



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

**Anionen-Transportierende Polypeptide (OATPs) in Lebertumoren:
Mögliche Bedeutung für die Chemotherapie**

Zur Erlangung des akademischen Grades

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin / Verfasser: Roswitha Schuster
Matrikel-Nummer: 0402264
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt): A449 Pharmazie
Betreuerin / Betreuer: Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Walter Jäger

Weidling, am 26. Mai 2010

Gewidmet meinen lieben Eltern, denen ich
für ihre liebevolle Unterstützung danke!

Danksagung

Diese Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 2009 bis März 2010 am Institut für Pathophysiologie und Allergieforschung am AKH Wien.

Ich möchte mich herzlich bei meinem Betreuer Herrn Ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Walter Jäger bedanken, der mir die Arbeit am AKH-Wien ermöglicht und mich mit aller Unterstützung durch die Zeit der Diplomarbeit geführt hat.

Frau Ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Theresia Thalhammer möchte ich für die nette Aufnahme in ihre Abteilung und ihre freundliche Betreuung danken.

Vielen Dank auch an Mag. Martin Svoboda und Mag. Katrin Wlcek, die mir immer für Rat und Tat zur Seite gestanden sind.

Danke an alle Kollegen und Angestellten des Institutes für ihre Freundlichkeit.

Bei meiner Arbeitskollegin und Freundin Katharina Wagner bedanke ich mich für die nette Zusammenarbeit.

Meinen Eltern und meiner Familie gilt ein ganz besonderer Dank, da sie mich nicht nur finanziell, sondern auch mit viel Liebe, Geduld und Ermutigung während meiner gesamten Studienzeit liebevoll unterstützt haben!

Vielen Dank!

Kurzfassung

Leberkrebs ist eine der häufigsten Tumorerkrankungen weltweit, Männer sind doppelt so oft betroffen als Frauen. Der Grund für die hohe Sterblichkeitsrate liegt darin, dass Leberkrebs erst in einem sehr späten und fortgeschrittenen Stadium erkannt wird. Zudem ist er meist resistent gegen Chemotherapie. Die Effizienz zytostatischer Substanzen beruht weitgehend auf deren Konzentration in den Zellen, die wiederum unter anderem von der Aufnahme und dem Abtransport dieser Substanzen durch spezifische Wirkstofftransporter abhängt. Obwohl die Überexpression des ABC-Efflux Transporters zu erhöhten Transportraten aus der Zelle hinaus führt, könnte die intrazelluläre Wirkstoffakkumulation durch eine effektive Aufnahme mittels charakteristischer Aufnahmetransporter kompensiert werden. In dieser Hinsicht stellen die Transporter der Organic Anion Transporting Polypeptides (OATP) eine interessante Gruppe dar, da sie in der Lage sind ein breites Spektrum an vorwiegend anionischen, endogenen und exogenen Substanzen, die für eine Chemotherapie im klinischem Gebrauch sind, in verschiedene Zellen des menschlichen Körpers zu transportieren. In der Leber spielen sie eine wichtige Rolle in der Aufnahme, Verteilung, Metabolisierung und Ausscheidung von Arzneistoffen. Bis heute konnten 11 humane OATPs ermittelt werden. Das Ziel meiner Arbeit war, die Expression der OATP1B1 und OATP2A1, in gesunden und kranken Lebergewebe mittels Western Blot Analyse und anschließender Immundetektion zu ermitteln und die Daten mit vorhandenen Real Time PCR Ergebnissen zu vergleichen. Es konnte gezeigt werden, dass in der Membranfraktion dieser Tumore immunoreaktive Banden von OATP1B1 bei einem Molekulargewicht von 70 kDa aufscheinen. Die OATP1B1 Level waren in allen Patientenproben in normalem Gewebe höher als in malignem Gewebe. Immunoreaktive Banden des OATP2A1 konnten in der Membranfraktion bei einem Molekulargewicht von 50 kDa detektiert werden, während im Gesamtextrakt die immunoreaktive Fraktion bei einem Molekulargewicht von 50 kDa als auch bei 70 kDa sichtbar gemacht werden konnte. Zudem zeigten sich höhere Expressionslevel des 50 kDa OATP2A1 in malignem Gewebe während die Expressionslevel des 70 kDa Proteins in Normalgewebe höher erschienen. Bei beiden Transportern korrelierte die mRNA Expression mit den Ergebnissen der Proteinexpression. Zusammenfassend zeigt diese Arbeit individuelle Expressionsmuster von OATP1B1 und OATP2A1 in malignem und nicht-malignem Lebergewebe.

Abstract

Hepatocellular carcinomas are the sixth most common cause of cancer worldwide and these tumors are two-times more common in men than in women. One reason for the high mortality rate is that in most cases, hepatocellular carcinomas are recognized at advanced stage. Additionally, these tumors are highly resistant to standard chemotherapy regimens. The efficiency of any cytostatic drug therapy critically depends on the concentration of anticancer drugs in the cells which results from the uptake and efflux via specific drug transporters and the degree of biotransformation. Although overexpression of the ABC-efflux transporter leads to higher efflux rates of drugs out of cells, effective uptake by specific uptake-transporters may compensate to intracellular drug accumulation. The aim of my thesis was to investigate the expression levels of two organic anion transporting polypeptides (OATPs) in hepatic carcinomas in selected patients. The protein levels of the transporter OATP1B1 and 2A1 were studied in the cancerous and adjacent non-cancerous tissue using Western Blot Analysis. Samples were taken from primary hepatic carcinomas (hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma), as well as from liver metastases of malignant tumors of other tissues (colon carcinomas). It could be shown that in membrane fraction of these tumors, OATP1B1 immunoreactive bands were detectable at a molecular weight of 70 kDa. OATP1B1 levels were higher in normal than malignant tissue in all patient samples. OATP2A1 immunoreactive bands were detectable in membrane fractions at 50 kDa, while in a total protein extract immunoreactive fraction at 50 kDa as well as 70 kDa were observed. Higher expression levels of the 50 kDa OATP2A1 were observed in malignant tissue as compared to normal tissue, whereas expression levels of the 70 kDa protein were higher in normal than in the cancerous tissue. For both transporters, mRNA expression correlated with the amount of protein expression. In summary, this work shows a distinct expression pattern of OATP1B1 and OATP2A1 in cancerous and non-cancerous hepatic carcinomas. These data provide the base for further investigating on OATP-transporters and their role in the uptake of anticancer drugs in hepatocellular carcinomas. This might be important for improving the outcome of the chemotherapeutic treatment of hepatic cancer.

Inhaltsverzeichnis

1. PROBLEMSTELLUNG	3
2. EINLEITUNG	5
2.1. DIE MENSCHLICHE LEBER	5
2.1.1. Anatomie und Physiologie	5
2.1.2. Leberkrebs	6
2.1.2.1. Klassifizierung des Tumors.....	6
2.1.2.2. Ursachen und Risikofaktoren.....	8
2.1.2.3. Behandlungsmöglichkeiten	9
2.1.2.3.1. Kurative Therapie	10
2.1.2.3.2. Palliative Therapie	10
2.2. ASPEKTE DER WIRKSTOFFENTWICKLUNG	12
2.3. DIE TRANSPORTERFAMILIE OATP	14
2.3.1. Molekülstruktur	14
2.3.2. Klassifizierung und Nomenklatur	16
2.3.3. Funktion, physiologische Bedeutung und pharmakologische Aspekte	17
2.3.4. OATP Familienmitglieder und deren Funktionalität	18
2.3.5. Transportfunktion.....	24
2.3.6. Genetische Variationen – single nucleotide polymorphismen (SNP's), Haplotypen	25
2.3.7. OATPs und Krebs.....	29
3. MATERIAL UND METHODEN	31
3.1. PROBEN VON PATIENTEN	31
3.2. ISOLIERUNG VON ZYTOPLASMA- UND MEMBRANPROTEINEN	31
3.3. BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION	32
3.4. GELELEKTROPHORESE	34
3.4.1. Grundlagen.....	34
3.4.2. Sodium Dodecylsulfat - Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ..	35
3.4.3. Gießen des Gels.....	38
3.4.4. Probenvorbereitung	39
3.4.5. Elektrophoretische Auftrennung	40

3.5.	WESTERN BLOT	40
3.6.	IMMUNDETEKTION	43
3.7.	STRIPPEN DER MEMBRANEN	46
4.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	47
4.1.	VORPROBEN.....	49
4.1.1.	Bestimmung der Spezifität der Antikörper	49
4.1.2.	Durchführung.....	50
4.2.	PATIENTENPROBEN	56
4.2.1.	Expression von OATP1B1	58
4.2.1.1.	Nachweis von OATP1B1 und PDI in den Proben 21/1, 14/10, 16/7, 20/35.....	58
4.2.1.2.	Nachweis von OATP1B1 und PDI in den Proben 49/48, 37/2, 20/35.....	60
4.2.1.3.	Nachweis von OATP1B1 in den Proben 17/43, 49/48, 14/10, 27/22.....	62
4.2.1.4.	Nachweis von OATP1B1 und PDI in den Proben 40/44, 34/38, 42/23, 41/12.....	63
4.2.2.	Expression von OATP2A1	65
4.2.2.1.	Nachweis von OATP2A1 in den Proben 27/2, 26/39, 20/35, 49/48.....	65
4.2.2.2.	Nachweis von OATP2A1 und PDI in den Proben 31/18, 26/39, PRT/PRN, FMT/FMN.....	66
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	72
6.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	74
7.	TABELLENVERZEICHNIS	76
8.	APPENDIX A	78
9.	LITERATURVERZEICHNIS.....	81
10.	CURRICULUM VITAE	95

1. Problemstellung

Leberkrebs ist eine der häufigsten Tumorerkrankungen, deren Rate vor allem in den Zivilisationsgebieten des Westens stetig ansteigt. Eine entscheidende Rolle bei der Entstehung dieser Erkrankung spielen vorangegangene Schädigungen der Leber. Ein hepatozelluläres Karzinom entsteht häufig nach einer Leberzirrhose als Folge von chronischen Infektionen mit den Hepatitisviren B und C oder einer Schädigung der Leber durch Toxine und Karzinogene, wie z.B. Aflatoxine. Da eine kurative Therapie, das bedeutet eine Entfernung des Tumors mit oder ohne Transplantation einer neuen Leber und damit eine vollständige Heilung der Erkrankung aufgrund des Krankheitszustandes meist nicht möglich ist, sind palliative Therapiemöglichkeiten, die zumindest zu einer Verbesserung der Lebensqualität führen, von großer Bedeutung. Chemotherapien mit verschiedenen Medikamenten, die sich in der Therapie anderer Tumoren erfolgversprechend waren, haben sich bislang als wenig effektiv erwiesen und haben oft eine Chemotherapieresistenz als Ursache. Dabei wird die Resistenz durch eine ungenügende Akkumulation der Zytostatika in den Krebszellen verursacht. Um den Therapieerfolg zu verbessern, ist es daher essentiell, den Aufnahmemechanismus von Medikamenten in die Leberzelle und ihre Exkretion in Blut und Galle zu erforschen. Daher ist es das Ziel dieser Diplomarbeit, die Expression und Funktion spezifischer Membran-Transporter für Zytostatika in den Leberzellen zu untersuchen.

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

Das Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Expression der wichtigen OATPs, OATP1B1 und OATP2A1, in malignem und gesundem Lebergewebe auf Proteinebene zu untersuchen. Dabei sollen auch Unterschiede in der Expression in verschiedenen

Lebertumoren (hepatozelluläres und cholangiozelluläres Karzinom, Lebermetastasen von Kolontumoren und anderen Tumoren) bestimmt werden.

Die in der vorliegenden Diplomarbeit gewonnenen Resultate sollen dazu beitragen, neue Erkenntnisse über die Aufnahme von Zytostatika in Leberzelltumoren zu gewinnen. Dies könnte für die Weiterentwicklung von therapeutischen Konzepten für die Lebertumoren von großer Bedeutung.

2. Einleitung

2.1. Die menschliche Leber

2.1.1. Anatomie und Physiologie

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

Die Leber, die von der Glisson'schen Kapsel umgeben ist, befindet sich größtenteils im rechten Oberbauchraum und besteht aus zwei großen Leberlappen, wobei der rechte Leberlappen unter dem Zwerchfell liegt und teilweise mit diesem verwachsen ist. Er füllt fast den gesamten oberen Bauchraum aus, während der kleinere linke Lappen bis zur Mitte des linken Oberbauches reicht.

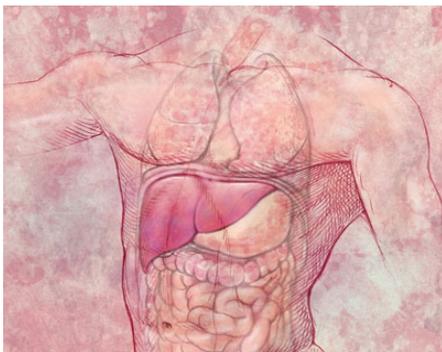


Abbildung 1: Anatomische Lage der Leber
[Österreichische Krebshilfe 2002]

Weiters lassen sich die Leberlappen in 8 Segmente bzw. Subsegmente unterteilen [Gupta et al. 1977].

Die Leber ist zwischen Pfortader und Leberarterie in den Blutkreislauf eingeschaltet. Während die Leberarterie sauerstoffreiches Blut zur Versorgung der Leberparenchymzellen (Hepatozyten) liefert, kommen durch die Pfortader alle mit der Nahrung in den Blutkreislauf gelangten Substanzen. Das heißt alle Nähr- und Giftstoffe, sowie Abbauprodukte aus dem Stoffwechsel anderer Organe und Hormone kommen über diesen Weg in die Leberzellen [Dancygier 2003].

Als zentrales Stoffwechselorgan des Körpers erfüllt die Leber wichtige Aufgaben. So ist sie in die Steuerung des Glukose-, Fett- und Eiweißstoffwechsels eingebunden, spielt als Entgiftungszentrale eine wichtige Rolle bei dem Abbau von Schadstoffen, Alkohol, Medikamenten und körpereigenen Stoffen, bildet Ausgangsprodukte für Sexualhormone, reguliert den Vitamin- und Spurenelement-Stoffwechsel etc. Zudem

besitzt die Leber eine ausgeprägte Fähigkeit zur Regeneration und kann als einziges Organ nach Verletzungen oder Operationen neues Gewebe nachbilden [Markus et al. 2000].

2.1.2. Leberkrebs

Unter dem Begriff Leberkrebs werden alle bösartigen Neubildungen und Geschwulsterkrankungen der Leber zusammengefasst. Die häufigste Form weltweit stellt mit 80-90% und über einer Million Neuerkrankungen pro Jahr, das Leberzellenkarzinom (hepatozelluläres Karzinom, HCC) dar, bei dem es zur Entartung der Leberzellen (Hepatozyten) kommt [Ishak et al. 1994, Ishak et al. 1999]. Das hepatozelluläre Karzinom hat die Tendenz entlang der Blutgefäße zu wachsen und in diese einzudringen [Ishak et al. 1994]. Selten ist eine andere Tumorart (10-20 % der Fälle), das intrahepatische cholangiozelluläre Karzinom, bei dem die Krebserkrankung von den Zellen der Gallengänge ausgeht [Ishak et al. 1994, Ishak et al. 1999]. Seltener kommt es zu Hepatoblastomen, Angiosarkomen und undifferenzierten Karzinomen. Als sekundäre Karzinome (nicht von dem Lebergewebe ausgehende bösartige Neubildungen) findet man oft Tochtergeschwülste (Metastasen) anderer bösartiger Tumore (z.B.: Darm-, Brust-, Lungenkrebs), die in die Leber entweder auf hämatogenen Weg gestreut haben oder aus benachbarten Organ eingewachsen sind [Kumar et al. 2003].

Leberkrebs wird oft nur im Rahmen einer Routineuntersuchung gefunden, da er zu Beginn seines Wachstums nur selten Beschwerden verursacht. Diese treten zumeist erst im fortgeschrittenen Stadium der Krankheit auf (Druckschmerz, Schwellung, Appetitlosigkeit, Übelkeit, Schwäche, rasche Gewichtsabnahme, Ikterus mit Gelbfärbung von Haut und Augen etc.) [Dixon 2003].

2.1.2.1. Klassifizierung des Tumors

Eine genaue Bestimmung des Tumors (Stadieneinteilung) ist für eine individuelle Therapieplanung essenziell. Die weltweit gebräuchlichste Methode ist die TNM-Klassifikation, die von Pierre Denoix in den Jahren 1943-1953 entwickelt wurde und definiert, wie weit sich der Krebs bereits ausgebreitet hat [Denoix 1946]. TNM wurde von der International Union Against Cancer (UICC) weiterentwickelt, um eine

weltweite Standardklassifizierung einzuführen. Die TNM Klassifikation wurde zudem auch von dem American Joint Committee on Cancer (AJCC) und der International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) verwendet. In 1987 wurden die UICC and AJCC Einteilungssysteme zu einem einheitlichen Klassifikationssystem zusammengeführt. Viele der am häufigsten vorkommenden Tumore besitzen ihre eigene TNM-Klassifikation [UICC 2009].

Tabelle 1: TNM-Klassifikation, Ziffern hinter den Buchstaben geben die Größe und Ausdehnung des Tumors an, die Anzahl und Lage der befallenen Lymphknoten und das Vorhandensein bzw. Fehlen von Metastasen [Österreichische Krebshilfe 2002].

