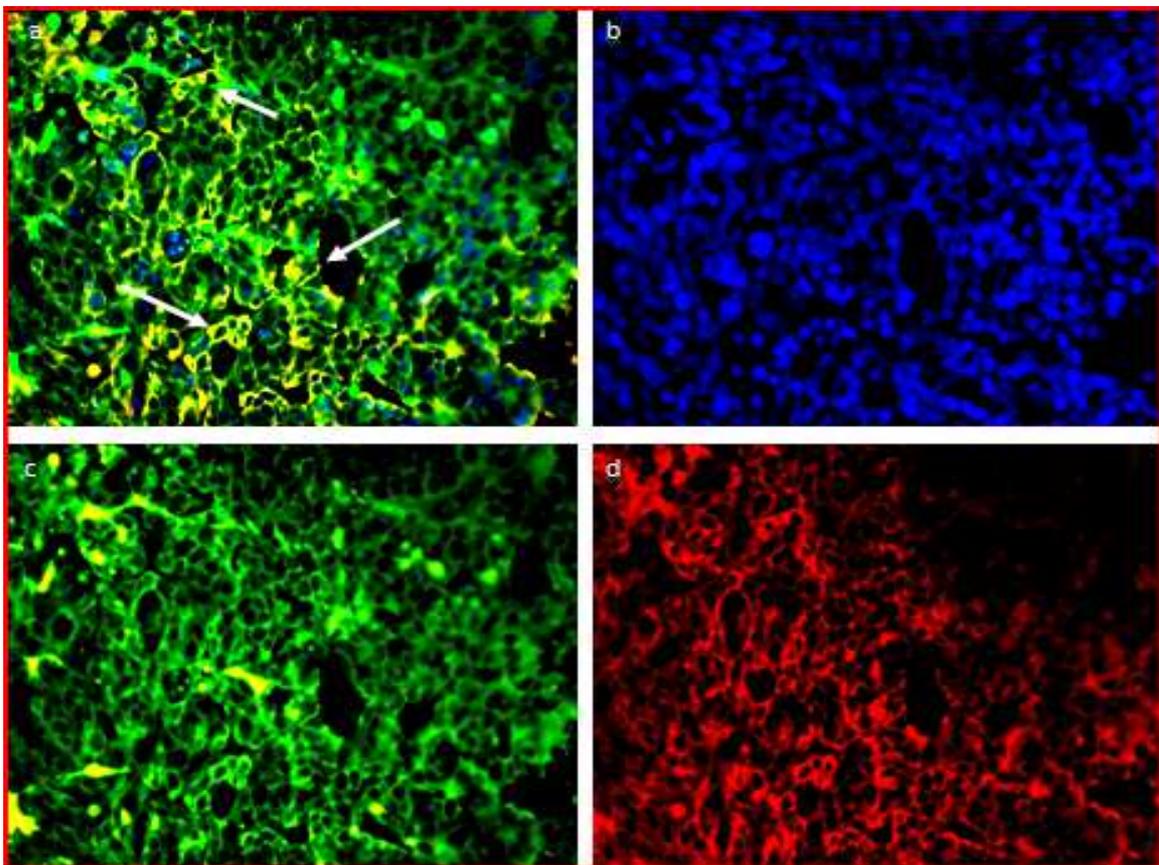


Abb. 11: Nachweis von OATP 4A1 (grüne Färbung) und CK19 (rote Färbung) mittels Doppelimmunfluoreszenz im Ovarialgewebe. (Anwendung eines OATP 4A1 Ziegen-Antikörpers und eines Alexa Fluor 488-gekoppelten Zweitantikörpers sowie eines CK19 Maus-Antikörpers und eines Alexa Fluor 568-gekoppelten Sekundärantikörpers); 40x Vergrößerung  
a) Überlagerung: OATP 4A1 mit CK19, Pfeile zeigen eine Überlagerung von CK 19 mit dem OATP 4A1 in Zellen mit epitheliale Charakter; b) Blau: Zellkerne; c) Grün: OATP 3A1; d) Rot: CK 19

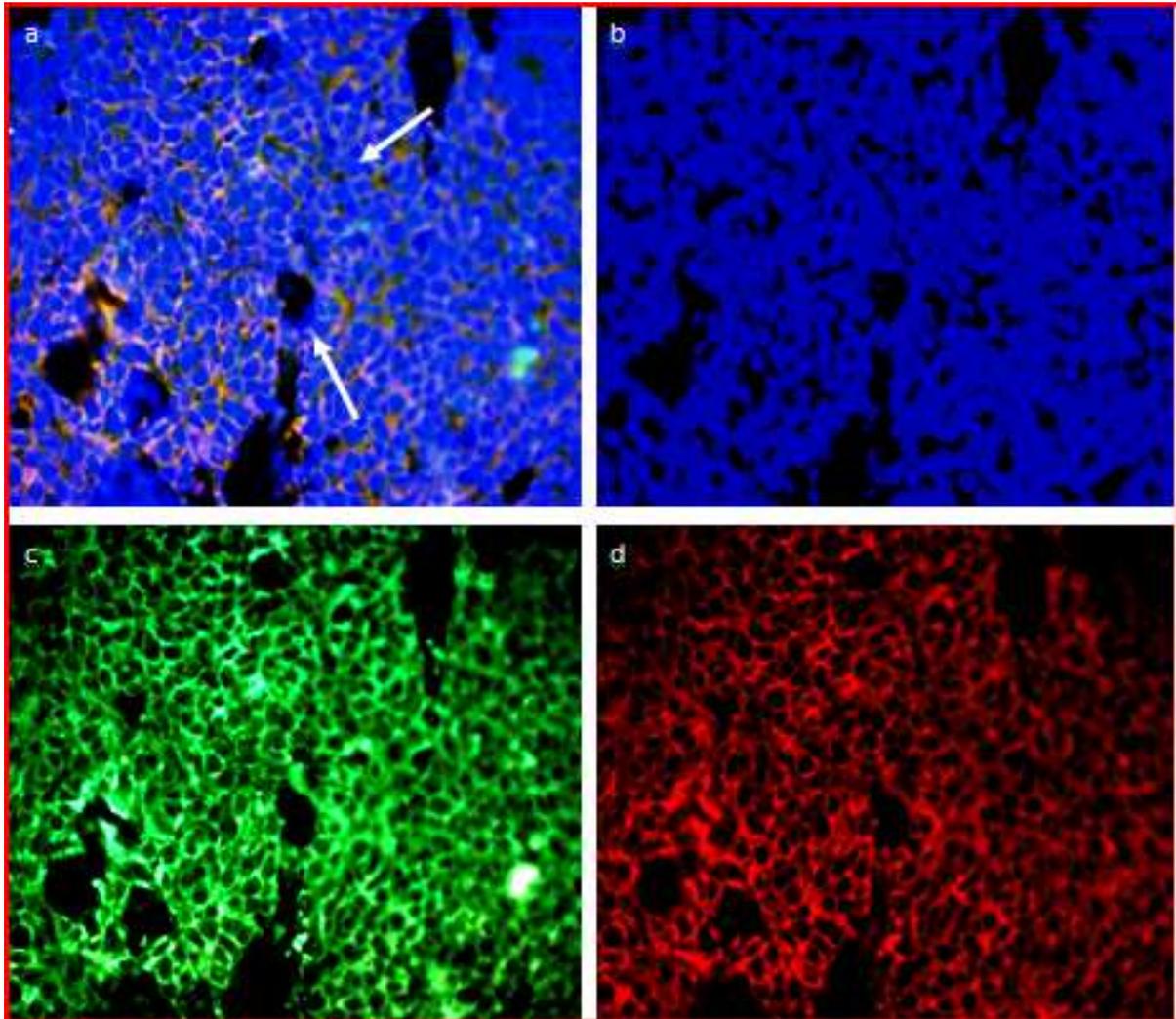
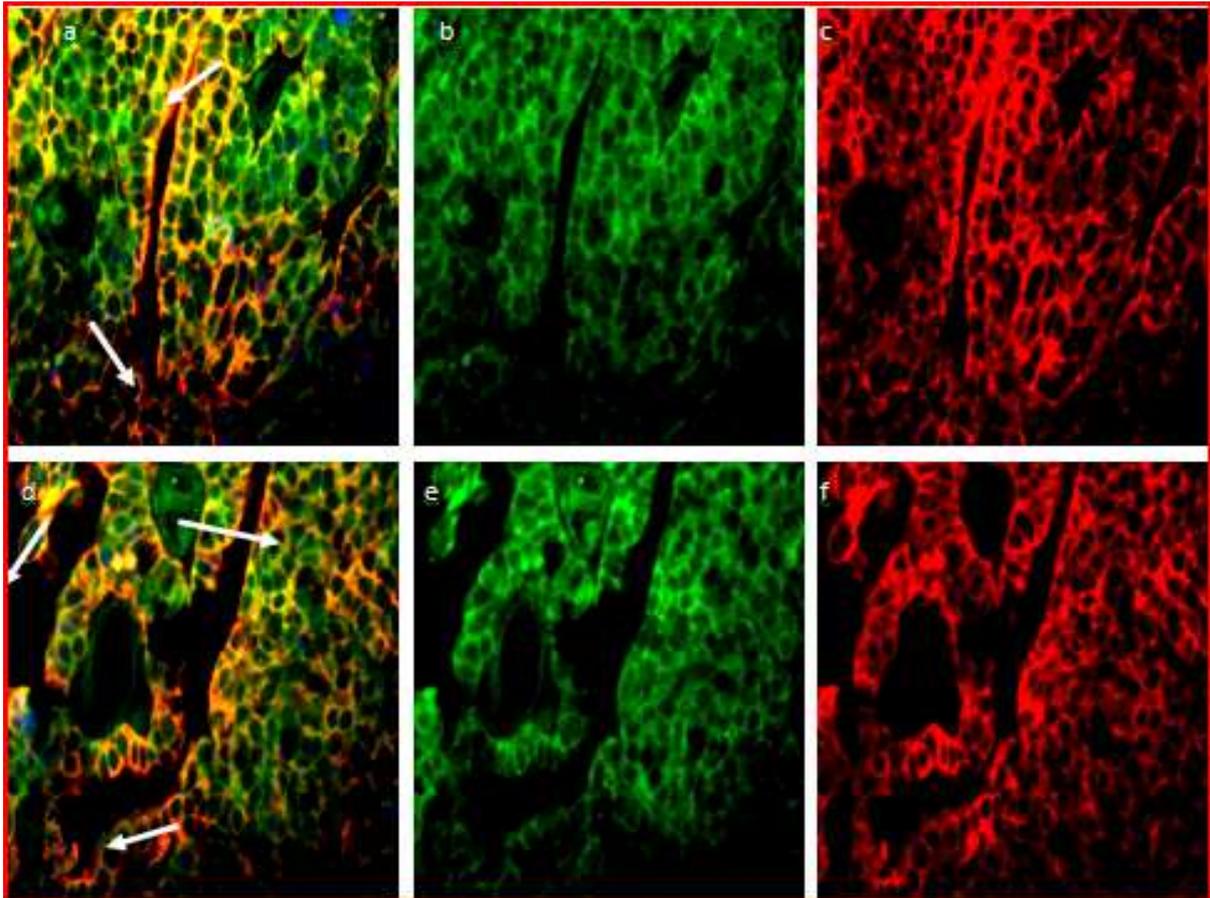