T-Primärtumor	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Hinweis auf Primärtumor
T1	Einzelner Tumor < 2 cm, ohne Einbruch in die Gefäße
T2	Einzelner Tumor < 2 cm, mit Einbruch in die Gefäße oder mehrere Tumore in einem Lappen < 2 cm ohne Gefäßbefall oder einzelner Tumor > 2 cm ohne Befall der Gefäße
T3	Einzelner Tumor > 2 cm mit Befall der Gefäße oder mehrere Tumore in einem Lappen < 2 cm mit Gefäßbefall oder mehrere Tumore in einem Lappen mit mind. 1 Tumor > 2 cm mit oder ohne Gefäßbefall
T4	Mehrere Tumore in mehr als einem Lappen oder Tumor hat ein großes Gefäß befallen
N-regionale Lymphknoten	
NX	Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in den Lymphknoten nachweisbar (bis 2 cm)
M-Metastasen	
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen nachweisbar

Weiters ist es wichtig, die histologische Differenzierung des Krebsgewebes zu bestimmen. Damit kann auf die Aggressivität des Tumors und die Art des Leberkarzinoms geschlossen werden.

Liegt der Verdacht einer Leberkrebserkrankungen vor, so werden bei den entsprechenden Untersuchungen Gewebeprobe entnommen. Nach entsprechender Aufarbeitung des Gewebes wird ein histologischer Befund erstellt. Diese Untersuchungen ermöglichen eine genaue Planung der Behandlungsstrategien und -schritte.

2.1.2.2. Ursachen und Risikofaktoren

Die molekularen Faktoren, die zur Entwicklung eines Leberkrebses führen, sind nicht genau bekannt. Allerdings geht meist eine Gewebeum- bzw. Neubildung als Folge von zerstörtem Lebergewebe voraus [Farazi et al. 2006; Thorgeirsson et al. 2002; Bruix et al. 2004; Villanueva et al. 2007].

Es ist erwiesen, dass das hepatozelluläre Karzinom in den meisten Fällen auf Grund einer chronischen Lebererkrankung entsteht. Diese können als Folge von metabolischen und infektiösen Erkrankungen entstehen und entwickeln sich oft nach langjähriger Zirrhose [Ishak et al. 1999].

Hepatitisviren (HBV und HCV)

Wichtig sind dabei Infektionen mit Hepatitisviren HBV und HCV, die unbehandelt, häufig chronisch verlaufen und zur Leberzirrhose führen. Während HCV eher in den industrialisierten Ländern wie USA, Europa und Japan vorkommt, ist HBV in Entwicklungs- und Schwellenländern in Afrika und Asien nach wie vor verbreitet. HBV und HCV liegen bei ca. 75% aller HCC Erkrankungen vor [Pisani et al. 1990, Nishioka et al. 1991; Bruix et al. 1989; Colombo et al. 1989]. Der Zeitraum für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms in Patienten, die mit HCV infiziert sind, ist relativ lang (20-30 Jahre) und beinhaltet alle Stufen von milder chronischer Hepatitis bis zu schwerer chronischer Hepatitis, wobei sich über die Leberzirrhose schlussendlich ein HCC entwickelt [Montalto et al. 2002]. Epidemiologische Studien zeigen außerdem einen Zusammenhang von chronischen HBV-Erkrankungen und der Entwicklung eines HCCs [Beasley et al. 1981; McMahon et al. 1990; Chang et al. 1997].

Toxine

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

Alkohol

Ein weiterer Risikofaktor ist Alkoholmissbrauch. Bis jetzt konnte experimentell noch nicht gezeigt werden, dass Alkohol mutagen ist und somit direkt für neoplastische Degeneration verantwortlich ist. Nichtsdestotrotz ist er ein weiterer Faktor für die Entstehung eines HCC, da Alkohol bei der Entwicklung von Leberzirrhose eine wichtige Rolle spielt und somit die Entstehung eines HCC stark begünstigt [Montalto et al. 2002].

Die Anhäufung genetischer Veränderungen, die Zellen in einer zirrhotischen Leber entarten lässt, ist ein Prozess, der ausgehend von Stammzellen und reifen Hepatozyten über viele Stufen abläuft. Wie von Vogelstein (2004) beschrieben, entwickeln sich feste Tumore nach Unterbrechung mindestens dreier intrazellulärer Signalwege. Diese Unterbrechung ist das Ergebnis onkogener Aktivierung, die durch Punktmutationen, Veränderungen in der Genkopiezahl und/oder epigenetische Veränderungen bzw. Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen entsteht. Verlust der Heterozygotität (LOH, Loss of Heterozygosity), Punktmutationen, epigenetisches Silencing oder anormale Transkription dominanter-negativer Gene spielen eine Rolle [Vogelstein et al.2004]. Diese Veränderungen können als potentielle therapeutische Ziele in Betracht gezogen werden [Llovet und Bruix 2003a].

Weiters wurde in Studien gezeigt, dass HCC auch in manchen Familien gehäuft vorkommt. Bisläng konnte aber noch keine spezifischen Gene identifiziert werden, die mit einer Prädisposition für diese Tumoren assoziiert sind [Chiang et al. 2008; Lee et al. 2006; Boyault et al. 2007; Breuhahn et al. 2004].

2.1.2.3. Behandlungsmöglichkeiten

Das Leberzellenkarzinom stellt ein weltweites Gesundheitsproblem dar. Ein frühzeitiges Entdecken der Erkrankung ist für eine vollständige Heilung essenziell. Für die Wahl der Behandlung sind Ausdehnung, Lokalisation, Gefäßinvasion, Metastasierung und Stadium der Erkrankung entscheidend.

2.1.2.3.1. Kurative Therapie

Operation/Lebertransplantation

Die operative Entfernung des Tumors ist die Therapie der Wahl, sofern die Organfunktion aufrechterhalten werden kann. Dies ist allerdings nur in 10-20 % der Fälle möglich. Ist die Leber, beispielsweise durch eine Leberzirrhose, schon zu stark geschädigt, ist eine vollständige Entfernung mit anschließender Lebertransplantation Therapie der Wahl. Kommt eine Transplantation nicht in Frage, können palliative Behandlungsmethoden eingesetzt werden, um das Wachstum des Tumors zu bremsen, Beschwerden zu lindern und die Lebensqualität der Tumorerkrankten Patienten zu verbessern [Dixon 2003].

2.1.2.3.2. Palliative Therapie

Perkutane Ethanol-Injektion (PEI)

Unter Ultraschallkontrolle wird durch die Bauchdecke Ethanol in den Tumor gespritzt, der ein Absterben des Tumorgewebes bewirkt. Dieser Vorgang muss im Abstand von einigen Tagen mehrmals wiederholt werden [Dixon 2003].

Radiofrequenz-Thermoablation (RFTA)

Unter Ultraschallkontrolle wird durch die Bauchdecke eine Nadelelektrode in den Tumor gestochen, deren Spitze Radiofrequenzwellen ausstrahlt und das Tumorgewebe auf ca. 110 Grad Celsius erhitzt. Es kommt zum Absterben des Tumorgewebes. Diese Behandlung wird nur einmal durchgeführt [Dixon 2003].

Kryotherapie

Unter Ultraschallkontrolle wird durch die Bauchdecke eine Kältesonde eingeführt, die durch flüssigen Stickstoff das Tumorgewebe zerstört [Dixon 2003].

Transarterielle Chemoembolisation (TACE)

Hierbei wird ein Zytostatikum über einen in die Leberarterie eingeführten Katheter der Leber injiziert. Anschließend wird die Leberarterie mit einem Medikament, das lokal zur Thrombenbildung führt bzw. einem Gelatine-Schwammgemisch, vorübergehend verschlossen. Das Tumorgewebe stirbt dann ab [Dixon 2003].

Chemotherapie

Zytostatika beeinflussen Prozesse, die nicht nur in Krebszellen sondern auch in gesunden Zellen ablaufen. Zytostatika, die die Zellteilung beeinflussen, wirken an sich rasch teilenden Zellen am besten. Daher werden in den Tumoren vor allem die rasch teilenden Zellen abgetötet, während eine kleine Population von Tumorzellen, die sich nicht teilen, auch überleben. Diese resistenten Zellen entwickeln sich dann zu neuen, rasch wachsenden Tumoren. Daher haben medikamentöse Therapien bislang nur einen begrenzten Erfolg. [Dixon 2003].

Randomisierte, kontrollierte Studien, die transarterielle Chemoembolisation, intraarterielle und systemische Chemotherapie, hormonelle Behandlungen, Immunomodulatoren und interne bzw. externe Radiotherapie bewerten, wurden für das HCC durchgeführt [Llovet et al. 2003; Lopez et al. 2006]. Nur Chemoembolisation mit Gelfoam in Kombination mit Doxorubicin oder Cisplatin führte zu einer erhöhten Überlebenschance. Dies war einer der Gründe TACE als Standardtherapie für Patienten mit HCC im mäßig fortgeschrittenen Stadium einzusetzen [Bruix et al. 2005]. Bis 2006 gab es keinen Wirkstoff als Mittel der Wahl für Patienten mit fortgeschrittenen HCC, wobei 40-70% aller HCC Erkrankungen dazu zählen. Etliche systemische Therapieschemen z.B. die Chemotherapie mit Doxorubicin, Epirubicin, Cisplatin, etc., hormonelle Substanzen (Antiestrogene, Antiandrogene, Octreotide), Immunotherapie (Interferon) und andere Substanzen wie Nolatrexed, ein Hemmer der Thymidylatsynthase, Seocalcitol, ein Vitamin D ähnliches antiproliferatives Molekül und ein Tubulin-Inhibitor (T-67) zeigen in klinischen Studien negative bzw. nicht auswertbare Resultate [Llovet et al. 2003; Lopez et al. 2006].

Erst im Jahr 2007 konnte in einer international durchgeführten Studie gezeigt werden, dass der Multikinase-Inhibitor Sorafenib, mit antiangiogener und antiproliferativer Wirkung, das Fortschreiten des Tumorwachstums, durch Hemmung der Zellteilung und der Gefäßversorgung bei Patienten mit fortgeschrittenem HCC verhindert und somit die Gesamtüberlebenszeit verbessert. Zudem wurde Sorafenib insgesamt gut vertragen. Diese Effekte etablierten Sorafenib als first-line-Therapie

bei fortgeschrittenen hepatozellulären Karzinom, der Wirkstoff ist seit November 2007 unter dem Namen Nexavar® für die Behandlung des HCC zugelassen [Berlakovich et al. 2008, Llovet et al. 2008, Baminger 2009].

Viele weitere Substanzen sind derzeit noch in klinischer Austestung.

Um effektive Therapiemöglichkeiten gegen Leberkrebs zu finden, ist es essentiell den Transportmechanismus von Medikamenten in die Leberzelle und aus der Leber hinaus zu erforschen.

2.2. Aspekte der Wirkstoffentwicklung

Um effektive Wirkstoffe zur Behandlung von Tumoren zu finden, muss auch bedacht werden, dass diese in die Tumorzellen in entsprechender Konzentration in den Tumorzellen vorliegen müssen. Dazu bedarf es spezifischer Transportsysteme, die durch die Aufnahme durch die Zellmembran und die Abgabe aus der Zelle geregelt werden.

Nachdem sich ein oral aufgenommenes Medikament löst und die Wirkstoffe freiwerden, gelangen diese aus dem Darm in den Blutkreislauf und mit dem Pfortaderblut in die Leber [Tozer und Rowland 2006]. Die Elimination des Wirkstoffes erfolgt nach dessen Metabolisierung, die in der Leber aber auch in extrahepatischen Geweben erfolgt. Die finale Exkretion erfolgt durch die Leber wo die Substanzen mit der Galle ausgeschieden werden. Hydrophile Verbindungen werden über die Niere in den Harn ausgeschieden.

Während dieser Prozesse passiert ein Wirkstoffmolekül viele biologische Membranen. Das Ausmaß dieses Bewegungsmechanismus ist generell von den physikochemischen Eigenschaften des Wirkstoffes (Größe, Lipophilie, Ladung, Ionisationsgrad,...) abhängig. Zusätzlich spielen in der Wirkstoffbewegung Membrantransportproteine eine wichtige Rolle [Ho and Kim 2005].

Diese Membrantransportproteine lassen sich in zwei Superfamilien aufteilen: die *ATP-binding Cassette* (ABC) - Familie, die aktiv Substrate aus dem intrazellulären Kompartiment, unter direkter Verwendung der Energie aus der ATP Hydrolyse, hinauspumpt und die *Solute Carrier* (SLC) - Familie, die generell bidirektionalen

Substrattransport, unter Verwendung eines elektrochemischen Gradienten bzw. Ionengradienten (Na^+ , H^+ , etc.), vermittelt [Giacomini et al. 2005]. Diese Transporter sind normalerweise entweder an der basolateralen oder apikalen Membran der Hepatozyten lokalisiert, wobei das Zusammenspiel von Influx- (in die Zelle hinein) und Effluxtransporter (aus der Zelle heraus), gemeinsam mit dem Phase I und Phase II Metabolismus, für den fortlaufenden Wirkstofftransport an der basolateralen und apikalen Membranen wichtig sind [Giacomini and Sugiyama 2006]. Zum Beispiel sind OATP Aufnahmetransporter, wie der OATP1B1, 1B3, etc. in der Leber für die Aufnahme des Wirkstoffes aus dem Blutkreislauf in die Hepatozyten verantwortlich. Nach dessen Metabolisierung sind andere Wirkstofftransporter, wie die ABC Transporter MDR1, MRP2, BCRP, etc. für den Efflux des Metaboliten aus den Hepatozyten und die Ausscheidung in die Galle, essentiell [Ho and Kim 2005; Giacomini et al. 2005].

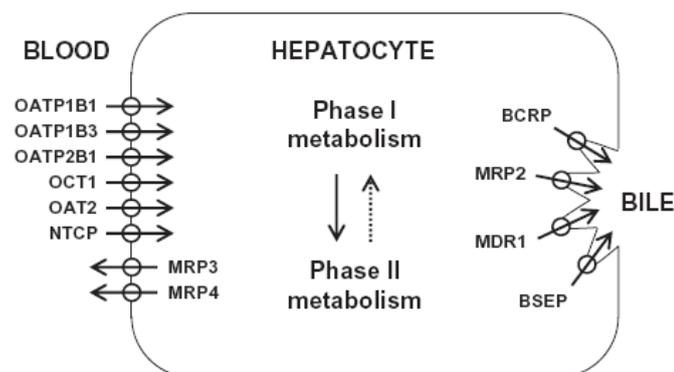


Abbildung 2: Rolle der verschiedenen Transporter bei der Aufnahme und Ausscheidung von Wirkstoffen und ihr Zusammenspiel mit dem Phase I und II Metabolismus in der hepatischen Elimination von Wirkstoffen [modifiziert nach Kalliokoski und Niemi 2009]

BCRP, breast cancer resistance protein; BSEP, bile salt export pump; MDR, multidrug resistance protein; MRP, multidrug resistance-associated protein; NTCP, sodium taurocholate co-transporting polypeptide; OAT, organic anion transporter; OATP, organic anion transporting polypeptide; OCT, organic cation transporter

2.3. Die Transporterfamilie OATP

Die *Organic Anion Transporting Polypeptides* (OATPs: beim Menschen, Oatps: bei Tieren) bilden eine Gruppe Natrium-unabhängiger Membrantransportproteine [Jacquemin et al. 1994; Kullak-Ublick et al. 1995; Noe et al. 1997; Walters et al. 2000], die den Transport von amphiphatischen organischen Anionen, einschließlich von Gallensäuren, Schilddrüsenhormonen, steroidalen Hormonen und deren Konjugaten, anionischen Oligopeptiden, Toxinen, Xenobiotika, Arzneistoffen wie z.B. Atorvastatin, Benzylpenizillin, Enalapril und Pravastin, vermitteln [Meier et al. 1997; Kullak-Ublick et al. 2000; Kullak-Ublick et al. 2001]. Generell zeigen alle OATP/Oatp Substrate unter physiologischen Bedingungen (mit wenigen Ausnahmen wie z.B. Gadoxetat) ein höheres Molekulargewicht (>450 kDa) und eine hohe Proteinbindung (hauptsächlich Plasmaalbuminbindung) [Hagenbuch und Meier 2003].

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

2.3.1. Molekülstruktur

OATPs sind Transmembranproteine die aus 643-722 Aminosäuren zusammengesetzt sind [Tamai et al. 2000; Lu et al. 1996; Kanai et al. 1995]. Sie weisen 12 transmembrale Domänen (TMD) auf. Jeder OATP/Oatp besitzt neben mehreren kleinen extra- und intrazellulären Domänen, eine große extrazelluläre Domäne zwischen TMD 9 und 10 (extrazellulärer Loop 5), die den Zinkfinger-Motiven DNA-bindender Proteine ähneln und mehrere N-Glykosylierungsstellen in Loop 2 und 5 [Hagenbuch und Meier 2004].

Experimente zeigten, dass die Glykosylierung für die Lokalisation des OATPs/Oatps in der Membran und für seine Transportfunktion essentiell sind [Lee et al. 2003]. Der extrazelluläre Loop 5 beinhaltet zehn konservierte Cystein-Reste [Hagenbuch und Meier 2003], die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind [Hänggi et al.

2006]. Diese Disulfidbrücken im Loop 5 sind für die Expression eines funktionellen Proteins an der Plasmamembran entscheidend [Hänggi et al. 2006]. Die durchgehend erhaltene „*Superfamilien-Signatur*“, das authentifizierende Merkmal der OATP Familie D-X-RW-(I,V)-GAWW-X-G-(F,L)-L liegt am Übergang des extrazellulären Loops 3 und der transmembralen Domäne 6 [Hagenbuch und Meier 2003]. Diese Struktur kann zur Identifizierung anderer OATPs/Oatps in verschiedenen Datenbanken verwendet werden.

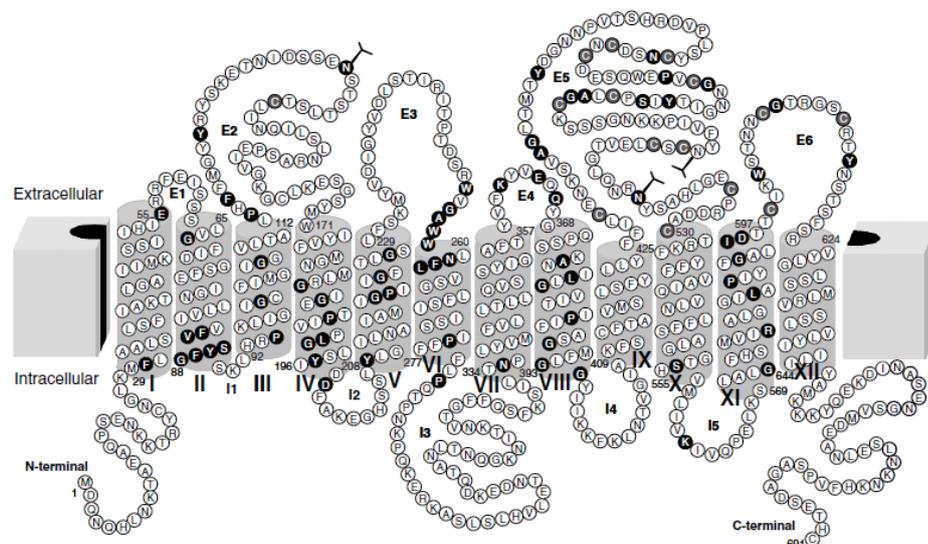


Abbildung 3: Transmembranmodell des humanen OATP1B1: Konservierte Aminosäuren sind schwarz, Cysteinreste sind grau dargestellt und drei N-Glykosylierungsstellen sind im extrazellulären loop 2 und 5 mit einem Y gekennzeichnet [Hagenbuch und Gui 2008]

OATPs/Oatps gehören zu der *SLC21/SLCO* (Solute Carrier Organic Anion Transporter Family) *Genfamilie* und damit zur Superfamilie der solute carrier class (SLC) Proteine [Hagenbuch und Meier 2004].

Der erste Oatp der SLC21/SLCO Genfamilie, Oatp1a1, wurde 1994 aus der Leber von Ratten isoliert und durch Expression in *Xenopus laevis* Oocyten charakterisiert [Jacquemin et al. 1994]. Nachfolgend wurden etliche OATPs/Oatps aus unterschiedlichen Spezies, einschließlich Mensch, Maus [Hagenbuch und Meier 2004; Mikkaichi et al. 2004], Kuh [Geyer et al. 2004], Pferd [Brown et al. 2007] und Wachtel [Nakao et al. 2006] bzw. OATP/Oatp-ähnliche Proteine aus anderen Spezies (Fruchtfliegen, Bienen, Nematoden, Katzenfisch, Zebrafisch, Frösche, Hühner und Schwein) isoliert. Bis jetzt konnten Oatps nur in Spezies lokalisiert

werden, die entweder zu den Protosomen oder Deuteriosomen gehören, jedoch nicht in Bakterien und Hefe [Hagenbuch und Meier 2004]. Der erste humane OATP, OATP1A2, wurde mittels Screening aus humaner Leber isoliert [Kullak-Ublick et al. 1995].

Bis heute wurden 36 verschiedene OATPs/Oatps in Säugetieren identifiziert, 11 davon im Menschen, und dem neuen Nomenklatorsystem folgend, sind sie in 6 Familien (OATP1-OATP6) eingeteilt [Hagenbuch und Meier 2003].

2.3.2. Klassifizierung und Nomenklatur

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

Tabelle 2: Neue und alte Gen- und Proteinomeklatur [modifiziert nach Hagenbuch und Meier 2004]

<i>Neuer Gen Name</i>	<i>Alter Gen Name</i>	<i>Neuer Protein Name</i>	<i>Alte Protein Namen</i>
SLCO1A2	SLC21A3	OATP1A2	OATP-A, OATP
SLCO1B1	SLC21A6	OATP1B1	OATP-C, LST-1, OATP2
SLCO1B3	SLC21A8	OATP1B3	OATP8, LST-2
SLCO1C1	SLC21A14	OATP1C1	OATP-F, OATP-RP5
SLCO2A1	SLC21A2	OATP2A1	hPGT
SLCO2B1	SLC21A9	OATP2B1	OATP-B, OATP-RP2
SLCO3A1	SLC21A11	OATP3A1	OATP-D, OATP-RP3
SLCO4A1	SLC21A12	OATP4A1	OATP-E, OATP-RP1
SLCO4C1	SLC21A20	OATP4C1	OATP-H
SLCO5A1	SLC21A15	OATP5A1	OATP-J, OATP-RP4
SLCO6A1	SLC21A19	OATP6A1	OATP-I, GST

Statt der Bezeichnung „SLC21/Slc21“, die nicht weiter in Subfamilien eingeteilt werden kann, wird der Term „SLC“ verwendet und mit einem „O“ für OATP/Oatp erweitert, wodurch nun der Term „SLCO/Slco“ zur Klassifizierung der Gene verwendet werden kann. Gene, beziehungsweise Proteine mit einer

Aminosäuresequenzübereinstimmung von >40% werden in Familien zusammengefasst und mit arabischen Nummern gekennzeichnet, z.B. SLCO1, SLCO2. Proteine, die eine Aminosäuresequenzübereinstimmung von >60% aufweisen, werden in Subfamilien zusammengefasst und durch Buchstaben gekennzeichnet, z.B. SLCO1A, SLCO1B. Werden die Subfamilien weiter unterteilt, werden nochmals arabische Nummern angefügt, basierend auf der Chronologie ihrer Identifikation, z.B. SLCO1B1, SLCO1B3 [Hagenbuch und Meier 2003]. Dieses System beschreibt eine sogenannte ‚open-end‘ Nomenklatur, an der bei weiteren Unterteilungsnotwendigkeiten nochmals Zahlen oder Buchstaben angehängt werden könnten. Um zwischen humanen und tierischen Proteinen zu unterscheiden werden die humanen OATPs in Großbuchstaben und die Oatps der tierischen Vertreter in Kleinbuchstaben geschrieben, wobei für die Unterscheidung der einzelnen Spezies deren Anfangsbuchstabe vorgestellt wird, z.B: mOatp (Maus), rOatp (Ratte) etc. [Hagenbuch und Meier 2003]. Sind mehrere Splicevarianten eines OATPs vorhanden, werden diese folgend mit Unterstrich und einem „v“ versehen, z.B: Oatp1a3_v1, Oatp1a3_v2 [Hagenbuch und Meier 2004].

2.3.3.Funktion, physiologische Bedeutung und pharmakologische Aspekte

Wie der Name bereits aussagt, sind Natrium-unabhängige OATPs/Oatps für den Transport anionischer organischer Verbindungen verantwortlich, wobei der Transportmechanismus bis jetzt noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Man nimmt an, dass es zu einem Austausch von Anionen kommt. Dabei ist die zelluläre Aufnahme von organischen Substanzen mit dem Efflux einer anderen Verbindung gekoppelt z.B. Bicarbonate, Glutathione und/oder Glutathion-S-Konjugate [Shi et al. 1995; Satlin et al. 1997; Li et al. 2000; Li et al. 1998].

Es scheint, dass es allen Mitgliedern der OATP/Oatp Superfamilie möglich ist, einen bidirektionalen organischen Substrattransport zu vermitteln. Die Richtung des Transports scheint von dem lokalen Konzentrationsgradienten des Substrates abhängig zu sein. Zusätzlich scheint der OATP/Oatp vermittelte Transport auch pH-abhängig und elektroneutral zu sein, was zumindest für einige OATPs nachgewiesen wurde [Satlin et al. 1997].

2.3.4. OATP Familienmitglieder und deren Funktionalität

OATP1 Familie

OATP1A2 (früher OATP-A genannt) ist der einzige humane Vertreter der OATP1A Subfamilie, die mehrere homologe Proteine in Ratte, Maus [Hagenbuch und Meier 2004] und Rind [Geyer et al. 2004] besitzt. Das SLCO1A2 Gen ist, zusammen mit allen anderen OATP1 Familienmitgliedern, in einem Cluster am Chromosom 12p12 lokalisiert [Hagenbuch und Meier 2003]. Der OATP1A2 Transporter besteht aus 670 Aminosäuren [Kullak-Ublick et al. 1995]. In der Leber hat dieser Transporter ein Molekulargewicht von 85 kDa [Kullak-Ublick et al. 1997], durch unvollständige Glykosylierung im Gehirn ein ungefähres Molekulargewicht von 60 kDa [Gao et al. 2000]. Ursprünglich wurde OATP1A2 aus Leber-cDNA-Libraries geklont. Die höchsten Expressionslevel wurden jedoch im Gehirn gefunden [Kullak-Ublick et al. 1995]. In der Leber ist er in den Cholangiozyten und in der Niere in den Bürstensäumen des distalen Nephrons exprimiert [Lee et al. 2005]. Er findet sich auch an der apikalen Membran der Enterozyten [Glaeser et al. 2007]. Er vermittelt den Transport einer Vielfalt endo- und exogener, hauptsächlich amphipathischer organischer Komponenten, wie Gallensäuren, Schilddrüsen- und Steroidhormonen und deren Konjugate, Eicosanoide, cyclische und lineare Peptide, Toxine, organische Kationen und einer Vielzahl von Wirkstoffen (siehe Tabelle 3).

OATP1B1 (OATP-C) wurde aus humanen Leber-cDNA-Libraries geklont [Tamai et al. 2000; Abe et al. 1999; Hsiang et al. 1999; König et al. 2000a] und ist ein Glykoprotein bestehend aus 691 Aminosäuren (ungefähres Molekulargewicht von 84 kDa, in der deglykosylierten Form circa 58 kDa) [König et al. 2000]. SLCO1B1 ist am Chromosom 12p12 lokalisiert [Hagenbuch und Meier 2003]. Der OATP1B1 wird als leberspezifischer Transporter bezeichnet [König et al. 2000a]. Neben den üblichen OATP/Oatp Substraten, transportiert OATP1B1 auch Arzneistoffe wie Benzylpenicillin, Pravastatin und Rifampicin und die natürliche Toxine Microcystin und Phalloidin (siehe Tabelle 3). OATP1B1 wird hauptsächlich in der basolateralen Plasmamembran der Hepatozyten exprimiert [Abe et al. 1999; Hsiang et al. 1999; König et al. 2000], wobei die Expression von dem Leber-spezifischen Transkriptionsfaktor HNF-1 α abhängt [Jung et al. 2001]. Seine Transportfunktion

wurde mithilfe von *Xenopus laevis* Oozyten [Abe et al. 1999; Kullak-Ublick et al. 2001], und OATP1B1-transfizierten HEK-293 Zellen charakterisiert [Hsiang et al. 1999; König et al. 2000; Tamai et al. 2000]. OATP1B1 ist einer der meist untersuchten und best-charakterisierten OATP Transporter der OATP Familie.

OATP1B3 (OATP8, LST-2) wurde wie OATP1B1 aus humanen Leber-cDNA-Libraries geklont [Abe et al. 2001; König et al. 2000]. Dieses Protein besteht aus 702 Aminosäuren, mit einem ungefähren Molekulargewicht von 120 kDa (deglykosyliert 65 kDa) [König et al. 2000a]. SLCO1B3 ist am Chromosom 12p12 lokalisiert [Hagenbuch und Meier 2003]. OATP1B3 weist eine 80%ige Aminosäuresequenzübereinstimmung mit OATP1B1 auf [Hagenbuch und Meier 2003] und wurde ebenfalls als ein leberspezifischer OATP eingestuft, dessen Expression an der basolateralen Membran der Hepatozyten im Bereich der Zentralvene am höchsten ist [Abe et al. 2001; König et al. 2000]. Zusätzlich wurde dieser Transporter in unterschiedlichen Tumorzelllinien und malignem Gewebe (Magen, Darm, Pankreas, Gallenblase, Lunge und Hirn) nachgewiesen [Abe et al. 2001]. Die hepatische Expression des OATP1B3 ist abhängig von HNF-1 α [Jung et al. 2001] und dem nuklären Rezeptor FXR der durch Gallensäuren aktiviert wird [Jung et al. 2002].

OATP1B3 hat eine ähnliche Substratspezifität wie OATP1B1, transportiert jedoch in den meisten Fällen mit geringerer Affinität. Zusätzliche Substrate sind das intestinale Peptid Cholecystokinin 8 (CCK-8), das opioide Peptid Deltorphin II, und das kardiale Glykosid Digoxin und Ouabain (siehe Tabelle 3). Seine Transportfunktion wurde, wie bei OATP1B1, mithilfe von *Xenopus laevis* Oozyten und transfizierten HEK-293 Zellen charakterisiert [Hagenbuch und Meier 2003].

OATP1C1 (OATP-F) ist der einzige humane Vertreter der OATP1C Subfamilie. Orthologe finden sich in Ratte und Maus [Hagenbuch and Meier 2003]. Er besteht aus 712 Aminosäuren und hat ein ungefähres Molekulargewicht von 78 kDa [Pizzagalli et al. 2002]. Das SLCO1C1 Gen ist Teil des OATP1 Clusters, der am Chromosom 12p12 lokalisiert ist [Hagenbuch und Meier 2003]. Die Expression dieses Transporters ist an der Blut-Hirn-Schranke und in den Leydig'schen Zellen der Testes am höchsten [Pizzagalli et al. 2002]. OATP1C1 transportiert nur eine sehr

geringe Anzahl an Substanzen, wie BSP (Bromosulfophtalein), Estradiol-17 β -glucuronid und Estrogen-3-sulfat (siehe Tabelle 3). Er besitzt eine sehr hohe Transportaffinität für die Schilddrüsenhormone T4 (Thyroxin) und rT3 (reverses Triiodthyronin) [Pizzagalli et al. 2002].

OATP2 Familie

OATP2A1 (PGT, Prostaglandintransporter) ist der einzige humane Vertreter der OATP2A Subfamilie. Orthologe finden sich in Ratte und Maus [Schuster 2002; Hagenbuch und Meier 2004]. Er besteht aus 643 Aminosäuren und hat ein ungefähres Molekulargewicht von 70 kDa [Hagenbuch und Meier 2003]. Das SLCO2A1 Gen ist auf Chromosom 3q21 lokalisiert. OATP2A1 wurde ursprünglich aus Nieren-cDNA-Libraries geklont [Lu et al. 1996] und ist in verschiedenen Geweben (Gehirn, Darm, Leber, Lunge, Ovarien, Placenta, Prostata, Milz und Dünndarm) exprimiert, wobei die Expression in Herz, Pankreas und Skelettmuskel am höchsten ist [Hagenbuch und Gui 2008]. OATP2A1 transportiert Prostaglandine und andere Eicosanoide [Hagenbuch und Meier 2003]. Es wird angenommen, dass er in Zellen, die Cyclooxygenase (COX) exprimieren, an der Regulation der perizellulären Prostaglandinlevel teilnimmt [Schuster 2002].

OATP2B1 (OATP-B) hat Orthologe in Maus und Ratte [Hagenbuch und Meier 2004]. Er wurde ursprünglich aus Nieren-cDNA-Libraries geklont [Tamai et al. 2000], besteht aus 709 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 85 kDa in Leber [Kullak-Ublick et al. 2001], Plazenta [St-Pierre et al. 2002] und Herz [Grube et al. 2006b], und ein Molekulargewicht von ungefähr 95 kDa im Ziliarkörper [Gao et al. 2005]. Im Gehirn variiert das Molekulargewicht zwischen 84 und 95 kDa. Das ist auf eine unterschiedliche Glykosylierung des OATP2B1s zurückzuführen [Bronger et al. 2005]. SLCO2B1 ist am Chromosom 11q13 lokalisiert [Hagenbuch und Meier 2003]. Der OATP2B1 wird in humanen Gewebe ubiquitär exprimiert, zum Beispiel an der basolateralen Membran der Hepatozyten [Kullak-Ublick et al. 2001], der Basalmembran der Syncytiotrophoblasten [St-Pierre et al. 2002], den Endothelzellen der Kapillaren und Venen im Herz [Grube et al. 2006], der luminalen Membran der Endothelzellen im Gehirn [Bronger et al. 2005], der basolateralen Membran nicht-pigmentierter Epithelien des Ziliarkörpers [Gao et al. 2005], dem Bürstensaum des

Dünndarms [Kobayshi et al. 2003] und der apikalen Membran von Caco2 Zellen [Sai et al. 2006]. Bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 transportiert er nur ein kleines Spektrum an Substraten, wie BSP, Estron-3-sulfat und DHEAS (Dihydroepiandrosteron-3-sulfat). Bei saurem pH-Wert kommt der zusätzliche Transport von Taurocholat, Fexofenadin, Statinen und Glibenclamid hinzu (siehe Tabelle 3).

OATP3 Familie

OATP3A1 (OATP-D) hat Orthologe in Maus und Ratte, wobei eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von 97% vorliegt [Hagenbuch und Meier 2004]. SLCO3A1 ist am Chromosom 15q26 lokalisiert [Hagenbuch und Meier 2003]. Bei diesem OATP werden zwei verschiedene Splice-Varianten exprimiert wobei die kürzere Variante OATP3A1_v1 (18 Aminosäuren des Carboxylterminus fehlen) primär in den Testes und Gehirn zu finden ist und die längere Variante OATP3A1_v2 eher ubiquitär exprimiert ist [Huber et al. 2007]. Diese zwei Proteine bestehen aus 710 und 692 Aminosäuren, mit einem Molekulargewicht von ungefähr 76 und 74 kDa [Hagenbuch und Gui 2008]. Ursprünglich wurden sie aus Nieren [Tamai et al. 2000] bzw. dem Gehirn [Huber et al. 2007] geklont. Für funktionelle Analysen wurden OATP3A1_v1 und OATP3A1_v2 in *Xenopus laevis* Oocyten und CHO Zellen exprimiert [Huber et al. 2007]. Beide Varianten sind für den Transport von Prostaglandinen, Schilddrüsenhormonen, dem cyclische Peptid BQ-123 und Vasopressin verantwortlich (siehe Tabelle 3).