Abb. 12: Nachweis von OATP 4A1 (grüne Färbung) und CK19 (rote Färbung) mittels Doppelimmunfluoreszenz im Ovarialgewebe. (Anwendung eines OATP 4A1 Ziegen-Antikörpers und eines Alexa Fluor 488-gekoppelten Zweitantikörpers sowie eines CK19 Maus-Antikörpers und eines Alexa Fluor 568-gekoppelten Sekundärantikörpers); 40x Vergrößerung  
 a) Überlagerung: OATP 4A1 mit CK19, Pfeile zeigen eine Überlagerung von CK 19 mit dem OATP 4A1 in Zellen mit epithelialem Charakter; b) Blau: Zellkerne; c) Grün: OATP 3A1; d) Rot: CK 19

#### 4.1.6 Nachweis von OATP 5A1 in Ovarialkarzinomschnitten

In Abbildung 13 sieht man eine Doppelfärbung von OATP 5A1 und CK19 in 2 unterschiedlichen Regionen desselben Ovarialkarzinompräparats. Die Grünfärbung des OATP 5A1 Transporters (b,e) an den Membranen ist erkennbar. Es zeigte sich bei der Überlagerung von CK19 mit OATP 5A1 eine starke gelb-orange Färbung um die

Zellkerne herum, die auf die Kolo-kalisation dieses Transporterproteins mit CK19 in den epithelialen Zellen hinweist. Da auch eine beträchtliche unspezifische Reaktion zu beobachten war, wurde versucht, diese zu vermindern. Die Methode der Antigendemaskierung durch Vorbehandlung mit Citratpuffer wurden besser sowie die Waschvorgänge wurden öfter durchgeführt werden.



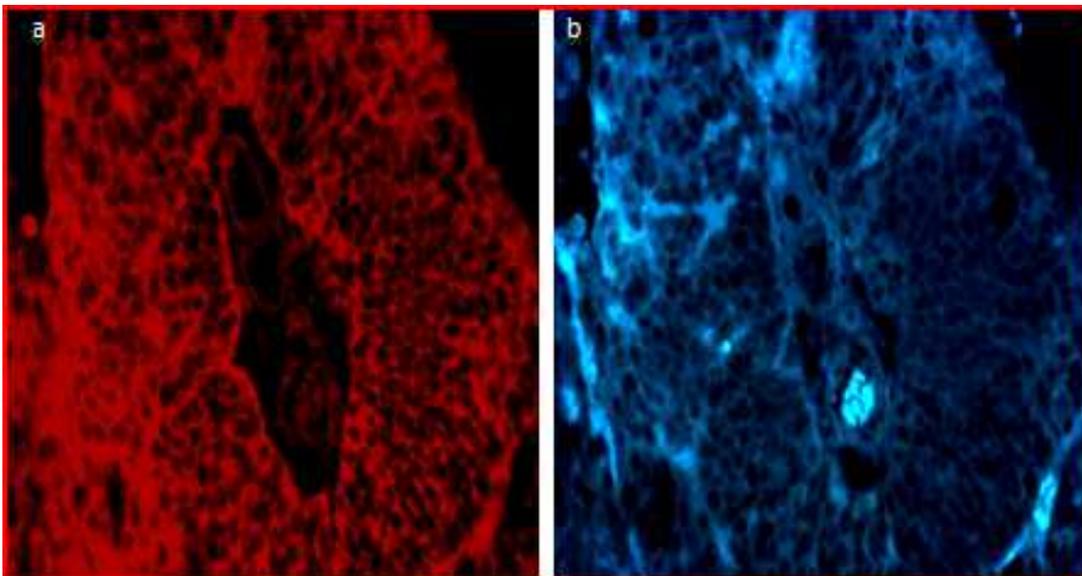
**Abb. 13: Nachweis von OATP 5A1 (grüne Färbung) und CK19 (rote Färbung) mittels Doppelimmunfluoreszenz im Ovarialgewebe. (Anwendung eines OATP 5A1 Kaninchen-Antikörpers und eines Alexa Fluor 488-gekoppelten Zweitantikörpers sowie eines CK19 Maus-Antikörpers und eines Alexa Fluor 568-gekoppelten Sekundärantikörpers); 40x Vergrößerung**

Abbildung 13 zeigt 2 verschiedene Stellen desselben Ovarialschnittpräparats

a) Überlagerung: OATP 5A1 mit CK19, Pfeile zeigen eine Überlagerung von CK 19 mit dem OATP 5A1; b) Grün: OATP 5A1; c) Rot: CK 19; d) Überlagerung: OATP 5A1 mit CK19, Pfeile zeigen eine Überlagerung von CK 19 mit dem OATP 5A1; e) Grün: OATP 5A1; f) Rot: CK 19

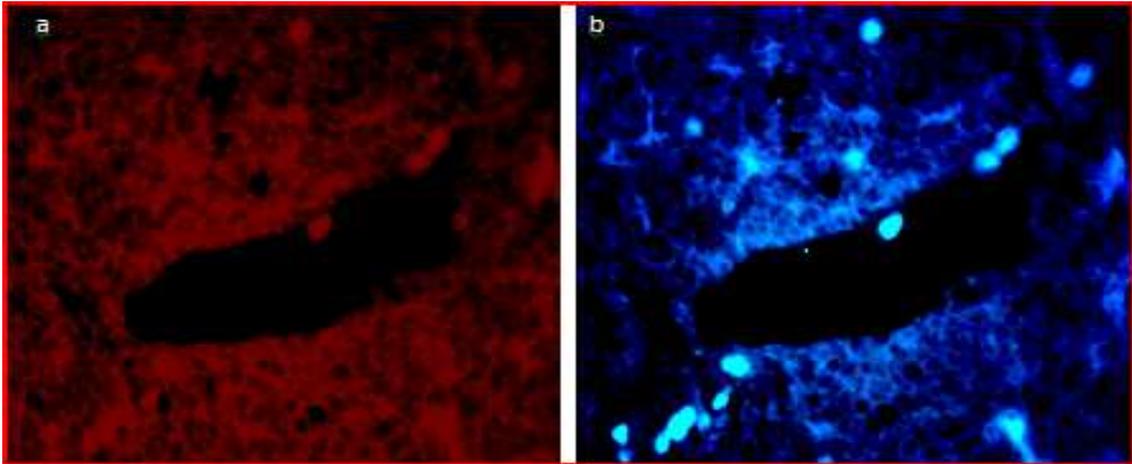
Die folgenden Abbildungen 14 und 15 stellen die Immunfluoreszenzfärbungen für den Transporter OATP 5A1 dar, wobei als Sekundärantikörper Alexa Fluor 568 für den Paraffinschnitt von einem Ovarialkarzinom und Alexa Fluor 647 für den zweiten Paraffinschnitt des Ovarialkarzinoms verwendet wurden. Da es bei den Immunfluoreszenzfärbungen, mit Alexa 568-gekoppelten Sekundärantikörpern eine Überlagerung der Fluoreszenzsignale im FITC-Kanal gab, wurde probeweise ein anderer Sekundärantikörper eingesetzt (Alexa Fluor647).