OATP4 Familie

OATP4A1 (OATP-E), mit Orthologen in Ratte und Maus [Hagenbuch und Meier 2004] besteht aus 722 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ungefähr 65 kDa [Sato et al. 2003]. SLCO4A1 ist auf Chromosom 20q13.33 lokalisiert [Hagenbuch und Meier 2003]. OATP4A1 wurde ursprünglich aus Niere und Gehirn geklont und wird ubiquitär exprimiert. Die höchsten Expressionsraten finden sich in Herz, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Nieren und Pankreas [Tamai et al. 2000; Fujiwara et al. 2001]. Seine Substrate umfassen Estron-3-sulfat, Estradiol-17 β -glucuronid, Benzylpenicillin, Schilddrüsenhormonen und Taurocholat (siehe Tabelle 3).

OATP4C1 (OATP-H) ist ein Nierenspezifischer Transporter und hat Orthologe in Maus und Ratte [Hagenbuch und Meier 2004; Mikkaichi et al. 2004]. Dieses Protein besteht aus 724 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ungefähr 79 kDa. SLCO4C1, ist auf Chromosom 5q21.2 lokalisiert [Hagenbuch und Gui 2008]. OATP4A1 besitzt eine geringe Substratspezifität und transportiert Digoxin, Ouabain, Tyroxin, Methotrexat, cAMP und den dipeptidischen Peptidase-4-Inhibitor Sitagliptin (siehe Tabelle 3). Darüber hinaus scheint der OATP4C1 eine wichtige Rolle bei dem Transport von Schilddrüsenhormonen in die Nieren zu spielen [Hagenbuch und Meier 2004].

OATP5 Familie

OATP5A1 (OATP-J) ist der einzige humane Vertreter der OATP5A Subfamilie mit Orthologen in Ratte und Maus. [Hagenbuch und Meier 2004]. Er besteht aus 848 Aminosäuren, sein Molekulargewicht beträgt ungefähr 92 kDa. SLCO5A1 ist auf Chromosom 8q13.3 lokalisiert [Hagenbuch und Gui 2008]. Bisher sind nur RT-PCR Ergebnisse über die Expression des OATP5A1 bekannt. So zeigten sich Expressionslevel im Normalgewebe von Skelettmuskel, Herz und fötalem Gehirn [Okabe et al. 2008].

OATP6 Familie

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

Tabelle 3: Substrate der humanen OATPs [Hagenbuch und Gui 2008]

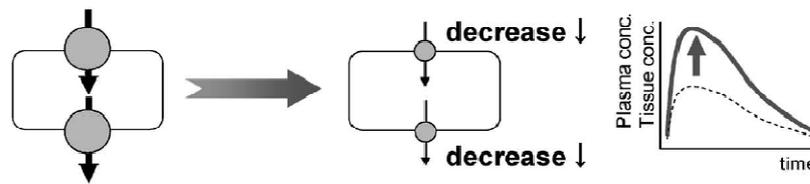
Substrat	OATP							
	1A2	1B1	1B3	1C1	2B1	3A1	4A1	4C1
Amanitin			+					
APD-Ajmalin	+							
Arsen		+						
Atorvastatin		+			+			
Atrasentan	+	+	+					
Bamet-R2	+	+						
Bamet-UD2	+	+						
Benzylpenicillin		+			+	+	+	
Bilirubin	+	+	+					
Bosentan		+	+		+			
BQ-123	+	+	+			+		
Bromosulfophthalein	+	+	+	+	+			
Capsfungin		+						
Cerivastatin		+						
Cholat	+	+	+					
Ciprofloxacin	+							
CRC220	+							
Dehydroepiandrosteron-3-sulfat	+	+	+		+			
Deltorphin II	+		+			+		
Digoxin			+					+
[D-penicillamine _{2,5}]enkephalin	+	+	+					
Enalapril		+	+					
Fexofenadin	+		+		+			
Fluvastatin		+	+		+			
Glibenclamid					+			
Glutathion			+					
Gd-B20790	+							
Glycocholat	+		+					
Leukotrien C4			+					
Levofloxacin	+							
Lomefloxacin	+							
Methotrexat	+		+					+
Microcystin	+		+					
N-methylquinidin	+							
N-methylquinin	+							
Olmesartan			+					
Oestradiol-17 β -glucuronid	+	+	+	+			+	
Oestron-3-sulfat	+	+	+	+	+	+	+	
Ouabain	+		+					+
Paclitaxel			+					
Phalloidin		+	+					
Pitavastatin	+	+	+		+			
Pravastatin		+			+			
Prostaglandin E2	+	+			+	+	+	
Reverses Triiodothyronin	+			+			+	
Rifampicin		+	+					
Rocuronium	+							
Rosuvastatin	+	+	+		+			
Saquinavir	+							
Taurocholat	+		+		+		+	
Taurochenodeoxycholat	+		+					
Tauroursodeoxycholat	+	+	+					
Telmisartan			+					
Thyroxin	+	+	+	+		+	+	+
TR-14035	+	+	+					+
Triiodothyronin	+	+	+	+			+	
Troglitazone sulfat		+						
Unoproston Metabolit	+				+		+	
Valsartan			+					
Vasopression						+		

2.3.5. Transportfunktion

OATPs regulieren die zelluläre Aufnahme einer großen Anzahl an endogenen Komponenten und klinisch relevanten Wirkstoffen [Niemi 2007]. Von den 11 humanen OATPs wurden die OATP1B1, 1A2, 1B3 und 2B1 bezüglich Pharmakokinetik am häufigsten untersucht und am besten charakterisiert. OATP1A2 dürfte für den Übergang seiner Substrate durch die duodenale Wand in den Blutkreislauf verantwortlich sein [Glaeser et al. 2007]. OATP1B1, 1B3 und 2B1 sind hauptsächlich an der sinusoidalen Membran der Hepatozyten lokalisiert und vermitteln den Einstrom ihrer Substrate aus dem Blut in die Hepatozyten. Dies scheint, zusätzlich zu Metabolisierung bzw. biliärer Exkretion ein wichtiger Schritt in der fortschreitenden Eliminierung von Wirkstoffen zu sein [Niemi 2007].

Etlliche Studien haben gezeigt, dass Modifikationen in den OATPs pharmakokinetische Änderungen hervorgebracht, und das Ausmaß pharmakologischer und toxikologischer Effekte verändert haben. Diese funktionellen Veränderungen beeinflussen nicht nur die Wirkstoffkonzentration im Blut, und damit die Bioverfügbarkeit des Substrates, sondern auch die Toxizität. Verminderte Transportkapazität in den Hauptausscheidungsorganen Leber und Niere führt zu einer erhöhten Plasmakonzentration und damit zu einer erhöhten Wirkstoffexposition zu den anderen Organen. Erhöhte Wirkstoffkonzentrationen im Gewebe kann infolge erhöhter Aufnahmeaktivität bzw. vermindertem Efflux der modifizierten Transporter beobachtet werden [Maeda und Sugiyama 2008].

Erniedrigte Transportaktivität von Transportern in Ausscheidungsorganen (Leber, Niere) → Erhöhung in Plasma- und Gewebeskonzentration



Erhöhte Aufnahmeaktivität oder verminderte Effluxaktivität von Transportern in pharmakologischen Zielorganen (Hirn etc.) → Erhöhung in Konzentration

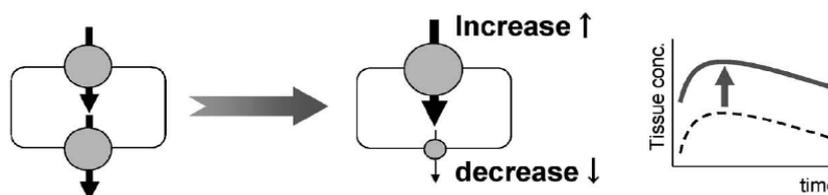


Abbildung 4: Das Ergebnis einer funktionellen Änderung in der Transportaktivität auf pharmakologische und toxikologische Effekte von Wirkstoffen. [Maeda und Sugiyama 2008]

Da die Aufnahme von Wirkstoffen in Zellen ausschlaggebend für deren therapeutischen Effekt ist, ist es notwendig, modifizierte Funktionen, Drug-Drug Interactions (Inhibition/Induktion) bzw. Drug-Food Interactions genau zu untersuchen.

Etliche Wirkstoffe sind in der Lage OATP Transporter zu inhibieren und somit pharmakokinetische drug-drug interactions auszulösen. Auch genetische Variationen in Genen, die für die Codierung von OATP Transporter zuständig sind, verursachen inter-individuelle Unterschiede in der Pharmakokinetik. Diese Tatsache hat klinisch signifikante Auswirkungen auf die Wirkstofftherapie.

2.3.6. Genetische Variationen – single nucleotide polymorphismen (SNP's), Haplotypen

Die Gene, die für die Codierung der humanen OATP1 Familienmitglieder verantwortlich sind, sind auf dem kurzen Arm des Chromosoms 12 lokalisiert, wobei die Gene, die für die Codierung anderer OATP Familienmitglieder zuständig sind, auf den Chromosomen 3, 5, 8, 11, 15 und 20 lokalisiert sind. Unzählige Variationen der Sequenzen in den einzelnen OATPs, sogenannte Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs) bzw. Haplotypen, wurden in den SLCO Genen identifiziert, wobei diese zwischen den einzelnen ethnischen Populationen stark variieren [Tirona et al. 2001; Niemi et al. 2004; Lee et al. 2005; Niemi 2007; Pasanen et al. 2008].

Tabelle 4: Polymorphismen, Allele und Aminosäurenaustausch in SLCO Genen [modifiziert nach König et al. 2006]

OATP	Allele	Polymorphismus oder Haplotyp	Aminosäurenaustausch	Referenz
OATP1A2	SLCO 1A2*1	NM_134431		Lee et al. (2005)
	SLCO 1A2*2	38T>C	Ile13Thr	Lee et al. (2005)
	SLCO 1A2*3	516A>C	Glu172Asp	Lee et al. (2005)
	SLCO 1A2*4	559G>A	Ala187Thr	Lee et al. (2005)
	SLCO 1A2*5	382A>T	Asn128Tyr	Lee et al. (2005)
	SLCO 1A2*6	404A>T	Asn135Ile	Lee et al. (2005)
	SLCO 1A2*7	2003C>G	Thr668Ser	Lee et al. (2005)
OATP1B1	SLCO1B1 *1a	AB026257; AJ132573		König et al. (2000a); Nozawa et al. (2002)
	SLCO1B1 *1b	388A>G	Asn130Asp	Hsiang et al. (1999); Tirona et al. (2001); Nozawa et al. (2002)
	SLCO1B1 *1c	455G>A, 721G>A	Arg152Lys; Asp24Asn	Abe et al. (1999); Nozawa et al. (2002)
	SLCO1B1 *1e	-11110T>G	Promotor	Niemi et al. (2004)
	SLCO1B1 *2	217T>C	Phe73Leu	Tirona et al. (2001); Nishizato et al. (2003)
	SLCO1B1 *3	245T>C, 467A>G	Val82Ala; Glu156Gly	Tirona et al. (2001)
	SLCO1B1 *4	463C>A	Pro155Thr	Tirona et al. (2001) Nishizato et al. (2003)
	SLCO1B1 *5	521T>C	Val174Ala	Tamai et al. (2000); Tirona et al. (2001) Nozawa et al. (2002)
	SLCO1B1 *6	1058T>C	Ile353Thr	Tirona et al. (2001)
	SLCO1B1 *7	1294A>G	Asn432Asp	Tirona et al. (2001)
	SLCO1B1 *8	1385A>G	Asp462Gly	Tirona et al. (2001)
	SLCO1B1 *9	1463G>C	Gly488Ala	Tirona et al. (2001)
	SLCO1B1 *10	1964A>G	Asp655Gly	Tirona et al. (2001)
	SLCO1B1 *11	2000A>G	Glu667Gly	Tirona et al. (2001)
	SLCO1B1 *12	217T>C, 1964A>G	Phe73Leu; Asp655Gly	Tirona et al. (2001)
	SLCO1B1 *13	245T>C, 467A>G, 2000A>G	Val82Ala; Glu156Gly; Glu667Gly	Tirona et al. (2001)
	SLCO1B1 *14	388A>G, 463C>A	Asn130Asp; Pro155Thr	Tirona et al. (2001)
	SLCO1B1 *15	388A>G, 512T>C	Asn130Asp; Val174Ala	Nozawa et al. (2002)
SLCO1B1 *15B	388A>G, 521T>C, 1007C>G	Asn130Asp; Val174Ala; Pro336Arg	Kameyama et al. (2005)	
SLCO1B1 *16	452A>G	Asn151Ser	Iida et al. (2001); Nishizato et al. (2003)	
SLCO1B1 *17	-11187G>A, 388A>G, 521T>C	Asn130Asp; Val174Ala	Niemi et al. (2004)	
SLCO1B1 *18	388A>G, (411G>A), 463C>A, (571T>C), 578T>G	Asn130Asp; Pro155Thr; Leu193Arg	Niemi et al. (2004)	

Tabelle 4 fortlaufend: Polymorphismen, Allele und Aminosäurenaustausch in SLCO Genen [modifiziert nach König et al. 2006]

OATP	Allele	Polymorphismus oder Haplotyp	Aminosäurenaustausch	Referenz
	SLCO1B1 *19	(597C>T), 1929A>C	Leu643Phe	Niemi et al. (2004)
	SLCO1B1 *20	388A>G, (597C>T), 1929A>C	Asn130Asp; Leu643Phe	Niemi et al. (2004)
	SLCO1B1 *21	-11187G>A, 388A>G, (597C>T), 1929A>C	Asn130Asp; Leu643Phe	Niemi et al. (2004)
OATP2B1	SLCO2B1*1	NM_007256		Tamai et al. (2000); Nozawa et al. (2002)
	SLCO2B1*2	1175C>T	Thr392Ile	Nozawa et al. (2002); Niemi et al. (2004)
	SLCO2B1*3	1457C>T	Ser486Phe	Tamai et al. (2000); Nozawa et al. (2002); Niemi et al. (2004)

388A > G (Asn130Asp) SNP ist in allen Populationen relativ häufig zu finden, wobei der 521T > C (Val174Ala) SNP, der eher bei Europäern und Asiaten verbreitet ist, seltener bei Afroamerikanern zu finden ist [Pasanen et al. 2008]. Es ist wahrscheinlich, dass es durch diese Polymorphismen zu signifikanten Änderungen in der Pharmakokinetik eines Wirkstoffes kommt, beispielsweise durch verringerte Aufnahmeaktivität des entsprechenden OATP [König et al. 2006; Seithel et al. 2008].

So wurden in verschiedenen Zelllinien *in vitro*, unter Verwendung unterschiedlicher OATP1B1 Substrate, SLCO1B1*5 und SLCO1B1*15 Haplotypen mit reduzierten OATP1B1 Transportaktivitäten in Verbindung gebracht [Kameyama et al. 2005; Nozawa et al. 2005]. Der SLCO1B1*1B Haplotyp zeigte eine erhöhte OATP1B1 Transportaktivität *in vitro*, unter Verwendung von Bromosulfophtalein und Estron-3-Sulfat [Michalski et al. 2002; Kameyama et al. 2005], wobei es in anderen Studien, unter Verwendung anderer Substrate zu keinen Änderungen der Transportaktivität gekommen ist [Tirona et al. 2003; Nozawa et al. 2005].

Weiters bewirkt der SNP 521T > C (Val174Ala) in dem SLCO1B1, das für die Codierung des OATP1B1 verantwortlich ist, dass OATP1B1 Simvastatin aktiv aus dem portalen Blutkreislauf in die Leber transportiert, mit dem Ergebnis einer erhöhten Plasmakonzentration an Simvastatin und einem gesteigerten Risiko von Simvastatin-

induzierter Myopathie und Rhabdomyolyse [Pasanen et al. 2006; Link et al. 2008; Furihata et al. 2009; Morimoto et al. 2004].

HMG-CoA Reduktase Hemmer stellen geeignete OATP1B1 Substrate dar und vermitteln durch Inhibierung der HMG-CoA Reduktase in der Leber einen Cholesterolsenkenden Effekt. So zeigte sich, dass es in den Hepatozyten von Trägern des *17 Allels (-11187G >A + 338A > G + 521T > C) zu einer verringerten Aufnahme des HMG-CoA Reduktasehemmers Pravastatin kommt, das wiederum zu einer verringerten Inhibierung der Cholesterolsynthese führt und somit Cholesterolsenkende Effekte verringert [Niemi et al. 2005]. Im Gegensatz dazu hat eine 521T > C Mutation im OATP1B1 keinen Einfluss auf die Cholesterolsenkenden Effekte bei einer Langzeittherapie mit Pravastatin in Hypercholesterolemischen Patienten [Igel et al. 2006; Takane et al. 2006].

SLCO1B1 Polymorphismen beeinträchtigen auch die Pharmakokinetik vieler anderer Statine (außer Fluvastatin) und die des Antidiabetikum Repaglinid, des Antihistaminikum Fexofenadin, des Endothelin A Rezeptorantagonisten Atrasentan und des Diuretikum Torsemid [Niemi et al. 2005b; Kalliokoski et al. 2008 a,b,c; Niemi et al. 2006; Niemi et al. 2005 a; Katz et al. 2006; Vormfelde et al. 2008].

Bis heute wurden über 40 verschiedene Mutationen des SLCO1B1 identifiziert.