In Abbildung 14 ist die Immunfluoreszenz von OATP 5A1 in einer 40fachen Vergrößerung gezeigt, der mittels Alexa Fluor568-gekoppelten Antikörper nachgewiesen wurde. Abbildung 15 zeigt die Färbung von OATP 5A1 mit dem Alexa Fluor647-gekoppelten Sekundärantikörper. Beide Abbildungen wurden sowohl im Texasrot und im Alexa Fluor 647 Kanal aufgenommen. Allerdings zeigte sich, dass das Signal, das nur im Alexa Fluor 647 Kanal sichtbar sein sollte auch in den Texasrot Kanal überstrahlt. Daher ist der Alexa Fluor 647 gekoppelte Antikörper für eine spezifische Färbung nicht geeignet.



**Abb. 14: Nachweis von OATP 5A1 (blaue Färbung) mittels Immunfluoreszenz im Ovarialgewebe. (Anwendung eines OATP 5A1-Antikörpers und eines Alexa Fluor 568-gekoppelten Zweitantikörpers); 40x Vergrößerung**

a) Rot: OATP 5A1; b) OATP 5A1 sollte im blauen Kanal nicht fluoreszieren

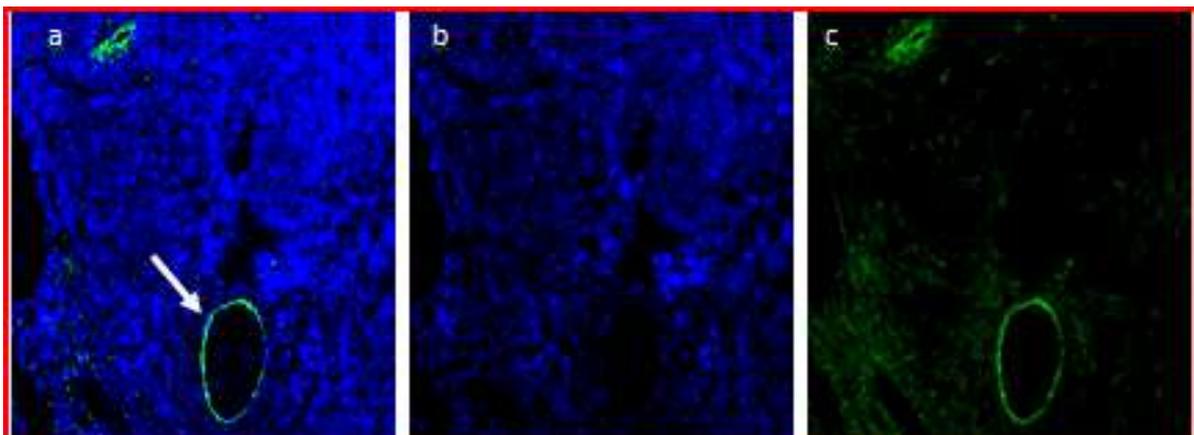


**Abb. 15: Nachweis von OATP 5A1 (blaue Färbung) mittels Immunfluoreszenz im Ovarialgewebe. (Anwendung eines OATP 5A1-Antikörpers und eines Alexa Fluor 647-gekoppelten Zweitantikörpers); 40x Vergrößerung**

a) OATP 5A1 sollte im roten Kanal nicht fluoreszieren; b) Blau: OATP 5A1

#### 4.1.7 Nachweis von OATP 6A1 in Ovarialkarzinomschnitten

In Abbildung 16 ist der Nachweis des OATP 6A1- Transporters gezeigt. Der Primärantikörper wurde in einer Verdünnung 1: 100 aufgetragen. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) gegengefärbt. Es zeigte sich, dass OATP6A1 nur in den Gefäßen nachzuweisen war.



**Abb. 16: Nachweis von OATP 6A1 (grüne Färbung) mittels Immunfluoreszenz im Ovarialgewebe. (Anwendung eines OATP 6A1 Kaninchen-Antikörpers und eines Alexa Fluor 488-gekoppelten Zweitantikörpers); 40x Vergrößerung**

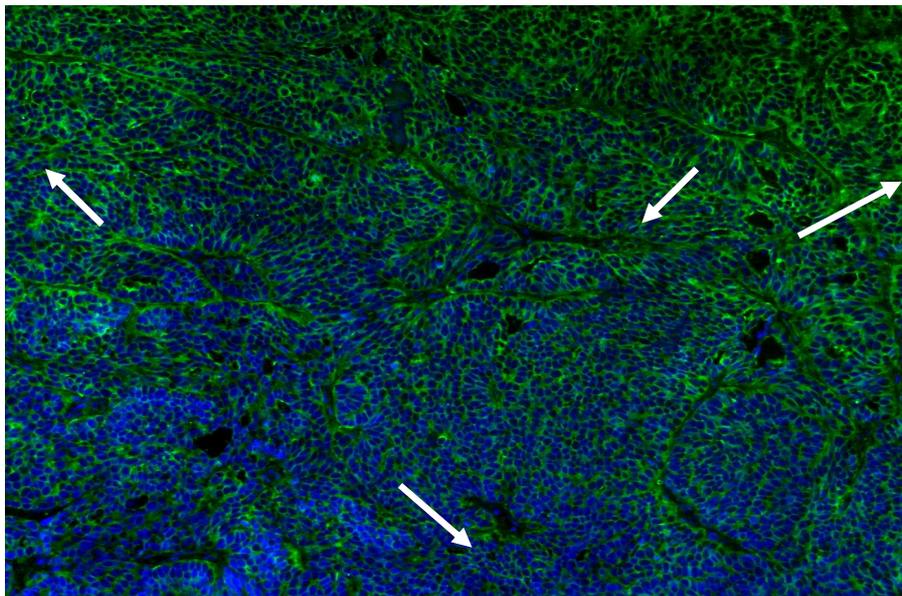
a) Grün: OATP 6A1, Blau: Zellkerne , Pfeil zeigt die OATP 6A1-Fluoreszenz; b) Blau: Zellkerne;  
c) Grün: OATP 6A1

## **4.2 Nachweis von bestimmten Bio- und Tumormarkern mittels Immunfluoreszenz**

### **4.2.1 Nachweis von Alpha-Tubulin in Ovarialkarzinomschnitten**

Abbildung 17 zeigt ein Übersichtsbild, das mittels TissueFacs aufgenommen wurde. Bei dieser Einzelfärbung wurde ein primärer Maus-Antikörper gegen das  $\alpha$ -Tubulin zur mikroskopischen Darstellung des intrazellulären Filamentgerüsts herangezogen. Zur Detektion diente ein mit Alexa488 gekoppelter Sekundärantikörper.

In Abbildung 18 sieht man weitere Detailaufnahmen desselben Ovarialkarzinomschnitts in einer 40fachen Vergrößerung. Die immunzytochemische Färbung des Paraffinschnitts mit einem anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper in einer Verdünnung 1:100 zeigt eine starke Signalintensität in allen Zellen. In der Vergrößerung sieht man, dass die grüne Fluoreszenz das gesamte Zytosol ausfüllt.



**Abb. 17: Nachweis von  $\alpha$ -Tubulin (grüne Färbung) mittels Immunfluoreszenz im Ovarialgewebe. (Anwendung eines  $\alpha$ -Tubulin Maus-Antikörpers und eines Alexa Fluor 488-gekoppelten Zweitantikörpers); Tissue Facs, Pfeile:  $\alpha$ -Tubulin (grün), Kerne (blau)**

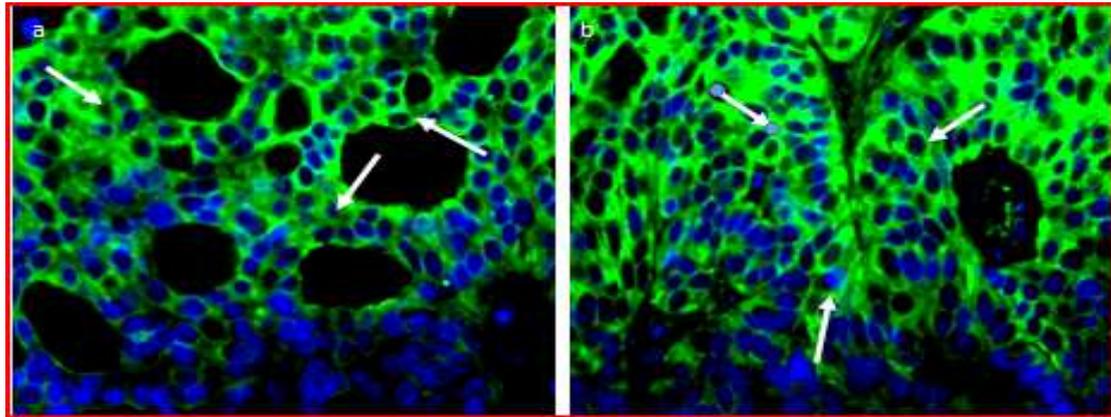


Abb. 18: Nachweis von Alpha-Tubulin (grüne Färbung) mittels Immunfluoreszenz im Ovarialgewebe. (Anwendung eines Alpha-Tubulin Maus-Antikörpers und eines Alexa Fluor 488-gekoppelten Zweitantikörpers), 40x Vergrößerung  
 a,b)  $\alpha$ -Tubulin, Blau: Zellkerne, Pfeile:  $\alpha$ -Tubulin

#### 4.2.2 Nachweis von Vimentin in Ovarialkarzinomschnitten

In Abbildung 19 wird Vimentin in Karzinomzellen an einem Paraffinschnitt von einem Ovarialkarzinom nachgewiesen. Das Intermediärfilament wird in Zellen und Geweben mesenchymalen Ursprungs gebildet und wird von vielen Tumorzellen produziert. Daher ist Vimentin eines der häufigsten verwendeten Markerproteine in der Pathologie, der den Übergang von epithelialen zu mesenchymalen Eigenschaften zeigt. In den Studien hat man den Antikörper 1:100 verdünnt. Als Sekundärantikörper wurde Alexa Fluor 568-Maus IgG verwendet.

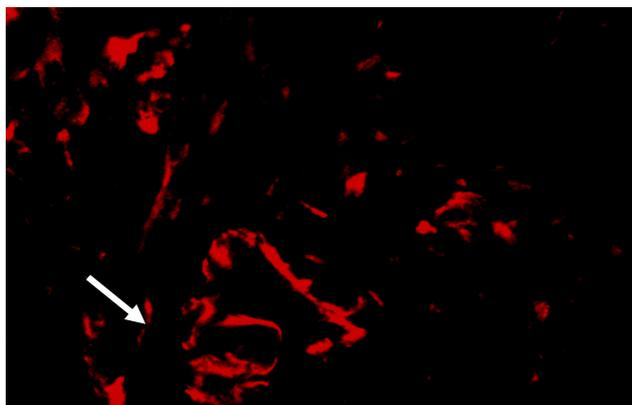


Abb. 19: Nachweis von Vimentin (rote Färbung) mittels Immunfluoreszenz im Ovarialkarzinom. (Anwendung eines Vimentin Maus-Antikörpers und eines Alexa Fluor 568-gekoppelten Zweitantikörpers)

### **4.3 Nachweis der OATPs mittels Immunhistochemie**

Um einige Transportproteine in Paraffin-eingebetteten Ovarialschnitten zu lokalisieren, wurden auch immunhistochemische Analysen durchgeführt. Das Gewebe wurde im Gegensatz zu den Immunfluoreszenzfärbungen nach dem Entparaffinisierungsschritt mit Xylol vorerst mit 3%iger Wasserstoffperoxidlösung in Methanol inkubiert. Anschließend erfolgte die Antigendemaskierung mit dem heißen Citratpuffer. Die Schnitte wurden dann mit dem jeweiligen OATP-gerichteten Erstantikörper und nachfolgend mit dem enzymmarkierten Zweitantikörper inkubiert. Anschließend wurden die Aufnahmetransporter mithilfe einer Farbreaktion durch die Umsetzung des DAB Chromogens visualisiert. Die Zellkerne wurden in den Paraffinschnitten mit Hämatoxylin gegengefärbt.

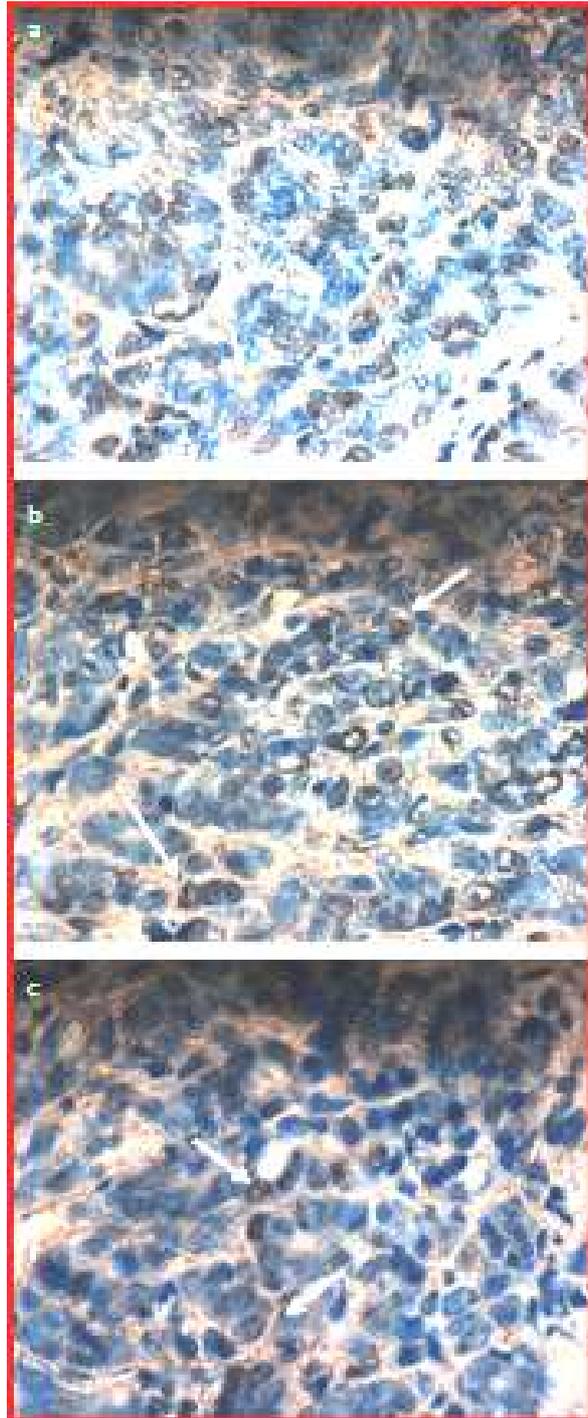
#### **4.3.1 Nachweis von OATP 1B1/1B3 mittels Immunhistochemie**

Die folgenden Abbildungen zeigen die immunhistochemische Färbung für das Transportprotein OATP 1B1/1B3 an einem Ovarialkarzinomschnitt. Als Primärantikörper wurde der aus Mausserum gewonnene Antikörper, der gegen OATP 1B1/1B3 gerichtet ist, in einer Verdünnung von 1:50 verwendet.

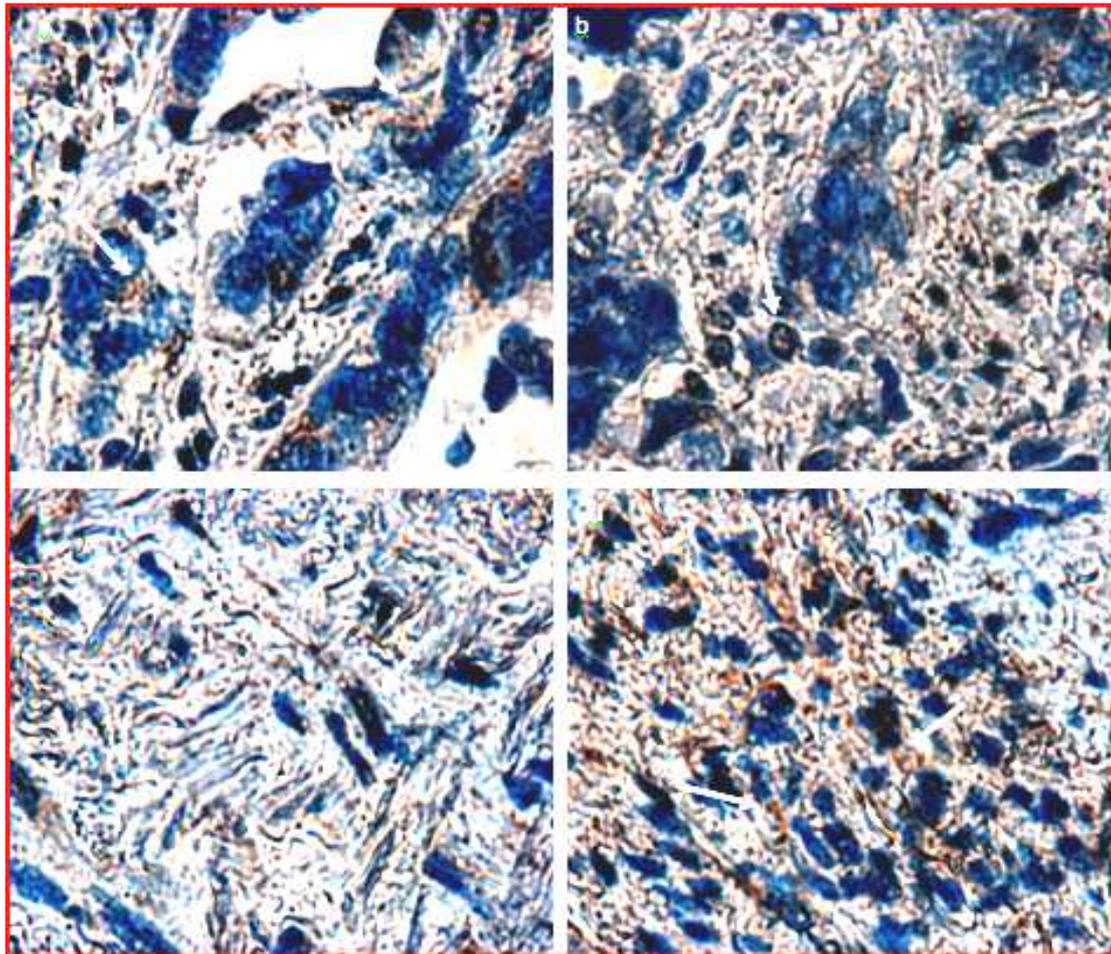
Die Immunhistochemie wurde mittels eines Dextran Polymer HRP Anti-Mouse Dako Envision (unverdünnt) Kits durchgeführt. Für den Nachweis wurde das DAB Chromogen verwendet, wobei Enzymmoleküle das Chromogen zu einem braunen Endprodukt umsetzten. Die mit Hämatoxylin angefärbten Zellkerne zeigen eine Blaufärbung.