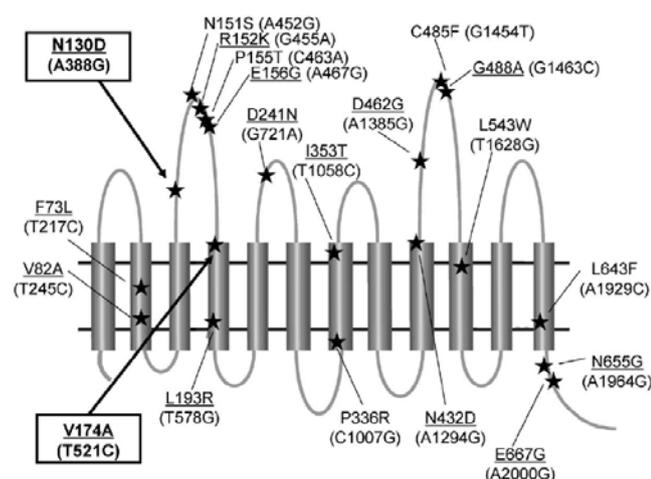


Abbildung 5: Genetische Polymorphismen des OATP1B1 [Maeda und Sugiyama 2008]

2.3.7. OATPs und Krebs

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

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

OATPs werden weitgehend in humanem Gewebe exprimiert, die meisten Mitglieder ubiquitär. Sie spielen eine fundamentale Rolle in der Aufnahme von diversen Substraten in die Zellen, als auch deren Exkretion und damit verbundenen Körperentgiftung.

Es wurden viele Studien entwickelt, bei denen die Expression der verschiedenen OATPs in unterschiedlichem malignem Gewebe untersucht wurde. So zeigte sich beispielsweise eine Expression des OATP1A2, OATP3A1, OATP4A1/4C1 und OATP5A1 in Brustkrebs [Miki et al. 2006; Nozawa et al. 2004; Pizzagalli et al. 2003, Wlcek et al. 2008], eine Expression des OATP6A1 in Lungen-, Blasen- und Speiseröhrenkrebs [Lee et al. 2004], eine Expression des OATP1B3 in Brustkrebs [Muto et al. 2007], Lungenkrebs und gastrointestinalen Tumoren [Abe et al. 2001; Cui et al. 2003] und eine überregulierte Expression des OATP4A1 bei Darmkrebs [Ancona et al. 2006]. So stellte sich heraus, dass die Mehrheit der OATPs zumindest in einem malignem Gewebe bzw. einer Krebszelllinie exprimiert wird.

Basierend auf ihrer Multispezifität und Fähigkeit zytotoxische Substanzen wie Methotrexat und Paclitaxel zu transportieren, wären OATP1A2, OATP1B1 und OATP1B3 geeignete Kandidaten um eine Aufnahme von Anti-Krebs-Medikamenten in Tumorzellen zu vermitteln. Eine systematische Untersuchung der einzelnen

OATPs, welcher OATP in welchem Tumor exprimiert wird und welche Anti-Krebs-Medikamente die verschiedenen OATP transportieren, könnte brauchbare Informationen bezüglich wirksamer Therapiemöglichkeiten einbringen [Hagenbuch und Gui 2008]. Es muss dabei aber auch bedacht werden, dass es bei vermehrter Expression der Transporter zu erhöhter Aufnahme von Anti-Krebs-Medikamenten kommt, und somit auch die Möglichkeit besteht, dass vermehrt Wachstumsfaktoren und Hormone in die Zellen transportiert werden, das ein Wachstum des Tumors begünstigt.

3. Material und Methoden

3.1. Proben von Patienten

Für diese Studie wurden die Einwilligungserklärungen der Patienten eingeholt. Die Studie wurde auch durch die Ethikkommission der Institution bewilligt.

Es wurden zwanzig Proben von malignen Gewebe und dem normal erscheinenden Resektionsrand der Lebertumoren untersucht. Die Proben stammen von Patienten, die sich einer Operation aufgrund einer Lebertumorerkrankung unterzogen hatten.

Informationen über Tumorgrad, Tumorstadium, Geschlecht und Alter der Patienten wurden der Krankengeschichte der Patienten entnommen.

Insgesamt wurden Proben von neun männlichen (n=9) und elf weiblichen (n=11) Patienten verwendet. Drei dieser Patienten leiden an einem hepatozellulären Karzinom HCC, vier an dem fibrolamellaren Subtyp des HCC. Vier Patienten leiden unter einem Cholangiokarzinom, sieben an Metastasen eines Adenokarzinoms, einer an einem schwach differenzierten adenosquamotischen Karzinom (Metastase eines Blinddarmkarzinoms) und ein Patient leidet unter Metastasen eines Testes-Tumor in seiner Leber. Eine exakte Patienteninformation ist in Tabelle 5 aufgelistet.

3.2. Isolierung von Zytoplasma- und Membranproteinen

Material

- ProteoJet™ Extraction Kit (Fermentas, St- Leon-Rot, DE)
- Reibschale + Pistill
- Flüssiger Stickstoff (AGA Medizinische Gase, Wien)
- Eppendorfgefäße
- Pipetten (Eppendorf)
- Proteaseinhibitor Cocktail (Sigma, P8340)
- Thermomixer Comfort (Eppendorf AG, Hamburg, DE)
- Zentrifuge 5415 R (Eppendorf AG)

Die Membranproteine und zytoplasmatischen Proteine werden aus den Leberproben unter Verwendung des „ProteoJet™ Extraction Kit“ gemäß der Anweisung des Herstellers isoliert. Hierzu entnimmt man 20-40 mg gefrorenes Gewebe und zermahlt dieses in einer mit flüssigem Stickstoff gefüllten und gekühlten Petrischale. Die zerriebene Masse wird in ein Plastikgefäß übergeführt und nach vollständigem Verdampfen des Stickstoffes wird mit 1,5 ml ProteoJet™ Cell Permeabilization Buffer + 15 µl Proteaseinhibitor versetzt. Nach Auftauen wird das Gemisch in ein Eppendorfgefäß übergeführt. Um einen besseren Zellaufschluss zu erreichen, wird die Suspension 10 min bei einer Temperatur von 4°C im Thermomixer bei 14000 rpm homogenisiert und anschließend 15 min bei 4°C in der Zentrifuge x 16000 g zentrifugiert. Der Überstand wird mittels Pipette in ein neues Eppendorfgefäß übergeführt. Dieser enthält die zytoplasmatischen Proteine, die Kerne bleiben im Sediment. Dieses wird mit einer Mischung von 1 ml ProteoJet™ Membrane Protein Extraction Buffer + 5 µl Proteaseinhibitor versetzt und das Pellet wird resuspendiert. Anschließend wird wieder 30 min bei 4°C im Thermomixer bei 14000 rpm homogenisiert und darauffolgend 15 min bei 4°C x 16000 g zentrifugiert. Der Überstand wird nochmals abgenommen und enthält die gewünschten Membranproteine. Die Proteinlösungen werden bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C aufbewahrt.

3.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

Um eine exakte Auftrennung der Proteine während der Gelelektrophorese zu ermöglichen, ist es notwendig, pro Gel jeweils die gleiche Menge an Protein aufzutragen. Hierfür ist es notwendig, die Konzentration der Proteine im Extrakt zu bestimmen.

Die Quantifizierung erfolgt mittels „Micro BCA Protein Assay Reagent Kit“ (siehe Materialliste) und beruht auf der Komplexbildung zwischen Cu^+ und Biscinchoninsäure (BCA). Proteine, die Cystein, Cystin, Tryptophan oder Tyrosin enthalten, reduzieren im alkalischen Milieu zweiwertiges Kupfer zu einwertigem Kupfer (Biuret-Reaktion), das mit BCA reagiert. Dabei entsteht ein violett gefärbtes Produkt, das bei einem Absorptionsmaximum von 562 nm vermessen werden kann. Der „BCA Proteinbestimmungs Assay“ zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit

und geringe Störanfälligkeit aus. Lediglich Reduktionsmittel und Komplexbildner beeinflussen die Reaktion.

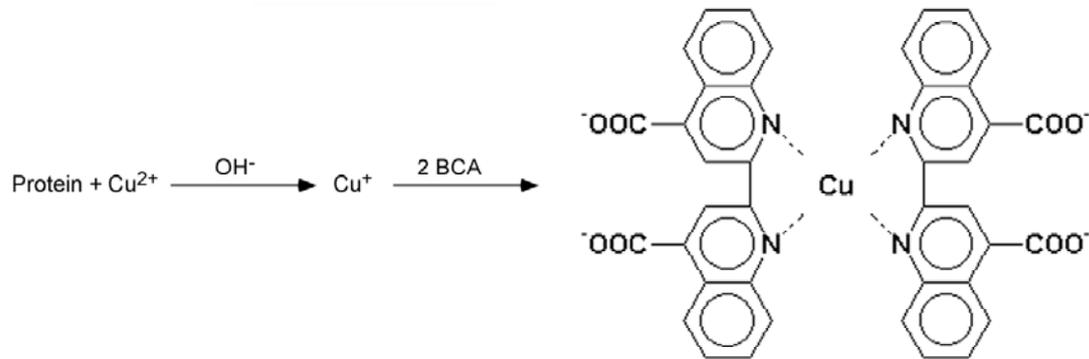


Abbildung 6: BCA-Reaktion [Proteinchemie II, 2009]

Material

- 96-Well-Platte
- Pipetten (Eppendorf)
- Victor³ 1420 Multilabel Counter (EG&G Wallac, Turku, Finnland)
- Brutschrank

Lösungen

- BSA-Standard (1 mg/ml BSA in ddH₂O)
- Micro BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Rockford, IL)
 - Reagent A
 - Reagent B

Die Durchführung des Tests erfolgt mittels Doppelbestimmung auf Mikrotiterplatten. Als Standard dient dabei die Verdünnungsreihe einer BSA-Stammlösung. Aus den Verdünnungen, die eine Proteinkonzentration von 0,05 µg/ µl, 0,75 µg/ µl, 0,1 µg/ µl, 1,5 µg/ µl, 2,25 µg/ µl, 3 µg/ µl haben, wird eine Standardkurve erstellt.

Zuerst werden jeweils zweimal 25 µl der Standardverdünnungsreihe und 25 µl der Proben in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert. Danach wird 200 µl einer Mischung von Reagenz A (BCA) + Reagenz B (Kupfersulfat) im Verhältnis 50:1 dazupipettiert. Nach dem Auftragen der Standards, Proben und des Reagens wird

die Mikrotiterplatte mit den Proben und der Reagenzmischung für eine halbe Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert und das gefärbte Produkt wird anschließend in einem Mikrotiterplattenlesegerät bei 562 nm vermessen.

Die Proteinkonzentrationen ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) der Proben werden an Hand der Standardkurve errechnet und anschließend werden die für die Gelelektrophorese benötigten Mengen an Probenlösung ermittelt.

3.4. Gelelektrophorese

3.4.1. Grundlagen

In der Gelelektrophorese werden geladene Moleküle in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe bzw. Ladung aufgetrennt. Das Gel fungiert als Molekularsieb, in dem sich die zu trennenden Moleküle unterschiedlich schnell bewegen. Biologische Moleküle, wie Peptide, Proteine und Nukleinsäuren, die ionisierbare Gruppen enthalten und deshalb in Lösung entweder als Kationen (+) oder Anionen (-) vorliegen, können durch diese Methode getrennt werden. Dabei wandern negativ geladene Moleküle in Richtung der Anode und positiv geladene Moleküle in Richtung der Kathode, wobei größere Moleküle langsamer wandern, während sich kleinere Moleküle viel schneller durch die Maschen des Gels bewegen können. Zudem wird die elektrophoretische Mobilität der Partikel durch Faktoren wie Ladung, Größe und Form des Moleküls, Porengröße des Gels, pH-Wert und Temperatur des Buffers und durch elektrische Feldstärke beeinflusst.

Je nach Art der Anwendung werden die Gele verschieden zusammengesetzt. So können zum Beispiel Kieselgele, Stärkegele, Agar- bzw. Agarosegele oder Polyacrylamidgele verwendet werden.

3.4.2. Natrium Dodecylsulfat - Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In dieser Diplomarbeit wurde eine SDS-PAGE durchgeführt, die 1970 von Laemmli entwickelt wurde. Es wird ein Polyacrylamid-Gel hergestellt. Die Porengröße wird durch Erhöhung der Gelkonzentration verringert. Je größer das Molekül ist, das untersucht werden soll, desto kleiner sollte die Prozentigkeit des Trenngels sein. Polyacrylamid-Gele eignen sich sehr gut für die Trennung von Proteinen, da sie zum einen chemisch inert, stabil, klar und gut zu färben sind und es zum anderen zu einer guten Auftrennung unterhalb eines Molekulargewicht von 100 Kilodalton (kDa) kommt. Während der Polymerisation werden die Acrylamid-Monomere mit Hilfe der Katalysatoren N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat (AMPS) verknüpft. Da Acrylamid ein Neurotoxin ist, muss seine Verwendung sorgfältig und unter Schutzbedingungen erfolgen. Die SDS-PAGE ist eine diskontinuierliche Elektrophorese (Laemmli, 1970), bei der die Gele aus zwei unterschiedlichen Schichten bestehen: einem Sammel- und einem Trenngel. Das relativ großporige Sammelgel dient dazu, einen fixen Startpunkt zu schaffen, von dem die Moleküle aus derselben Höhe durch das Trenngel wandern können. Im kleinporigen Trenngel werden die Proteine in Zonen, den Banden aufgetrennt. Der pH-Wert des Trenngels liegt bei 8,8, der des Sammelgels bei 6,8, nahe dem isoelektrischen Punkt des Glycins, das im Elektrophoresepuffer als Ladungsträger dient. Glycin, das bei diesem pH Wert als Zwitterion vorliegt, hat eine niedrige elektrophoretische Mobilität (Folge-Ion) und ist nicht bzw. kaum in der Lage Strom weiterzuleiten, während Chloridionen, die im Gel enthalten sind, eine hohe elektrophoretische Mobilität (Leit-Ion) besitzen. Dadurch stellt sich im Bereich der Glycin-Zwitterionen eine niedrige und im Bereich der Chloridionen eine sehr hohe Feldstärke ein. Die Proteine befinden sich somit in einem Feldstärkegradienten und wandern zwischen Folge- und Leit-Ionen in Richtung Trenngelfront. Dort kommt es zur Fokussierung der Proteine. Nach dem Übertritt in das Trenngel kommt es durch die Siebwirkung des engporigen Gels zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Da Glycin durch den angehobenen pH-Wert des Trenngels in den geladenen Zustand übergeht, stellt sich eine konstante Feldstärke im gesamten Gel ein.

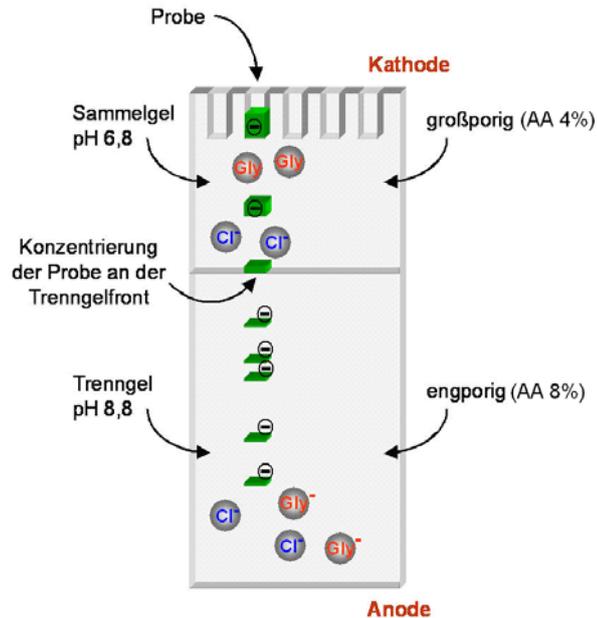


Abbildung 7: Schematische Darstellung der SDS-PAGE [Neumann 2005]

Um die Molekülmassen der Proben abschätzen zu können, wird zusätzlich ein Molekülmassenstandard auf das Gel aufgetragen. Dieser Standard besteht aus einem Gemisch von Molekülen mit bekannter Masse. Nach der elektrophoretischen Trennung des Standards und der zu untersuchenden Proben können die entstandenen Banden am Ende miteinander verglichen und das ungefähre Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine bestimmt werden.

Neben der Molekülmasse können Ladung und Struktur der Proteine das Wanderverhalten im Gel stark beeinflussen. Um die Eigenladung der Proteine zu überdecken, wird daher den Proben das anionische Detergenz SDS („sodium dodecylsulfate“) im Überschuss zugesetzt und anschließend wird auf 95° C erhitzt. Dies führt zur „Ummantelung“ der Proteine mit SDS und einer damit verbundenen Negativladung. Es kommt zur Denaturierung d.h. Spaltung der Wasserstoffbrücken und Zerstörung der Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins. Pro Masseneinheit Protein wird eine konstante Menge an SDS adsorbiert (1,4 g SDS/g Protein). Dadurch nimmt jedes Protein dasselbe Ladung/Masse-Verhältnis an. Daher erfolgt die Auftrennung der Proteine im Gel bei der SDS-PAGE nur noch aufgrund des Molekulargewichtes und nicht mehr nach ihrer Ladung. Um noch vorhandene

Disulfidbrücken aufzubrechen, werden reduzierende Thiole, wie β -Mercaptoethanol, Dithioethanol oder Dithiothreitol dem Probenpuffer zugesetzt.