Abbildung 20 zeigt verschiedene Stellen eines Paraffinschnitts von einem Ovarialkarzinom in einer 10fachen Vergrößerung. OATP 1B1/1B3 ist durch eine Braunfärbung erkennbar.

In der Abbildung 21 sind verschiedene Aufnahmepositionen desselben Präparats in einer 40fachen Vergrößerung abgebildet.



**Abb. 20: Nachweis von OATP 1B1/1B3 (braune Färbung) mittels Immunhistochemie im Ovarialgewebe. (Anwendung eines OATP 1B1/1B3 Maus-Antikörpers und eines HRP Anti-Mouse Zweitantikörpers), 10x Vergrößerung  
Pfeile: OATP 1B1/1B3 (braun), Blau: Kerne**

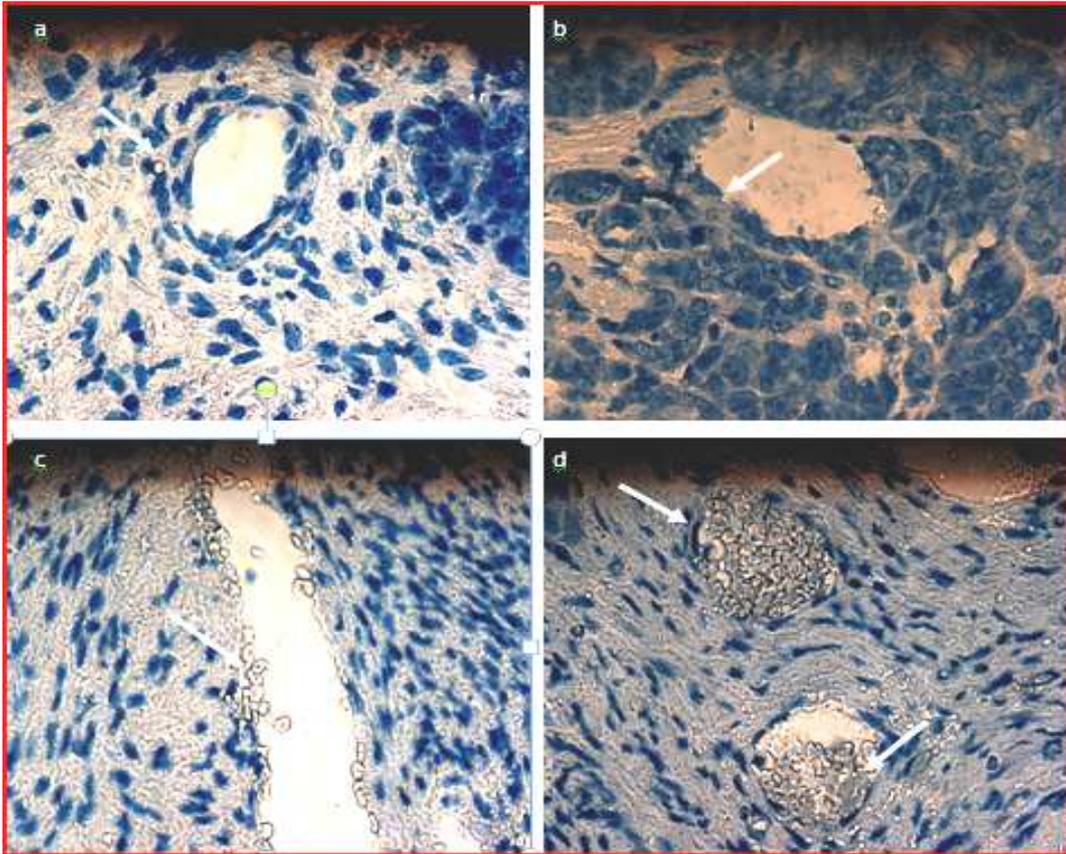


**Abb. 21: Nachweis von OATP 1B1/1B3 (braune Färbung) mittels Immunhistochemie im Ovarialgewebe. (Anwendung eines OATP 1B1/1B3 Maus-Antikörpers und eines HRP Anti-Mouse Zweitantikörpers), 40x Vergrößerung**

**Pfeile: OATP 1B1/1B3 (braun), Blau: Kerne**

#### **4.3.2 Nachweis von OATP 2B1 mittels Immunhistochemie**

Es wurde versucht OATP 2B1 mittels Immunhistochemie darzustellen. Bei 10facher Vergrößerung wurden vier verschiedene Stellen eines Ovarialschnittpräparats ausgewählt. Allerdings konnte in diesem Präparat (Abbildung 22) OATP2B1 nicht nachgewiesen werden. Zu erkennen ist ein Gefäß, an welches rundherum die blauen Zellkerne angeordnet sind. Außerdem auffallend sind die Erythrozyten in den Gefäßen (c,d) sowie Bindegewebsstrukturen mit den langgestreckten Zellkernen. Epitheliale Zellen sind kaum vorhanden, was die Ursache für das fehlende OATP2B1 sein könnte.

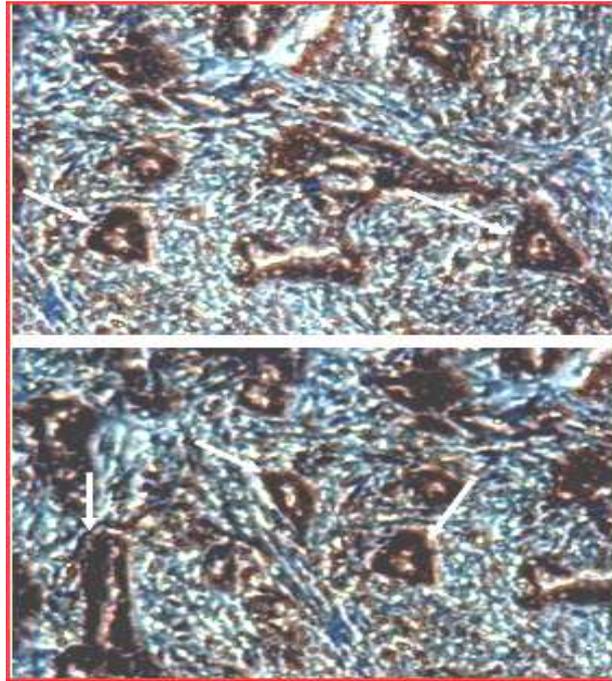


**Abb. 22: Nachweis von OATP 2B1 (braune Färbung) mittels Immunhistochemie im Ovarialgewebe. (Anwendung eines OATP 2B1 Kaninchen-Antikörpers und eines HRP Anti-Rabbit Zweitantikörpers), 10x Vergrößerung  
Pfeile: OATP 1B1/1B3 (braun), Blau: Kerne**

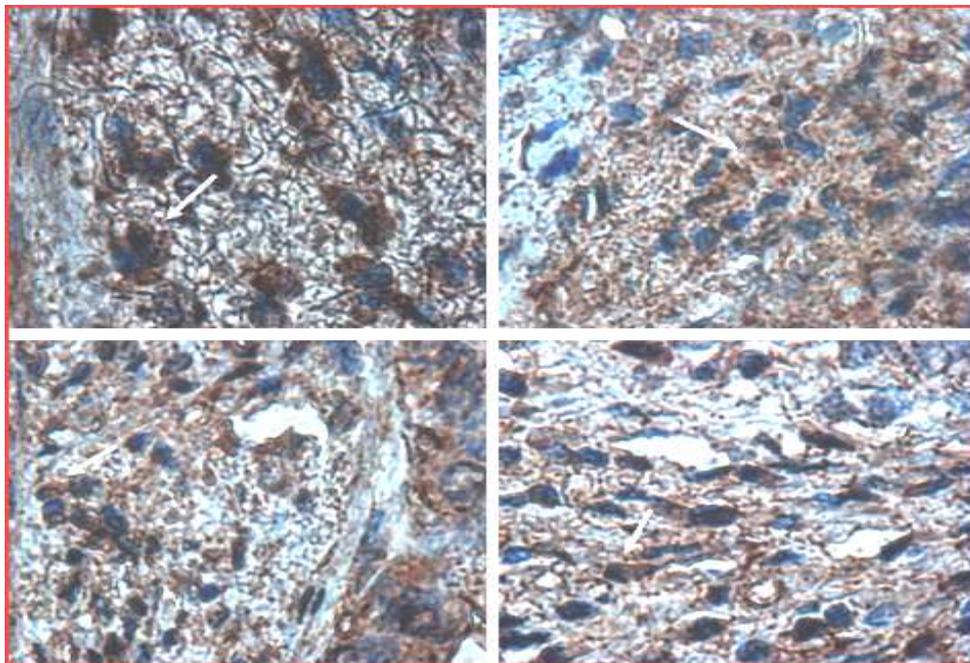
### **4.3.3 Nachweis von OATP 4A1 mittels Immunhistochemie**

In Abbildung 23 und 24 sieht man die immunhistochemische Färbung von OATP 4A1 unter Verwendung eines primären Ziegen-Antikörper (Verdünnung 1: 20)

Die Abbildungen stammen aus derselben Gewebeprobe, wobei unterschiedliche Regionen aufgenommen wurden. Die braune Färbung durch den OATP 4A1 Antikörper ist deutlich zu erkennen. Die runden Kerne, die mit Hämatoxylin gegengefärbt wurden, sind in den epithelialen Zellen deutlich zu sehen.



**Abb. 23: Nachweis von OATP 4A1 (braune Färbung) mittels Immunhistochemie im Ovarialgewebe. (Anwendung eines OATP 4A1 Ziegen-Antikörpers und eines HRP Anti-Goat Zweitantikörpers), 10x Vergrößerung**



**Abb. 24: Nachweis von OATP 4A1 (braune Färbung) mittels Immunhistochemie im Ovarialgewebe. (Anwendung eines OATP 4A1 Ziegen-Antikörpers und eines HRP Anti-Goat Zweitantikörpers), 40x Vergrößerung, Pfeile: OATP 4A1 (braun), Blau: Kerne**

Die folgenden Tabellen 5 und 6 stellen eine Übersicht aller durchgeführten Färbungen mit den Resultaten dar.

**Tab.5: Immunfluoreszenzfärbungen in Übersicht**

Antikörper	Verdünnungen	Ergebnisse
anti OATP <b>1B1/1B3</b> + 488 Anti-Mouse (1:1000), grüne Färbung	unverdünnt	Sowohl das unverdünnte Auftragen als auch die 1:20 Antikörper Verdünnung führten zu einer unspezifischen Hintergrundreaktion. Die optimale Konzentration für den Antikörper lag bei einer Verdünnung von 1 zu 50.
	1 : 20	
	1 : 50	Die Doppelfärbung mit CK19 (rot) zeigte eine Überlagerung des roten und grünen Kanals. Die resultierende Gelbfärbung wies auf das Vorkommen von OATP 1B1/1B3 in Zellen mit epithelialelem Charakter hin.
	1 : 50	Die Doppelfärbung mit CD34 (rot) zeigte eine Überlagerung des roten und grünen Kanals. Die resultierende Gelbfärbung wies auf das Vorkommen von OATP 1B1/1B3 in den endothelialen Zellen der Blutgefäße hin.
anti OATP <b>2A1</b> + 488 Anti-Rabbit (1:1000), grüne Färbung	1 : 100, 1 : 200, 1 : 500, 1 : 800	Mit den verschiedenen Antikörperverdünnungen traten unspezifische Hintergrundreaktionen auf. Für OATP 2A1 wurde eine optimale Antikörperverdünnung von 1:1000 ermittelt.
	1 : 1000	Mit dieser Antikörperverdünnung wurde das geringste Hintergrundrauschen erzielt.
	1 : 500	Dem Antikörper wurde das „ <i>Prostaglandin Transporter Blocking Peptide</i> “ als eine 1:1 Mischung zugesetzt. Erwartungsgemäß konnte kein Fluoreszenzsignal ermittelt werden.
	1 : 100	Die Doppelfärbung mit CK19 (rot) zeigte aufgrund der zu geringen Verdünnung des Antikörpers keine positiven Resultate.
	1 : 100	Die Doppelfärbung mit CD34 (rot) zeigte die Lokalisation der Blutgefäße; die Überlappung des grünen und roten Kanals führte zu einer leichten gelb-orangen Mischfarbe, die auf das Vorkommen von OATP 2A1 in den endothelialen Zellen hinwies.
anti OATP <b>2B1</b> + 488 Anti-Rabbit (1:1000), grüne Färbung	1 : 50	Die Doppelfärbung mit CD34 (rot) zeigte aufgrund der geringen Verdünnung des Antikörpers keine positiven Ergebnisse. Die Blutgefäße konnten im Gewebe rot dargestellt werden.
	1 : 50	Die Doppelfärbung mit CK19 (rot) zeigte die Lokalisation der Epithelzellen; die Überlagerung des grünen und roten Kanals führte zu einer deutlichen Gelbfärbung, die auf das Vorkommen von OATP 2B1 in den epithelialen Zellen hindeutete. Mit der Verdünnung 1:100 konnten die besten Resultate erzielt werden.
	1 : 100	

anti OATP <b>3A1</b> + 488 Anti Goat (1:200), grüne Färbung	1 : 5	Die Doppelfärbung mit CK19 (rot) zeigte eine Überlagerung der beiden Kanäle. Die resultierende Gelbfärbung wies auf das Vorhandensein von OATP 3A1 in den epithelialen Gallengangszellen hin.
	1 : 10	Mit dieser Antikörperverdünnung wurde eine Einzelfärbung durchgeführt, wobei nur geringe Fluoreszenzsignale detektiert werden konnten.
anti OATP <b>4A1</b> + 488 Anti Goat (1:200), grüne Färbung	1 : 20 und 1 : 50	Mit der Antikörperverdünnung 1:20 konnten die besten Resultate erzielt werden.
	1 : 20	Die Doppelfärbung mit CK19 (rot) zeigte eine Überlagerung des roten und grünen Kanals. Die resultierende Gelbfärbung wies auf das Vorkommen von OATP 4A1 in Zellen mit epitheliale Charakter hin. Die Doppelfärbung mit CD34 (rot) zeigte nur die Lokalisation der Blutgefäße, die durch eine Rotfluoreszenz detektiert wurden.
anti OATP <b>5A1</b>	1 : 50	Als Sekundärantikörper für die Darstellung von OATP 5A1 wurden für jeweils einen Paraffinschnitt Alexa 568 und Alexa 647 Anti Rabbit eingesetzt. In den jeweiligen Kanälen konnte ein Fluoreszenzsignal detektiert werden.
	1 : 50	Die Doppelfärbung mit CK19 (rot) zeigte eine Überlagerung des grünen (OATP 5A1) und roten Kanals. Die resultierende Gelbfärbung deutete auf das Vorkommen von OATP 5A1 in den Epithelzellen hin.
anti OATP <b>6A1</b> + 488 Anti Rabbit (1:1000), grün	1 : 100	Für den Nachweis von OATP 6A1 wurde eine Verdünnung von 1:100 verwendet, wobei nur ein schwaches Expressionssignal zu beobachten war.
anti <b>α-Tubulin</b> + 488 Anti Mouse (1:1000), grün	1 : 100	Bei dieser Einzelfärbung konnte α-Tubulin und das intrazelluläre Filamentgerüst als Grünfluoreszenz dargestellt werden.
anti <b>Vimentin</b> + 568 Anti Mouse (1:1000), rot	1 : 100	Die Einzelfärbung für die Darstellung von Vimentin wurde mit einer Antikörperverdünnung von 1:100 vorgenommen, wobei ein rotes intensives Expressionssignal zu erkennen war.

**Tab.6: Immunhistochemiefärbungen in Übersicht**

Antikörper	Verdünnungen	Ergebnisse
anti OATP <b>1B1/1B3</b>	1 : 50	Es konnte kein spezifisches Expressionsmuster nachgewiesen werden. Teilweise Braunfärbung im Bereich des Bindegewebes mit auffallend langen Zellkernen.
anti OATP <b>2B1</b>	1 : 50	Kein positiver Nachweis (Keine Braunfärbung).
anti OATP <b>4A1</b>	1 : 20	Deutliche Braunfärbung zu erkennen.

## 5 DISKUSSION

Je nach ihrer Lokalisation und Funktion als Aufnahmetransporter spielen OATPs eine wichtige Rolle in Vorgängen wie Absorption, Metabolisierung und Elimination von endogenen und exogenen Substanzen. Den Transmembranproteinen wird daher eine große Bedeutung im Rahmen der Wirksamkeit von Chemotherapeutika zugeschrieben. Viele Zytostatika zählen also zu den OATP-Substraten. Aus diesem Grund ist es erforderlich, die Expression der OATP-Familie in den ausgewählten Ovarialtumorgeweben zu untersuchen.

Daher wurde in dieser Diplomarbeit die zelluläre Lokalisation von OATP 1B1/1B3, 2A1, 2B1, 3A1, 4A1, 5A1 und 6A1 in Paraffin eingebetteten Gewebeproben von Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom mittels Immunfluoreszenz und immunhistochemischer Färbemethoden untersucht. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen wurden ebenso durchgeführt, um eine Kolokalisation der OATPs mit Markern für epitheliale und endotheliale Zellen darzustellen. Dafür wurden zelluläre Marker wie CK19 (epitheliale Zellen) oder CD34 (vaskuläre endotheliale Zellen) verwendet, um die Lokalisation der OATPs zu bestimmen. In den Bildüberlagerungen der jeweiligen OATPs mit CK19 oder CD34 konnten die OATPs auf der Zelloberfläche durch eine Gelb-Orangefärbung in den zellulären Membranen nachgewiesen werden. Die Resultate zeigten, dass OATP 1B1/1B3, OATP 2A1, OATP 3A1, OATP 4A1 und OATP 5A1 tatsächlich in den epithelialen Zellen mit Positivität für CK19 lokalisiert sind. Darüber hinaus wurden Doppelfärbungen von OATP 2A1, OATP 2B1 und OATP 4A1 mit dem Gefäßmarker CD34 durchgeführt. Außerdem erfolgten immunhistochemische Studien mit OATP 1B1/1B3 und OATP 4A1, die durch eine Braunfärbung der epithelialen Zellmembranen dargestellt wurden.