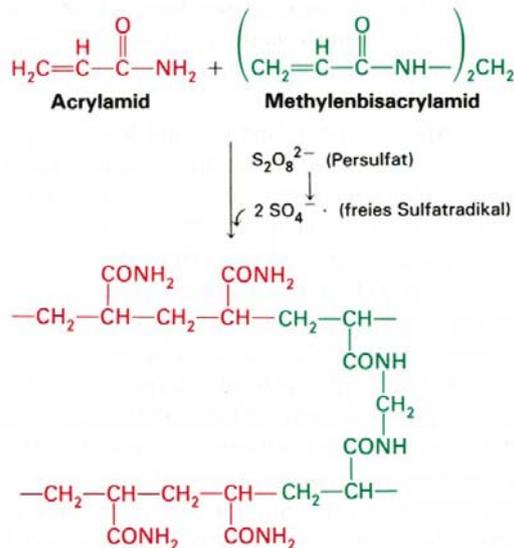


Abbildung 10: Acrylamid-Polymerisation [Proteinchemie II, 2009]

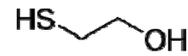


Abbildung 9: β -Mercaptoethanol [Proteinchemie II, 2009]

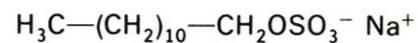


Abbildung 8: SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) [Proteinchemie II, 2009]

Zur Auftrennung der Proteine werden Proteingemische auf das Gel aufgetragen und der Puffer dazu gefügt. SDS-haltige TRIS-Glycin-Puffersysteme mit einem pH-Wert von 6,4 ermöglichen eine sehr gute Trennung der Proteine und kommen deshalb sehr oft zur Anwendung. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung kommt es zur Migration der Proteine durch das Gel.

Für das Auftragen der Probe ist es wichtig, dass alle Taschen des Gels mit der gleichen Menge an Protein in geeigneter Menge gefüllt werden. Wird zu viel Protein aufgetragen, besteht die Möglichkeit, dass weniger prominente Proteine durch stark vorkommende überdeckt werden. Deshalb ist es notwendig, die Proteinkonzentration vor der Probenvorbereitung zu bestimmen.

Da bei der Gelelektrophorese immer Wärme entsteht, muss diese in geeigneten, gekühlten Apparaturen durchgeführt werden.

Die Elektrophorese wird beendet, wenn das kleinste und daher schnellste Molekül das Ende des Gels erreicht hat und eine bestmögliche Auftrennung der Moleküle erfolgt ist.

3.4.3. Gießen des Gels

Material

- Gelgießkammer (Mighty Small Multiple Gel Caster, Hoefer Scientific Instruments)
- Glasplatten 10x8cm (Pharmacia Biotech)
- Aluminiumoxidplatten 10x8cm (Pharmacia Biotech)
- Spacer und Kämmen 1,5mm
- Klammern
- Erlenmeyerkolben
- Thermomixer Comfort (Eppendorf AG, Hamburg, DE)
- Pipetten (Eppendorf)
- Eppendorfgefäße
- Parafilm® (American National Can™, Greenwich)
- Elektrophoreseapparatur 250 Midget (LKB, Bromma, SWE)

Buffer und Lösungen

-

Trenngel (Running gel) 8%		Sammelgel (Stacking gel) 4 %	
ddH ₂ O	26.24 ml	ddH ₂ O	11.58 ml
TRIS 3M pH 8,8	4.64 ml	TRIS 0.5M pH 6,8	1.875 ml
SDS 10%°	0.4 ml	SDS 10%°	150 µl
Acrylamid 40% ⁺	8 ml	Acrylamid 40% ⁺	1.5 ml
AMPS 10% ⁺	0.4 ml	AMPS 10% ⁺	150 µl
TEMED ⁺	32 µl	TEMED ⁺	20 µl

- SDS 10%
 - SDS (Merck) 10 g
 - ddH₂O 100 ml
- 3 M Tris-HCl, pH 8,8 (500 ml)
 - Tris (Merck) 181.7 g
 - ddH₂O ad 500 ml
 - mit HCl auf pH 8,8 einstellen
- 0.5 M Tris-HCl, pH 6,8 (500 ml)

- Tris (Merck) 30.6 g
- ddH₂O ad 500 ml
- mit HCl auf pH 6,8 einstellen
- Isobutylalkohol (Merck)
- 10x Laemmli buffer (running buffer)
 - Glycin° 144 g
 - TRIS° 30 g
 - SDS° 10g
 - ddH₂O ad 1 L
- Sample buffer
 - TRIS° 0.5M pH 6,8 5 ml
 - Glycerin° 87% 3 ml
 - SDS° 0.8 g
 - Bromophenolblau 0,1% (LKB) 0.5 ml
 - β -Mercaptoethanol (Sigma) 20% (v/v)
- 10x PBS pH 7,4
 - Kaliumchlorid (KCl)° 2g
 - Natriumchlorid (NaCl)° 80g
 - Kalium Dihydrogen Phosphat (KH₂PO₄)° 2g
 - Dinatrium Hydrogen Phosphat (Na₂HPO₄·2 H₂O)° 14,4g
 - ddH₂O ad 1 L
 - pH-Wert auf 7,4 einstellen
- 1x PBS pH 7.4
 - 10x PBS 100 ml
 - ddH₂O ad 1 L
 - mit HCl auf pH 7,4 einstellen
- Tween[®] 20 (Merck)
- Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas)

3.4.4. Probenvorbereitung

Je nach Anwendung sollten ungefähr 20-50 µg Protein pro Probe aufgetragen werden. Dazu wird der Proteinextrakt mit der jeweiligen Menge an PBS + 0.05 %

Tween[®] 20 versetzt und anschließend mit „Loadingbuffer“ (80% Samplebuffer + 20% Mercaptoethanol) gemischt. Nun werden die Eppendorfs in den Thermomixer geschichtet und 30 min bei 37°C inkubiert.

3.4.5. Elektrophoretische Auftrennung

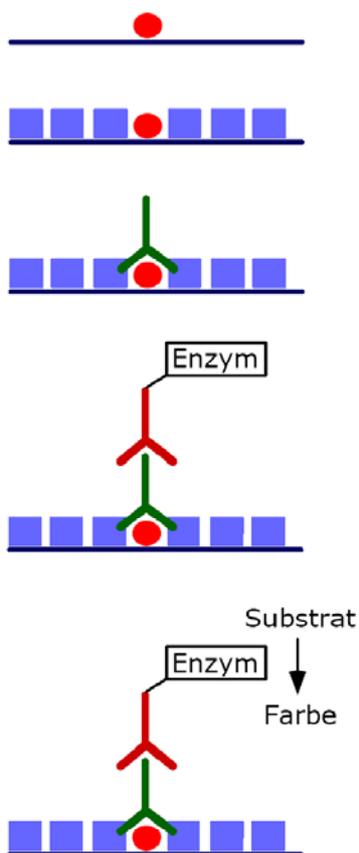
Die Gele werden vorsichtig aus der Apparatur gelöst und in eine Minielektrophoreseapparatur eingespannt. Bevor die Kämmen entnommen werden, sollten die Taschenenden mit einem Stift markiert werden. Dies erleichtert das spätere Befüllen der Taschen. Nun werden zuerst die Kammern und dann der Trog mit 1x Laemmli buffer befüllt. Anschließend werden die Proben (je 45 µl) und der Molekülstandard (5 µl) in die Taschen pipettiert und die Gelelektrophorese wird bei ungefähr 2h bei 100V und 100mA durchgeführt. Je nach Größe des Proteins kann die Laufzeit variieren. Große Proteine haben eine längere Laufzeit als kleine Proteine. Nach Ende der Elektrophorese, werden die Gele für 10 min in den Kühlschrank gelegt.

Um das Gel auswerten zu können, müssen die zu untersuchenden Moleküle „sichtbar“ gemacht werden. Hier gibt es verschiedene Möglichkeiten. Neben radioaktiver Markierung und Einfärben, können Proteine durch Detektion mit einem Antikörper im Western Blot nachgewiesen werden.

3.5. Western Blot

Blotting ist die Bezeichnung für die Übertragung von Molekülen aus einem Gel auf eine Membran. Die erste Blotting-Technik wurde 1975 von Edwin Southern entwickelt, die in Anlehnung seines Namens „Southern Blot“ genannt wurde und für die Übertragung von DNA-Fragmenten geeignet ist. Weiters wurden die Auftrennungen von RNA-Fragmenten „Northern Blot“ und die Auftrennung von Proteinen „Western Blot“ genannt.

Beim Western Blot [Towbin et al. 1979] wird analog zur Gelelektrophorese wieder ein elektrisches Feld angelegt, durch das es möglich wird, Proteine aus dem Gel auf eine Membran zu übertragen. Solche Membranen können aus Nitrozellulose, Nylon oder Polyvinylidenfluorid (PVDF) sein. Aufgrund der hydrophoben Wechselwirkungen bleiben die Proteine an der Membran haften und das Muster der vorherigen elektrophoretischen Auftrennung bleibt erhalten. Die Proteine sind nun für weitere Nachweismethoden zugänglich. In der Regel erfolgt dies mittels Immundetektion (Immunoblot). Mithilfe spezifischer Antikörper, die an den gewünschten Proteinen an der Membran binden, können die Proteinbanden identifiziert werden. Dabei bindet ein antigenspezifischer Primärantikörper an sein Epitop auf dem Antigen das auf der Membran fixiert ist. An die Fc-Region des primären Antikörpers bindet wiederum ein sekundärer Markierungsantikörper, über den die Detektion erfolgt.



Proteine können aber nicht nur durch Antigen-Antikörper-Bindung identifiziert werden, sondern auch alternativ mittels Färbung (Coomassie-Blue, Ponceau-Rot, Kolloidales Gold, Amidoschwarz oder Tusche) bzw. durch radioaktive Markierung nachgewiesen werden.

1. Belegung der Membran mit dem Protein.
2. Blockieren der freien Bindungsstellen auf der Membran.
3. Bindung des primären Antikörpers an das Protein.
4. Bindung des sekundären Antikörpers an den primären Antikörper.
5. Zugabe von Substrat mit anschließender Farbreaktion.

Abbildung 11: Prinzip des Western Immunoblots [Proteinchemie III, 2009]

Material und Lösungen

- Methanol (Merck)
- ddH₂O
- PVDF Transfer Membranen 0,45 µm (Biotrace™, Pall Corp., Ann Arbor, MI)
- Filterpapier 3 mm (Amersham, UK)
- Blotting Sandwich
- Schwämme
- Tankblotapparatur (TRANS-BLOT™ CELL, Bio-Rad)
- Magnetrührer
- Transferbuffer
 - Glycin° 17,85 g
 - Methanol° 0,6 L
 - TRIS° 4,42 g
 - ddH₂O ad 3 L

Durchführung

Pro Gel wird eine PVDF-Membran zugeschnitten und deren Schutzhülle entfernt. Da die Membranen sehr empfindlich sind und die Gefahr besteht, dass sie mit Fremdproteinen kontaminiert wird, darf nur behutsam mit Handschuhen und Pinzette gearbeitet werden. Da die Membranen selbst hydrophob sind, werden diese nacheinander für 15 sek in Methanol geschwenkt und anschließend in ddH₂O gelegt. Nun kann das Blotting Sandwich hergerichtet werden. Pro Seite werden ein Schwammtuch und mindestens 3 Lagen Filterpapier aufgelegt und mit kaltem Transferbuffer getränkt. Mit einer Rasierklinge wird das Gel freigelegt, das Sammelgel vom Trenngel abgetrennt, in die Blotting Kammer gelegt und vorsichtig mit der Membran überdeckt. Um die Proben später identifizieren und die Membranen unterscheiden zu können, müssen diese beschriftet werden. Vorzugsweise wird in der rechten oberen Ecke beschriftet. Nun wird nochmals mit Transferbuffer befeuchtet, da die Membranen nicht austrocknen dürfen. Zwischen Gel und Membran dürfen sich keine Luftblasen bilden, da an diesen Stellen keine Proteinübertragung möglich ist und man unbefriedigende Ergebnisse erhalten würde. Falls es nötig ist, können die Luftblasen mit einer Glaspipette „ausgerollt“ werden.

Die Position der Membran darf dabei nicht verändert werden! Danach wird das Blotting Sandwich geschlossen und in der Kühlkammer bei 4°C in die Tankblotapparatur eingespannt. Die Proteine werden bei 18 V über Nacht geblottet.

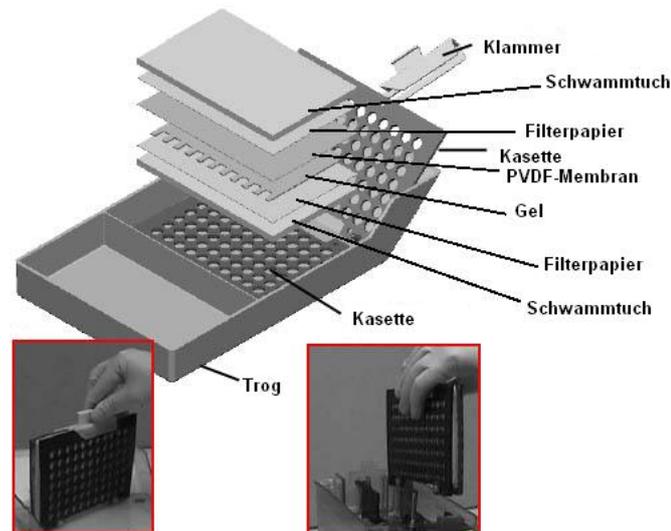


Abbildung 12: Western Blot Sandwich [Santosh Patnaik 2004]

3.6. Immundetektion

Material

- Laborschüttler RotoShake Genie (Scientific Industries Inc.)
- 15 ml sterile Zentrifugenröhrchen (Techno Plast Products AG)
- 50 ml sterile Zentrifugenröhrchen (Techno Plast Products AG)
- Expositionsmappe Quanta III (Cronex®)
- Autoradiography Film Hyperfilm™ MP, (Amersham, UK)
- Filmentwickler CP 1000 (Agfa)

Antikörper

Erstantikörper

- OATP-C (Santa Cruz, sc18436)
- OATP1B1/1B3 (Acris, BM5541)
- OATP2A1 (Cayman Chemical 160200, Ann Arbor, MI)
- Protein Disulfid Isomerase (PDI, Affinity Bioreagents)

Zweitantikörper

- donkey anti-goat IgG (Santa Cruz Biotechnology sc-2020)
- rabbit anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, 315-036-003)
- goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology sc-2004)

- rabbit serum 1%
- goat serum 1%

Buffer und Lösungen

- H₂O₂ 3%
- Blocking buffer 1%
 - Milchpulver (Non-Fat Dry Milk, Bio-Rad) 0,1 g
 - TBS-T 10 ml
- Blocking buffer 5%
 - Milchpulver (Non-Fat Dry Milk, Bio-Rad) 1 g
 - TBS-T 20 ml
- 20x TBS
 - TRIS° 400mM 48,456 g
 - NaCl° 2.9M 169,476 g
 - ddH₂O ad 1 L
 - ➔ mit HCl conc. auf pH 7,6 einstellen
- 1x TBS
 - 20x TBS 100 ml
 - ddH₂O ad 2 L
 - ➔ mit HCl conc. auf pH 7,6 einstellen
- TBS-T
 - 1x TBS 2 L
 - Tween[®] 20 (Merck) 1 ml
- Detektionsreagens SuperSignal[®] West Pico Kit (Pierce, Rockford, IL)
 - SuperSignal[®] West Pico Luminol/Enhancer Solution
 - SuperSignal[®] West Pico Stable Peroxide Solution

Durchführung

Die Membranen werden der Blottingapparatur entnommen und in einer Petrischale in eine „blocking solution“ eingelegt. Dabei werden alle freien Bindungsstellen blockiert, wodurch verhindert wird, dass sich Antikörper unspezifisch an Proteine anlagern. Für den „blocking buffer“ eignen sich Lösungen von Milchpulver, Rinder-Serumalbumin (BSA), Gelatine und andere Proteine. Zum Nachweis der OATPs werden die Membranen für 1h in einer 5%igen Milchpulverlösung geschwenkt. Danach werden die Membranen kurz mit TBS-T gewaschen. Nun wird der Erstantikörper in Zentrifugenröhrchen im richtigen Verhältnis in TBS-T verdünnt und die Membranen in dieser Lösung für 2h auf dem Laborschüttler inkubiert. Anschließend wird 4x 5 min mit TBS-T gewaschen und mit dem Zweitantikörper inkubiert. Dafür werden die Membranen in einer Lösung des sekundären Antikörpers in TBS-T für 1h geschwenkt und anschließend die ungebundenen Antikörper wieder 4x 5 min mit TBS-T gewaschen. Der sekundäre Antikörper ist mit einer Meerrettichperoxidase, das HRP-Konjugat („horse-radish peroxidase Konjugat“) gekoppelt, das spezifisch an α -p-Tyrosin bindet, die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form katalysiert, und somit dessen Lumineszenz detektiert werden kann. Die Membranen werden vor der Detektion für 2 min in einer 1:1 Lösung der beiden Photoreagenzien „SuperSignal[®] West Pico Luminol/Enhancer Solution“ und „SuperSignal[®] West Pico Stable Peroxide Solution“ getränkt (~ 2 ml). Danach lässt man die Membranen gut abtropfen und legt diese luftblasenfrei mit der Vorderseite nach unten auf eine Frischhaltefolie. Die Membranen werden gut verpackt in eine Expositionsmappe gelegt und bei Rotlicht entwickelt. Hierzu entnimmt man aus der Packung einen Film, schneidet ihn auf die richtige Größe zu, legt ihn auf die Membranen, schließt die Mappe und lässt den Film darauf. Die Dauer der Exposition hängt von der Intensität des Signals ab. Diese kann von 10 Sekunden bis zu 3 Tagen variieren. Zuletzt wird der Film der Mappe entnommen und in den Entwickler geschoben.