In dieser Diplomarbeit sollte zunächst eine Methode etabliert werden, die es erlaubt, die Expression dieser Proteine im Ovarialgewebe nachzuweisen, sodass die immunhistochemische- oder Immunfluoreszenzfärbung der OATPs für eine automatische Quantifizierung der Expressionsmenge geeignet ist. Dies sollte es in weiterer Folge ermöglichen, Transportproteine als Tumormarker für die Diagnose, Prognose und Therapie zu evaluieren.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Etwa 90% der bösartigen Ovarialtumoren entstehen aus dem Ovaroberflächenepithel. Die Behandlung des Ovarialkarzinoms hat noch immer trotz modernster Therapieverfahren und Einsatz neuester Chemotherapeutika einen begrenzten Erfolg. Prognostisch stellt das Ovarialkarzinom das ungünstigste Genitalkarzinom dar, das aufgrund der Symptomlosigkeit oder eines Symptommangels sowie schlechter Screeningmaßnahmen erst im fortgeschrittenen späten Stadium erkannt wird und daher die Haupttodesursache unter den gynäkologischen Tumoren ist. Darüber hinaus kommt es unter einer Chemotherapie häufig zu einer Chemoresistenz. Die Standardtherapie für eine Patientin in einem fortgeschrittenen Stadium mit einer platinbasierten Kombinationstherapie als Kombinationstherapie führt häufig zu einem Rezidiv. Oberstes Ziel ist es daher, potentielle Wirkstoffe für die Chemotherapie zu entwickeln, um den Tumor zu beseitigen. Die Transporterfamilie der „Organic Anion Transporting Polypeptides“ (OATPs), die zur Familie der „Solute Carriers“ (SLC) gehört und auch als SLC21A-Subfamilie bezeichnet wird, ist an der Aufnahme von verschiedenen Chemotherapeutika beteiligt. Untersuchungen von OATPs scheinen daher möglicherweise einen wichtigen Therapieansatz für die Entdeckung neuer Zytostatika zu liefern.

Ziel dieser vorliegenden Diplomarbeit war es, die Lokalisation von OATP 1B1/1B3, 2A1, 2B1, 3A1, 4A1, 5A1 und 6A1 in Paraffin eingebetteten Gewebeproben von Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom mittels Immunfluoreszenz und immunhistochemischer Färbemethoden zu untersuchen. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen wurden durchgeführt, um eine Kolo-kalisation der OATPs mit Markern für epitheliale und endotheliale Zellen darzustellen. CK19 (epitheliale Zellen) oder CD34 (vaskuläre endotheliale Zellen) dienten als zelluläre Marker, um die Lokalisation der OATPs zu bestimmen. In den Überlappungen der Bilder der jeweiligen OATPs mit CK19 oder CD34 konnten die OATPs durch eine Gelb-Orangefärbung in den zellulären Membranen nachgewiesen werden. Ergebnisse zeigten, dass OATP 1B1/1B3, OATP 2A1, OATP 3A1, OATP 4A1 und OATP 5A1 tatsächlich in den CK19-positiven epithelialen Zellen lokalisiert sind. Mit dem Gefäßmarker CD34 erfolgten Doppelfärbungen zum Nachweis

von OATP 2A1, OATP 2B1 und OATP 4A1. Außerdem wurden immunhistochemische Studien mit OATP 1B1/1B3 und OATP 4A1, die durch eine Braunfärbung der epithelialen Zellmembranen dargestellt wurden, durchgeführt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sowohl „Leber-spezifische“ als auch ubiquitär vorkommende OATPs in den Ovarialkarzinompräparaten nachzuweisen sind. Daher könnten diese Transportproteine für die Wirksamkeit von Arzneistoffen und Hormonen bei diesen Tumoren von Bedeutung sein.

## 7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1-3: Immunfluoreszenznachweis von OATP 1B1/1B3 und CK19
- Abbildung 4-5: Immunfluoreszenznachweis von OATP 2A1 und CD34
- Abbildung 6: Immunfluoreszenznachweis von OATP 2A1
- Abbildung 7: Immunfluoreszenznachweis von OATP 2A1+ PG-T-Blocking Peptide
- Abbildung 8: Immunfluoreszenznachweis von OATP 2B1 und CK19
- Abbildung 9-10: Immunfluoreszenznachweis von OATP 3A1 und CK19
- Abbildung 11-12: Immunfluoreszenznachweis von OATP 4A1 und CK19
- Abbildung 13: Immunfluoreszenznachweis von OATP 5A1 und CK19
- Abbildung 14: Immunfluoreszenznachweis von OATP 5A1 mittels Alexa Fluor 568-gekoppelten Sekundärantikörper
- Abbildung 15: Immunfluoreszenznachweis von OATP 6A1 mittels Alexa Fluor 647-gekoppelten Sekundärantikörper
- Abbildung 16: Immunfluoreszenznachweis von OATP 6A1
- Abbildung 17: Immunfluoreszenznachweis von  $\alpha$ -Tubulin mittels TissueFacs
- Abbildung 18: Immunfluoreszenznachweis von  $\alpha$ -Tubulin
- Abbildung 19: Immunfluoreszenznachweis von Vimentin
- Abbildung 20-21: Immunhistochemischer Nachweis von OATP 1B1/1B3
- Abbildung 22: Immunhistochemischer Nachweis von OATP 2B1
- Abbildung 23-24: Immunhistochemischer Nachweis von OATP 4A1

## 8 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: FIGO-Stadieneinteilung für das Ovarialkarzinom

Tabelle 2: Tabelle mit ausgewählten SLC-Transportern und ihren Liganden

Tabelle 3: Liste der verwendeten Primärantikörper

Tabelle 4: Liste der verwendeten Sekundärantikörper

Tabelle 5: Immunfluoreszenzfärbungen in Übersicht

Tabelle 6: Immunhistochemiefärbungen in Übersicht

## 9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>BB</b>	Blocking buffer
<b>BSA</b>	bovine serum albumin
<b>CD34</b>	cluster of differentiation 34
<b>CK19</b>	cytokeratine 19
<b>DAB Chromogen</b>	Diaminobenzidin Chromogen
<b>DAPI</b>	Diamidinphenylindol
<b>FITC</b>	fluorescein isothiocyanate
<b>HRP</b>	horse radish peroxidase
<b>PBS</b>	phosphate buffered saline

## 10 LITERATURVERZEICHNIS

- <sup>1</sup> BENNINGHOFF, DRENCKHAHN, Anatomie, Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie, Band 1, 17.Auflage, Urban & Fischer Verlag, München-Jena, 2003, 855-863
- <sup>2</sup> FALLER, A., SCHÜNKE, M., Der Körper des Menschen: Einführung in Bau und Funktion, 15.Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2008, 547-550
- <sup>3</sup> HARTMANN, M., PABST, M.A., SHMIED, R., CALUBA, H.-C., DOHR, G., Zytologie, Histologie und Mikroskopische Anatomie: Licht- und elektronenmikroskopischer Bildatlas, Facultas, Wien, 2009, 87-90
- <sup>4</sup> BÜHLING, K.J., FRIEDMAN, W., Intensivkurs: Gynäkologie und Geburtshilfe, 2.Auflage, Urban & Fischer Verlag, München-Jena, 2009, 413-432
- <sup>5</sup> WELSCH, U., Sobotta Lehrbuch Histologie, Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie, 2.Auflage, Urban & Fischer Verlag, München-Jena, 2006, 448-456
- <sup>6</sup> Statistik Austria, Jahrbuch der Gesundheitsstatistik, Österreichisches Krebsregister (Stand: 18.10.2010). Erstellt am 02.11.2009, Download: 01.04.2010, [http://www.statistik-austria.at/web\\_de/statistiken/gesundheit/krebserkrankungen/eierstock/index.html](http://www.statistik-austria.at/web_de/statistiken/gesundheit/krebserkrankungen/eierstock/index.html)
- <sup>7</sup> SEVELDA, P., DENISON, U., Epitheliales Ovarialkarzinom, Epidemiologie und Ätiologie, In:AGO Austria. Manual der gynäkologischen Onkologie (Stand: 04.05.2009), Download: 01.04.2010, <http://www.ago-manual.at/inhalt/ii-overialkarzionom/21-epidemiologie-und-aetiologie/>
- <sup>8</sup> SCHMIDT-MATTHIESEN, H., BASTERT, G., Diagnostik, Therapie und Nachsorge der bösartigen Genitaltumoren und des Mammakarzinoms, 5.Auflage, Schattauer, Stuttgart-New York, 1995, 51-71

<sup>9</sup> BRECKWOLDT, M., KAUFMANN, M., PFLEIDERER, A., Gynäkologie und Geburtshilfe, 5.Auflage, Thieme Verlag, 2001, 223-233

<sup>10</sup> PFISTERER, J., Das Ovarialkarzinom: Therapeutische Standards – klinische Empfehlungen, Thieme Verlag, 2002, 1-17

<sup>11</sup> BALTZER, J., MICKAN, H., Gynäkologie – Ein kurzgefasstes Lehrbuch (Begründet von Günther Kern) 5.neubearbeitete und erweiterte Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, 1994, 679-691

<sup>12</sup> AUERSPERG, N., WONG, AST., CHOI K., KANG SK., LEUNG PCK., Ovarian Surface Epithelium: Biology, Endocrinology, and Pathology. Endocrine Reviews. 2001. 22:255-277

<sup>13</sup> GUBBLES, J.A., CLAUSSEN, N., KAPUR, A.K., CONNOR, J.P., PATANKAR, M.S., The detection, treatment, and biology of epithelial ovarian cancer, Journal of Ovarian Research. 2010. 3:8.