Protein Disulfid Polymerase

Die Protein Disulfid Polymerase PDI ist ein lösliches Protein, mit einem Molekulargewicht von 56 kDa und einer Aminosäuresequenz von ca. 490 AS, das im Lumen des endoplasmatischen Redikulums zu finden ist. Dieses Enzym katalysiert die PDI, wobei Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen stattfinden. Das heißt es kommt bei einer ganzen Reihe von Proteinen zu Oxidationen, Reduktionen und Umlagerungen von Disulfid-Brücken, wodurch dieses Enzym eine bedeutende Rolle in der korrekten Faltung dieser Proteine spielt [Kaetzel et al. 1987].

Der PDI-Antikörper erkennt die Protein Disulfid Polymerase in Mensch, Maus, Ratte, Hamster und *Xenopus laevis*. Dies ist sichtbar durch eine Bande bei 59 kDa (Rattenleber) bzw. 61 kDa (humane Leber) im Western Blot. PDI wird als Ladungskontrolle verwendet. Die Stärke der PDI Bande gibt an, ob die gleiche Menge an Protein für den Western Blot pro Probe vorhanden war

3.7. Strippen der Membranen

Die Membranen können mehrmals mit verschiedenen Antikörpern inkubiert werden. Hierzu ist es nötig die alten Antikörper zu entfernen, „strippen“, um den neuen Antikörpern eine Bindung an ihre Epitope an den Proteinen zu ermöglichen.

Material und Buffer

- Laborschüttler RotoShake Genie (Scientific Industries Inc.)
- Stripping Buffer
 - Glycin° 15 g
 - SDS° 1 g
 - Tween® 20 10 ml
 - ddH₂O ad 2 L

→ mit HCl conc. auf pH 2,2 einstellen
- TBS-T

Die Membranen werden 2x 15 min in ca. 10 ml Stripping Buffer eingelegt und am Laborschüttler geschwenkt. Nach den ersten 15 min wird der Buffer gewechselt, nach 30 min wird 4x 5min mit TBS-T gewaschen. Nun können die Membranen wieder mit Antikörpern inkubiert werden.

4. Ergebnisse und Diskussion

Das Ziel meiner Arbeit bestand darin, unterschiedliche Expressionsmuster anhand zweier verschiedener OATP-Transporter, OATP1B1 und OATP2A1, auf Proteinbasis in Normalgewebe und Tumorgewebe der Leber mittels Western Blot nachzuweisen. Daher war ein Hauptziel dieser Arbeit, geeignete Antikörper für die Analyse zu finden, die Bedingungen zu optimieren um eine geeignete Methode für einen erfolgreichen Nachweis der dieser Proteine zu generieren.

Weiters sollte untersucht werden, ob die mRNA Expression der beiden Transporter (erfasst durch Real Time PCR) mit der Menge an Protein in der Probe vergleichbar ist. mRNA Studien wurden durch Dr. Martin Svoboda und Dr. Katrin Wlcek am Institut für Pathophysiologie und Allergieforschung der MUV durchgeführt.

Für die OATP-Analyse mittels Western Blot wurden Proteinextrakte, aus 20 Patientenproben (Tumor und Normalgewebe) isoliert und zur genaueren Untersuchung herangezogen. Hierfür wurden die Zytoplasma- und Membranproteine aus Gewebshomogenaten isoliert. Dann wurden die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt, mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen und durch Immunedektion wurden die entsprechenden Proteine nachgewiesen.

Insgesamt wurden 20 Patientenproben (Sample 1-49) für die Western Blot Analyse verwendet. Da von Patient 17170/07 nicht nur eine histologische Gewebprobe, sondern drei zur Verfügung gestellt worden sind bzw. von dem Patient 2537/08 fünf histologische Gewebeproben für die Western Blot Analyse verfügbar waren, umfassen die die Samplenummern nicht nur 40, sondern 49 Proben. Das Patientenverzeichnis in Tabelle 8 gibt eine Übersicht über die Histologienummer, Samplenummern, Art des Gewebes (Normal/Tumor), über die Art des Tumors (hepatozelluläres Karzinom, fibrolammelares hepatozelluläres Karzinom, Adenokarzinom, Cholangiokarzinom, Metastasen) und die im BCA-Assay aus Abschnitt 4.2. ermittelte Proteinkonzentrationen des jeweiligen Patienten.

Tabelle 5: Patientenverzeichnis

Histologienummer	sample #	Gewebsart	Tumorart	Membranprotein in µg/µl
11519/06	23	Normal	AC	1,85
11519/06	42	Tumor		0,77
1178-79/08	44	Normal	FHCC	1,29
1178-79/08	40	Tumor		0,65
12362/06	12	Normal	FHCC	1,37
12362/07	41	Tumor		0,79
1383/08	7	Normal	AC	1,65
1383/08	16	Tumor		0,68
14599/06	32	Normal	HCC	1,20
14599/06	4	Tumor		0,91
17170/07	39	Normal	CholC	1,69
17170/07	13	Normal		0,96
17170/07	26	Tumor		0,89
1862/08	18	Normal	AC	1,29
1862/08	31	Tumor		0,67
21494/07	38	Normal	CholC	1,57
21494/07	34	Tumor		1,01
22559/07	10	Normal	AC	1,24
22559/07	14	Tumor		0,82
2283/06	35	Normal	CholC	0,98
2283/06	20	Tumor		1,23
2377/05	48	Normal	Metastase Blinddarm- karzinom	0,78
2377/05	49	Tumor		0,50
23860/06	2	Normal	FHCC	0,98
23860/06	37	Tumor		0,79
2537/08	29	Tumor	AC	0,82
2537/08	25	Tumor		1,07
2537/08	47	Tumor		0,69
2537/08	28	Normal		1,16
2537/08	8	Normal		0,93

Tabelle 5 fortlaufend: Patientenverzeichnis

Histologienummer	sample #	Gewebsart	Tumorart	Membranprotein in µg/µl
28350/06	36	Normal	HCC	0,51
28350/06	30	Tumor		1,09
33441/07	43	Normal	CholC	1,86
33441/07	17	Tumor		1,60
405/06	1	Normal	FHCC	1,10
405/06	21	Tumor		1,24
4697/06	11	Normal	HCC	1,13
4697/06	9	Tumor		1,48
4065407/05	45	Tumor	Metastase Testes- Tumor	0,68
5407/05	6	Normal		2,08
54310/07	2	Normal	AC	0,91
54310/07	27	Tumor		0,83
5529/06	46	Normal	AC	0,50
5529/06	19	Tumor		0,84
Zusatz: HCC = hepatozelluläres Karzinom, FHCC = fibrolammelares HCC, AC = Adenocarcinom, CholC = Cholangiokarzinom				

4.1. Vorproben

4.1.1. Bestimmung der Spezifität der Antikörper

Um die OATP-Transporter als deutliche und scharfe Banden mittels Immunoblotting sichtbar zu machen, wurden Versuchsreihen durchgeführt, bei denen sowohl verschiedene Behandlungsmöglichkeiten der geblotteten Proteine auf den Membranen als auch verschiedene Antikörperkonzentrationen und Inkubationsbedingungen untersucht wurden. Antikörper verschiedener Firmen erfordern unterschiedliche Bedingungen für eine erfolgreiche Bindung an das zu untersuchende Protein. Dies soll dazu führen, dass immunoreaktive Banden im Western Blots deutlich zu erkennen sind und unspezifische Bindungen der Antikörper an die geblotteten Proteine möglichst ausgeschaltet werden.

Daher wurden in dieser Diplomarbeit eine Reihe von Vorproben durchgeführt. Ziel war es, geeignete Bedingungen für spezifische Detektion der gewünschten OATPs zu finden.

4.1.2. Durchführung

Für die Herstellung der Western Blots für die Vorproben wurden Membranproteine aus Normalgewebe (N) und Tumorgewebe (T), sowie das Gesamtprotein aus Normalgewebe (G) aus unspezifischen humanen Leberzellen verwendet. Tabelle 6A zeigt die Proteinkonzentrationen der Proben N, T und G, die mittels BCA-Assay erfasst und durch einen Kollegen im Labor zur Verfügung gestellt worden sind, und die daraus errechneten Mengen an Probe, Sample Buffer (+ β -Mercaptoethanol) und PBS, die pro Tasche auf dem Gel aufgetragen werden.

Tabelle 6A: Semiquantitative Bestimmung der Protein-, Sample Buffer (+ β -Mercaptoethanol)- und PBS-Menge von Membranproteinen aus Normalgewebe (N), Tumorgewebe (T), sowie vom Gesamtextrakt aus dem Normalgewebe (G) unspezifischer humaner Leberzellen, die pro Tasche des Gels aufgetragen werden.

Probe	Proteinkonzentration der Proben in	Menge in μ l an Probe, Sample Buffer (+ β -Mercaptoethanol) und PBS die pro Tasche des Gels aufgetragen werden		
	μ g/ μ l	Probe	sample buffer	PBS
N	1.61	234.72	141.75	190.53
T	1.09	345.23	141.75	80.02
G	13.47	28.05	141.75	397.19
			425.25	4X-sample buffer
		plus	93.55	β -Mercaptoethanol

Zusatz: N: Membranprotein aus Normalgewebe humaner Leber; T: Membranprotein aus Tumorgewebe humaner Leber; G: Gesamtextrakt aus Normalgewebe humaner Leber

Zur Durchführung der Vorproben wurden insgesamt sieben Membranen hergestellt. Die Proteinmengen und Menge an aufgetragener Probe, Sample Buffer (+ β -Mercaptoethanol) und PBS sind in Tabelle 6A ersichtlich. Die Anordnung des Markers und der Proben in den Gelen, die für diese Western Blots verwendet wurden, ist in Tabelle 6B dargestellt.

Tabelle 6B: Auftragschema für die Proben N, T und G. Es wurden zuerst der Marker, dann das Membranprotein aus Normalgewebe (N), dann das Membranprotein aus Tumorgewebe (T) und zuletzt die Gesamtfraktion aus Normalgewebe (G) von humaner Leber aufgetragen.

Tasche 1	Tasche 2	Tasche 3	Tasche 4
Marker	N	T	G

Eine Zusammenfassung in Tabelle 7 zeigt das Ergebnis unterschiedlicher Behandlungen der Proben auf den Membranen. Variiert wurden Erst- und Zweitantikörper, Blocking Buffer und Zugabe von spezies-spezifischen Seren zum 2. Antikörper.

Membran 1

Membran 1 wurde in eine 1%ige Milchlösung gelegt und für eine Stunde auf dem Laborschüttler geschwenkt. Danach wurde die Membran mit TBS-T gewaschen und für zwei Stunden mit dem ersten Antikörper bei einer Verdünnung von 1:200 inkubiert. Bei diesem Antikörper handelte es sich um den OATP-C Transporter der Firma Santa Cruz. Anschließend wurde die Membran mit TBS-T gewaschen und eine Stunde mit dem Spezies-spezifischen 2. Antikörper, der im Esel gewonnen wurde und gegen das Ziegen IgG (donkey anti-goat IgG) gerichtet ist, bei einer Verdünnung von 1:10000 inkubiert. Nach nochmaligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran mit SuperSignal behandelt und der Film entwickelt.

Bei dieser Methode konnten keine verwertbaren Ergebnisse erzielt werden, da die unspezifische Bindung der Antikörper zu zahlreichen unspezifischen Banden führte und die OATP-Proteinbanden nicht ersichtlich waren.

Membran 2

Membran 2 wurde in eine 5%ige Milchlösung gelegt und für eine Stunde auf dem Laborschüttler geschwenkt. Danach wurde sie mit TBS-T gewaschen und für zwei Stunden mit dem ersten Antikörper, OATP-C der Firma Santa Cruz, bei einer Verdünnung von 1:200 inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit TBS-T gewaschen und eine Stunde mit dem 2. Antikörper, donkey anti-goat IgG, der im

Esel gewonnen wurde und gegen das Ziegen IgG gerichtet ist, bei einer Verdünnung von 1:10000 inkubiert. Nach nochmaligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran mit SuperSignal behandelt und der Film entwickelt.

Diese Methode lieferte ebenfalls keine verwertbaren Ergebnisse, da die unspezifische Bindung der Antikörper zu zahlreichen unspezifischen Banden führte und die OATP-Proteinbanden nicht ersichtlich waren.

Membran 3

Membran 3 wurde für 15 min in 3%iges H₂O₂ eingelegt, anschließend mit TBS-T gewaschen und für eine Stunde in einer 5%igen Milchlösung am Laborschüttler geschwenkt. Nach nochmaligem Waschen wurde die Membran zwei Stunden mit dem 1. Antikörper, OATP-C der Firma Santa Cruz, bei einer Verdünnung von 1:200 inkubiert. Es folgte ein Waschschriff mit TBS-T und eine einstündige Inkubation mit dem 2. Antikörper, der im Esel gewonnen wurde und gegen das Ziegen IgG (donkey anti-goat IgG) gerichtet ist, bei einer Verdünnung von 1:10000. Die Membran wurde abermals gewaschen, mit SuperSignal behandelt und der Film entwickelt.

Durch Behandlung mit H₂O₂ und 5%iger Milchlösung dürften die freien Antikörper-Bindungsstellen besetzt worden sein. Es waren keine unspezifischen Banden erkenntlich, jedoch konnten auch keine für OATP-spezifischen Proteinbanden detektiert werden.

Membran 4

Membran 4 wurde in eine 5%ige Milchlösung gelegt und für eine Stunde auf dem Laborschüttler geschwenkt. Danach wurde die Membran mit TBS-T gewaschen und für zwei Stunden mit dem ersten Antikörper bei einer Verdünnung von 1:200 inkubiert. Bei diesem Antikörper handelte es sich um den OATP1B1/1B3 Transporter der Firma Acris. Anschließend wurde die Membran mit TBS-T gewaschen und eine Stunde mit dem 2. Antikörper, rabbit anti-mouse IgG, bei einer Verdünnung von 1:10000 inkubiert. Nach nochmaligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran mit SuperSignal behandelt und der Film entwickelt.

Bei dieser Methode konnten keine verwertbaren Ergebnisse erzielt werden, da die unspezifische Bindung der Antikörper zu zahlreichen unspezifischen Banden führte und die OATP-Proteinbanden nur sehr unklar ersichtlich waren.

Membran 5

Membran 5 wurde für 15 min in 3%iges H₂O₂ eingelegt, anschließend mit TBS-T gewaschen und für eine Stunde in einer 5%igen Milchlösung am Laborschüttler geschwenkt. Nach nochmaligem Waschen wurde die Membran zwei Stunden mit dem 1. Antikörper, OATP1B1/1B3 der Firma Acris, bei einer Verdünnung von 1:200 inkubiert. Es folgte ein Waschschriff mit TBS-T und eine einstündige Inkubation mit dem 2. Antikörper, rabbit anti-mouse IgG, bei einer Verdünnung von 1:10000. Die Membran wurde abermals gewaschen, mit SuperSignal behandelt und der Film entwickelt.

Diese Methode lieferte nur wenig überzeugbare Ergebnisse. Zwar konnte die Bildung unspezifische Banden verhindert werden. Spezifische Proteinbanden waren jedoch fast nicht mehr sichtbar.

Membran 6

Membran 6 wurde in eine 5%ige Milchlösung gelegt und für eine Stunde auf dem Laborschüttler geschwenkt. Danach wurde sie mit TBS-T gewaschen und für zwei Stunden mit dem ersten Antikörper, OATP1B1/1B3 der Firma Acris, bei einer Verdünnung von 1:200 inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit TBS-T gewaschen und eine Stunde mit dem 2. Antikörper, rabbit anti-mouse IgG, bei einer Verdünnung von 1:10000 plus 1%igem rabbit serum inkubiert. Nach nochmaligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran mit SuperSignal behandelt und der Film entwickelt.

Diese Methode wurde mit dem Hintergedanken entwickelt, schwache Proteinbanden durch Zugabe eines rabbit serums stärker ersichtlich zu machen. Das Ergebnis zeigte scharfe spezifische Proteinbanden, jedoch auch unerwünschte Hintergrundinformationen.

Methode 7

Membran 7 wurde für 15 min in stripping buffer am Laborschüttler geschwenkt und anschließend mit TBS-T gewaschen. Danach wurden die freien Bindungstellen durch Einlegen der Membran in eine 5%ige Milchlösung über den Zeitraum einer Stunde blockiert. Die Membran wurde mit TBS-T gewaschen und mit dem 1. Antikörper, OATP1B1/1B3 der Firma Acris, bei einer Verdünnung von 1:200 über einen Zeitraum von zwei Stunden inkubiert. Nach nochmaligem Waschen wurde die Membran eine Stunde mit dem 2. Antikörper, rabbit anti-mouse IgG, bei einer Verdünnung von 1:10000 inkubiert, abermals gewaschen, mit SuperSignal behandelt und der Film entwickelt.

Diese Methode lieferte die ersten verwertbaren Ergebnisse. Alle störenden Hintergrundinformationen konnten größtenteils ausgeblendet und scharfe, spezifische Proteinbanden ersichtlich gemacht werden.

Methoden 6 und 7 wurden als solche bzw. in leicht modifizierter Form für alle Patientenproben angewendet.