<sup>14</sup> KIECHLE, M., Gynäkologie und Geburtshilfe, 1.Auflage, Urban & Fischer Verlag, München-Jena, 2007, 536-550

<sup>15</sup> National Cancer Institute, FactSheet, Obesity and Cancer: Questions and Answers, Stand: 16.03.2004, Download: 01.04.2010, <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Risk/obesity>

<sup>16</sup> THAKER, PH., HAN, LY., KAMAT, AA., AREVALO, JM., TAKAHASHI, R., LU, C., JENNINGS, NB., ARMAIZ-PENA, G., BANKSON, JA., RAVOORI, M., MERRITT, WM., LIN, YG., MANGALA, LS., KIM, TJ., COLEMAN, RL., LANDEN, CN., LI, Y., FELIX, E., SANGUINO, EM., NEWMAN, RA., Lloyd, M., GERSHENSON, DM., KUNDRA, V., LOPEZ-BERESTEIN, G., LUTGENDORF, SK., COLE, SW., SOOD, AK., Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. Nature Medicine. 2006. 12:939-944

- <sup>17</sup> HIDDEMANN, W., HUBER, H., BARTRAM, C., Die Onkologie, Teil 2: Spezieller Teil- Solide Tumoren- Lymphome- Leukämien, Springer Verlag, 2004, 1058-1071
- <sup>18</sup> HUBER, J.C., KUBISTA, E., LEODOLTER, S., Gynäkologie, Band 1, Wilhelm Maudrich Verlag, 2001, 72-78
- <sup>19</sup> KREIENBERG, R., DU BOIS, A., PFISTERER, J., Management des Ovarialkarzinoms: Interdisziplinäres Vorgehen, Onkologie aktuell, Springer Verlag, 1.Auflage, 2009, 121-122
- <sup>20</sup> HRICAK, H., HUSBAND, J., PANICEK, DM., Bildgebung in der Onkologie: Diagnostik und Bewertung – Das Wesentliche für das Konsil, Urban und Fischer Verlag, 2007, 83-88
- <sup>21</sup> SIEWERT, JR., ROTHMUND, M., SCHUMPELICK, V., Praxis der Viszeralchirurgie: Onkologische Chirurgie, 3.Auflage, Springer Verlag, 2010, 353-353
- <sup>22</sup> FUNG-KEE-FUNG, M., OLIVER, T., ELIT L., OZA, A., HIRTE, HW., BRYSON, P., Optimal chemotherapy treatment for women with recurrent ovarian cancer. Current Oncology. 2007. 14:195-208
- <sup>23</sup> HÖGBERG T., GLIMELIUS B., NYGREN P., A systematic overview of chemotherapy effects in ovarian cancer. Acta Oncologica. 2001. 40: 340-60
- <sup>24</sup> CARTER, NJ., KEAM, SJ., Trabectedin: A Review of its Use in Soft Tissue Sarcoma and Ovarian Cancer. Drugs. 2010. 70:355-76
- <sup>25</sup> SCHLEGEL, U., WELLER, M., WESTPHAL, M., Neuroonkologie, Thieme Verlag, 2.erweiterte Auflage, 162-164
- <sup>26</sup> HAGENBUCH, B., MEIER, P.J., The superfamily of organic anion transporting polypeptides. Biochimica et Biophysica Acta. 2003. 1609:1-18

- <sup>27</sup> SZAKACSZ, G., PATERSON, JK., LUDWIG, JA., BOOTH-GENTE, C., GOTTESMAN, MM., Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2006. 5:219-234
- <sup>28</sup> GOTTESMAN, MM., Mechanisms of cancer drug resistance. *Annual Review of Medicine*. 2002. 53: 615-627
- <sup>29</sup> MARGULIES, A., FELLINGER, K., KRONER, T., GAISSER, A., *Onkologische Krankenpflege*, Springer Verlag, 4.Auflage, 2005, 132-133
- <sup>30</sup> MARIN, J.J.G., ROMERO, M.R., MARTINEZ-BECERRA P., HERRAEZ, E., BRIZ, O., Overview of the Molecular Bases of Resistance to Chemotherapy in Liver and Gastrointestinal Tumours. *Current Molecular Medicine*. 2009. 9:1108-1129
- <sup>31</sup> CHAN, GN., BENDAYAN, R., Molecular and Functional Characterization of P-Glycoprotein In Vitro, *Methods in Molecular Biology*. 2011. 686:313-336
- <sup>32</sup> SUN-YOUNG AHN and SANJAY K. NIGAM, Toward a Systems Level Understanding of Organic Anion and Other Multispecific Drug Transporters: A Remote Sensing and Signaling Hypothesis. *Molecular Pharmacology*. 2009. 76:481-490
- <sup>33</sup> ZAIR ZM., ELORANTA JJ., STIEGER B., KULLAK-UBLICK GA., Pharmacogenetics of OATP (SLC21/SLCO), OAT and OCT (SLC22) and PEPT (SLC15) transporters in the intestine, liver and kidney. *Pharmacogenomics*. 2008. 9:597-624
- <sup>34</sup> HEDIGER, MA., ROMERO, MF., PENG, JB., ROLFS, A., TAKANAGA, A., BRUFORD, EA., The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins, *Introduction*, *Pflügers Archiv*. 2004. 447: 465-8

- <sup>35</sup> Hagenbuch B., Meyer PJ., Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflügers Archiv*. 2004. 447:653-65
- <sup>36</sup> MIKKAICHI T.,SUZUKI T., TANEMOTO M., ITO S., ABE T., The organic anion transporter (OATP) family. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2004. 19(3):171-9
- <sup>37</sup> HAGENBUCH B., GUI C., Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family. *Xenobiotica*. 2008. 38:778-801
- <sup>38</sup> KÖNIG J., SEITHEL A., GRADHAND U., FROMM MF., Pharmacogenomics of human OATP transporters. *Naunyn-Schmiedeberg`s Archives of Pharmacology*. 2006. 372: 432-443
- <sup>39</sup> CUI Y., KÖNIG J., NIES AT., PFANNSCHMIDT M., HERGT M.,FRANKE WW., ALT W., MOLL R., KEPPLER D., Detection of the human organic anion transporters SLC21A6 (OATP2) and SLC21A8(OATP8) in liver and hepatocellular carcinoma. Laboratory investigation. 2003. 83:527-38
- <sup>40</sup> KÖNIG J., CUI Y., NIES AT., KEPPLER D., A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane. *American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2000. 278:156-64
- <sup>41</sup> KULLAK-UBLICK GA., ISMAIR MG.,STIEGER B., LANDMANN L., HUBER R., PIZZIGALLI F., FATTINGER K., MEIER PJ., HAGENBUCH B., Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology*. 2001. 120:525-33
- <sup>42</sup> MEYER zu SCHWABEDISSEN and KIM, Hepatic OATP1B Transporters and Nuclear Receptors PXR and CAR: Interplay, Regulation of Drug Disposition Genes, and Single Nucleotide Polymorphisms. *Molecular Pharmaceutics*. 2009. 6:1644-1661

<sup>43</sup> LEHMANN, JM., McKEE, DD., WATSON, MA., WILLSON, TM., MOORE, JT., KLIEWER, SA., The Human Orphan Nuclear Receptor PXR Is Activated by Compounds That Regulate CYP3A4 Gene Expression and Cause Drug Interactions. *The Journal of Clinical Investigation*. 1998. 102, 1016-1023

<sup>44</sup> GUI C., MIAO Y., THOMPSON L., WAHLGREN B., MOCK M., STIEGER B., HAGENBUCH B., Effect of pregnane X receptor ligands on transport mediated by human OATP1B1 and OATP1B3. *European Journal of Pharmacology*. 2008. 584:57-65

<sup>45</sup> REMMELE, W., *Pathologie: Rechtsfragen in der Pathologie: Einführung in die bioptische Diagnostik, Herz und Gefäßsystem, Hämatologie, Milz, Thymus*, Springer Verlag, Band 1, 2.neubearbeitete Auflage, 1999, 52-63

## 11 CURRICULUM VITAE

- Name:** Cihangül Sanlioglu
- Adresse:** A-1200 Wien, Friedrich-Engelspl. 9/9/17
- Geburtsdaten:** Wien, 20.08.1986
- Staatsangehörigkeit:** Österreich
- Eltern:** Recep und Kadriye Sanlioglu
- Geschwister:** Ümit und Faruk Sanlioglu
- Schulbesuch:**
- 1992-1996 Volksschule Europaschule,  
Vorgartenstr. 95-97, 1200 Wien
  - 1996-2004 Naturwissenschaftliches Bundesrealgymnasium,  
Vereinsg. 21-23, 1020 Wien
  - 07.06.2004 Matura
- Studium:** ab 2004 Pharmaziestudium, Universität Wien
- Berufstätigkeit:**
- 01.05.2004 – 30.09.2004 Eisverkäuferin, Eissalon Salek,  
Sechsschimmelg., 1090 Wien
  - 01.10.2004 – 30.06.2006 Ehrenamtliche Nachhilfelehrerin, Phönixinstitut,  
Weberg., 1200 Wien
  - 01.07.2006 – 30.11.2006 Telefoninterviewerin, IFES,  
Teinfaltstraße, 1010 Wien
  - 01.02.2008 – 31.08.2009 Geringfügig Beschäftigte, Apotheke  
Reumannplatz, 1100 Wien