Tabelle 7: Zusammenfassung der Ergebnisse unterschiedlicher Behandlungsmethoden der Membranen 1-7

Membran	Vorbehandlung		Blocken		1. Antikörper	2. Antikörper		Ergebnisse
	15 min 3% H ₂ O ₂	15 min stripping buffer	1 h blocking buffer 1%	1h blocking buffer 5%	2h 1. Antikörper	1h 2. Antikörper	1h 2. AK + 1% rabbit serum	
1	Nein	Nein	Ja	Nein	Santa Cruz OATP-C 1:200	Anti Goat IgG 1:10000	Nein	viele unspezifische Proteinbanden, sehr dunkler Hintergrund, spezifische Banden nicht sichtbar
2	Nein	Nein	Nein	Ja	Santa Cruz OATP-C 1:200	Anti Goat IgG 1:10000	Nein	viele unspezifische Proteinbanden, sehr dunkler Hintergrund, spezifische Banden nicht sichtbar
3	Ja	Nein	Nein	Ja	Santa Cruz OATP-C 1:200	Anti Goat IgG 1:10000	Nein	dunkler Hintergrund entfernt, jedoch keine Proteinbanden sichtbar
4	Nein	Nein	Nein	Ja	Acris OATP1B1/1B3 1:200	Anti Mouse IgG 1:10000	Nein	viele unspezifische Proteinbanden, sehr dunkler Hintergrund, spezifische Banden nicht sichtbar
5	Ja	Nein	Nein	Ja	Acris OATP1B1/1B3 1:200	Anti Mouse IgG 1:10000	Nein	dunkler Hintergrund entfernt, Proteinbanden extrem schwach
6	Nein	Nein	Nein	Ja	Acris OATP1B1/1B3 1:200	Anti Mouse IgG 1:10000	Ja	Proteinbanden ersichtlich, jedoch auch viel Hintergrund
7	Nein	Ja	Nein	Ja	Acris OATP1B1/1B3 1:200	Anti Mouse IgG 1:10000	Nein	Proteinbanden ersichtlich

Zusatz: stripping buffer: Buffer, der Proteine bzw. Epitope, die von den Antikörpern erkannt werden, von den Membranen entfernt (siehe Abschnitt 3.7);
blocking buffer: Milchpulver in PBS (siehe Abschnitt 3.6)

4.2. Patientenproben

Für die Western Blot Analyse mussten zuerst die Membranproteinkonzentrationen der einzelnen Proben ermittelt werden. Die Quantifizierung erfolgt mittels BCA-Assay, einer Methode, die auf der Proteinvermittelten Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ , anschließender Komplexbildung zwischen Cu^+ und Biscinchoninsäure (BCA) und der Vermessung des violett gefärbten Produktes, bei einem Absorptionsmaximum von 562 nm, beruht (siehe Abschnitt 3.3). Die Proteinkonzentrationen ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) der Proben werden an Hand der Eichgerade errechnet und anschließend werden die für die Gelelektrophorese benötigten Mengen an Probenlösung ermittelt. Die Ergebnisse des BCA-Assays sind in Tabelle 8 bzw. Abbildung 13 ersichtlich.

Tabelle 8: BCA-Assay: Nachweis der Probenkonzentration der Membranextrakte aus Normal- und Tumorgewebe aller Patienten

Well	BCA Protein Assay 590nm (A)	Standards und Patientenproben	Proteinkonzentration $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
A01	1,62	3	2,92
A02	1,57	3	
A03	1,29	2,25	2,25
A04	1,21	2,25	
A05	0,88	1,5	1,52
A06	0,88	1,5	
B01	0,66	1	1,09
B02	0,66	1	
B03	0,54	0,75	0,81
B04	0,49	0,75	
B05	0,39	0,5	0,56
B06	0,39	0,5	
C01	0,26	0,25	0,30
C02	0,25	0,25	
C03	0,13	0,05	0,04
C04	0,12	0,05	
C05	0,10	0	
C06	0,10	0	
D01	0,69	1	1,10
D02	0,64		
D03	0,59	2	0,98
D04	0,61		
D05	0,30	3	0,37
D06	0,29		
D07	0,56	4	0,91
D08	0,57		
D09	0,39	5	0,57
D10	0,39		
D11	1,13	6	2,08
D12	1,20		
E01	0,95	7	1,64

Well	BCA Protein Assay 590nm (A)	Standards und Patientenproben	Proteinkonzentration $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
E02	0,93		
E03	0,59	8	0,93
E04	0,57		
E05	0,85	9	1,48
E06	0,87		
E07	0,73	10	1,24
E08	0,74		
E09	0,71	11	1,13
E10	0,66		
E11	0,82	12	1,37
E12	0,78		
F01	0,60	13	0,95
F02	0,58		
F03	0,53	14	0,82
F04	0,51		
F05	0,46	16	0,67
F06	0,44		
F07	0,93	17	1,60
F08	0,92		
F09	0,75	18	1,29
F10	0,75		
F11	0,53	19	0,84
F12	0,53		
G01	0,73	20	1,22
G02	0,72		
G03	0,73	21	1,24
G04	0,74		
G05	0,57	22	0,91
G06	0,57		
G07	1,06	23	1,85
G08	1,03		

Tabelle 8 fortlaufend: BCA-Assay: Nachweis der Probenkonzentration der Membranextrakte aus Normal- und Tumorgewebe aller Patienten

Well	BCA Protein Assay 590nm (A)	Standards und Patientenproben	Protein-konzentration µg/µl
G09	0,42	24	0,63
G10	0,42		
G11	0,65	25	1,07
G12	0,65		
H01	0,56	26	0,89
H02	0,55		
H03	0,52	27	0,99
H04	0,53		
H05	0,78	28	1,30
H06	0,76		
H07	0,58	29	0,93
H08	0,58		
H09	0,73	30	1,22
H10	0,72		
H11	0,49	31	0,76
H12	0,49		
I01	0,79	32	1,34
I02	0,78		
I03	0,76	33	1,30
I04	0,77		
I05	0,69	34	1,13
I06	0,67		
I07	0,67	35	1,09
I08	0,65		
I09	0,40	36	0,58
I10	0,40		
I11	0,56	37	0,89
I12	0,55		
J01	1,00	38	1,75
J02	0,99		
J03	1,05	39	1,87

Well	BCA Protein Assay 590nm (A)	Standards und Patientenproben	Protein-konzentration µg/µl
J04	1,07		
J05	0,48	40	0,73
J06	0,47		
J07	0,56	41	0,88
J08	0,55		
J09	0,54	42	0,87
J10	0,54		
J11	1,16	43	2,06
J12	1,15		
K01	0,87	44	1,44
K02	0,81		
K03	0,49	45	0,77
K04	0,50		
K05	0,40	46	0,57
K06	0,38		
K07	0,50	47	0,78
K08	0,50		
K09	0,54	48	0,87
K10	0,55		
K11	0,39	49	0,56

Zusatz:

Wells A01 – C06: Standards
 Wells C07 – K11: Patientenproben;
 Probennummern siehe Tabelle 5

Die Proteinkonzentration im BCA-Assay wurde mittels fluorimetrischer Analyse bestimmt und an Hand der Standats, A01-C06 errechnet.

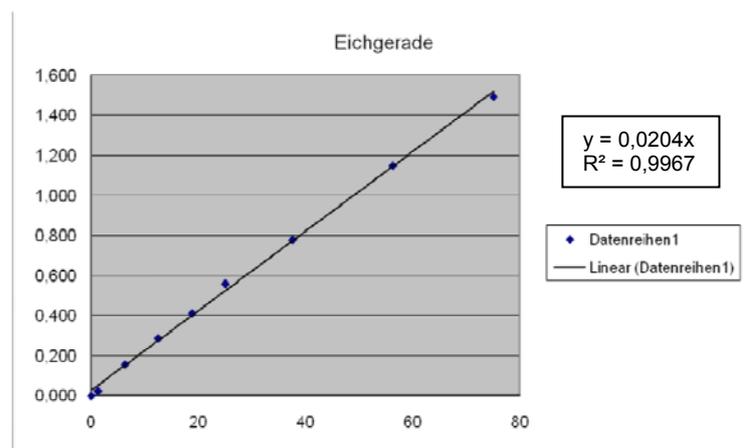


Abbildung 13: Eichgerade zum BCA-Assay zur Ermittlung der Proteinkonzentration aller Patientenproben von Tabelle 7

4.2.1. Expression von OATP1B1

4.2.1.1. Nachweis von OATP1B1 und PDI in den Proben 21/1, 14/10, 16/7, 20/35

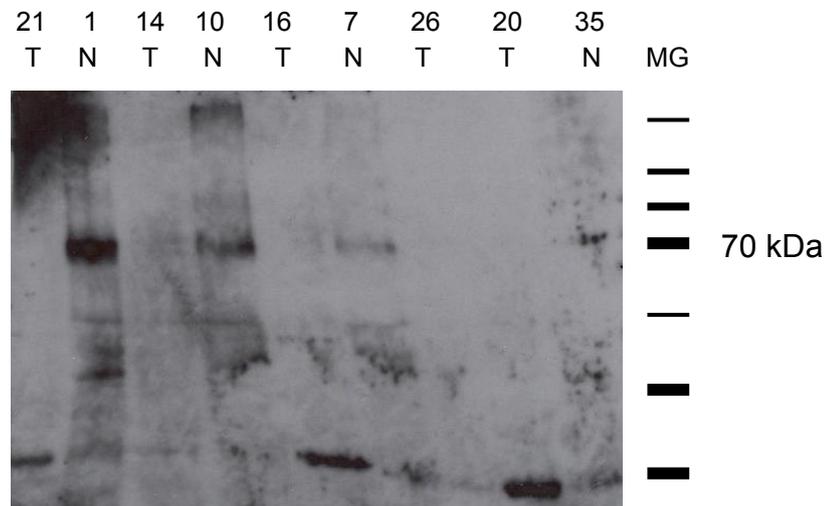


Abbildung 14: Western Blot Analyse von OATP1B1 in den Proben 21/1, 14/10, 16/7, 26 und 20/35.

Zusatz: Folgende Bedingungen wurden angewendet: Membran gestriipt, 1. Antikörper: OATP1B1/1B3 (Acris) 1:200, 2. Antikörper: rabbit anti mouse IgG: 1:10 000 + 1% rabbit serum, Exposition: 1 min

OATP1B1 ist als deutliche Bande in den Proben N1, N10, N7 und N35 bei einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa sichtbar.

Für den Western Blot in Abbildung 14 wurden Normalgewebe (N), sowie Tumorgewebe (T) von fünf Patienten verwendet. Die Konzentrationen der aufgetragenen Proben 21/1, 14/10, 16/7, 26 und 20/35 sind in Tabelle 10 im Appendix ersichtlich. Nummer 21/1 entspricht einem fibrolamellaren hepatozellulären Karzinom (FHCC), Nummer 14/10 sowie Nummer 16/7 einem Adenokarzinom (AC) und Nummer 26 sowie Nummer 20/35 einem Cholangiokarzinom (CholC).

Um die Membran optimalen Bedingungen auszusetzen wurde sie nach einer Kombination von Methode 7 und 8 behandelt. So wurde sie zur Vorbehandlung zuerst 15 min in stripping buffer gelegt, anschließend mit TBS-T gewaschen und für eine Stunde in einer 5%igen Milchlösung auf dem Laborschüttler geschwenkt. Darauffolgend wurde die Membran mit TBS-T gewaschen und für zwei Stunden mit dem ersten Antikörper, OATP1B1/1B3 der Firma Acris, bei einer Verdünnung von 1:200 inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit TBS-T gewaschen und eine Stunde mit dem 2. Antikörper, rabbit anti-mouse IgG, bei einer Verdünnung von

1:10000 plus 1%igem rabbit serum inkubiert. Nach nochmaligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran mit SuperSignal behandelt und der Film nach einer Expositionszeit von einer Minute entwickelt.

OATP1B1 ist als deutliche Bande in den Proben N1, N10, N7 und N35 bei einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa sichtbar. In den Proben T21, T14, T16, T26 und T20 konnten keine Banden des OATP1B1 detektiert werden. So konnte bei allen Patienten eine höhere Expressionsrate von OATP1B1 im Normalgewebe im Vergleich zum Tumorgewebe festgestellt werden.

Der Western Blot in Abbildung 15 wurde zur Überprüfung der möglichst vollständigen Proteinübertragung vom Gel auf die Membran mit PDI als Marker durchgeführt. Die Behandlung erfolgte nach Schema der Methode 7, als Erstantikörper wurde jedoch PDI in einer Verdünnung von 1:50000 und als Zweitantikörper rabbit anti-mouse IgG bei einer Verdünnung von 1:100000 eingesetzt. Der Film wurde für 10 min exponiert. Da PDI in gesunden und kranken Gewebe vorkommt, erhält man deutliche Banden bei einem Molekulargewicht von ca. 61 kDa in allen Proben. Mit Ausnahmen der Proben 21, 16 und 20 weisen die gleichmäßigen Bandenstärken auf eine annähernd gleiche Proteinmenge in den Proben hin.

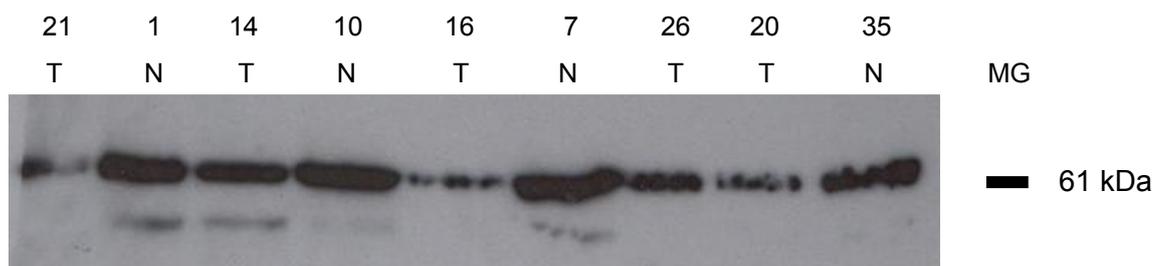


Abbildung 15: Western Blot Analyse des PDI in den Proben 21/1, 14/10, 16/7, 26 und 20/35. Zusatz: Folgende Bedingungen wurden angewendet: Membran gestrippt, 1. Antikörper: PDI 1:50 000, 2. Antikörper: rabbit anti mouse IgG 1:100 000, 10 Minuten exponiert. Mit Ausnahmen der Proben 21, 16 und 20 weisen die gleichmäßigen Bandenstärken auf eine annähernd gleiche Proteinmenge in den Proben hin.

4.2.1.2. Nachweis von OATP1B1 und PDI in den Proben 49/48, 37/2, 20/35

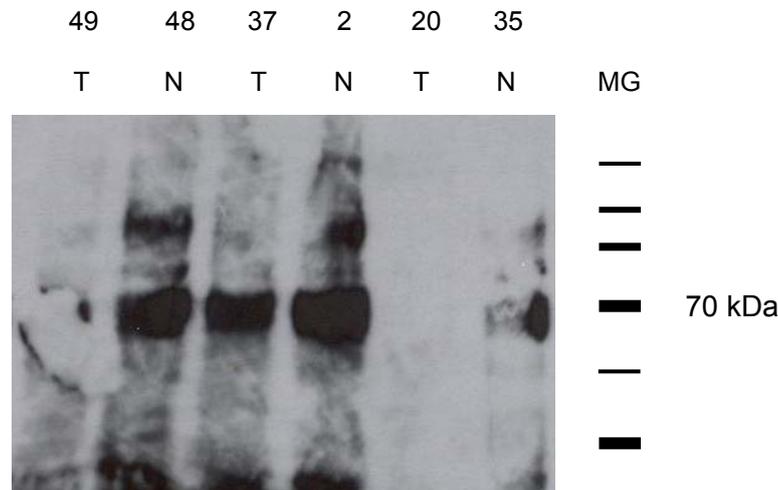


Abbildung 16: Western Blot Analyse von OATP1B1 in den Proben 49/48, 37/2 und 20/35
 Zusatz: Folgende Bedingungen wurden angewendet: 1. Antikörper: OATP1B1/1B3 (Acris) 1:200, 2. Antikörper: rabbit anti-mouse IgG 1:10 000 + 1% rabbit serum, 2 Minuten exponiert.
 OATP1B1 ist als deutliche Bande in den Proben N48, T37, N2 und N35 bei einem Molekulargewicht von 70 kDa sichtbar.

Für den Western Blot in Abbildung 16 wurden Membranproteine aus Normalgewebe (N), sowie Tumorgewebe (T) von vier Patienten verwendet. Die Konzentrationen der aufgetragenen Proben 49/48, 37/2 und 20/35 sind in Tabelle 11 im Appendix ersichtlich. Nummer 37/2 entspricht einem fibrolamellaren hepatozellulären Karzinom (FHCC), Nummer 49/48 Metastasen eines Blinddarmkarzinoms (O) und Nummer 20/35 einem Cholangiokarzinoms (CholC). Probe 20/35 wurden nochmals aufgetragen, um die Proteinbanden deutlicher sichtbar zu machen.

Die Membran wurde exakt nach Methode 6 behandelt. Sie wurde in eine 5%ige Milchlösung gelegt und für eine Stunde auf dem Laborschüttler geschwenkt. Danach wurde die Membran mit TBS-T gewaschen und für zwei Stunden mit dem ersten Antikörper, OATP1B1/1B3 der Firma Acris, bei einer Verdünnung von 1:200 inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit TBS-T gewaschen und eine Stunde mit dem 2. Antikörper, rabbit anti-mouse IgG, bei einer Verdünnung von 1:10000 plus 1%igem rabbit serum inkubiert. Nach nochmaligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran mit SuperSignal behandelt und der Film entwickelt.

OATP1B1 ist als deutliche Bande in den Proben N48, T37, N2 und N35 bei einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa sichtbar. Keine Banden konnten in der Probe T20

detektiert werden. Die Bande auf der Höhe von 70 kDa in der Probe T49 ist durch eine Luftblase verdeckt.

So konnte bei allen Patienten, mit Ausnahme von Patient 49/48, eine erhöhte Expression des OATP1B1 Transporters im Normalgewebe im Vergleich zum Tumorgewebe nachgewiesen werden.

Im Western Blot in Abbildung 17 wurde PDI zum Nachweis der effektiven Proteinübertragung vom Gel auf die Membran und als Ladungskontrolle (gleiche Proteinmengen) verwendet. Für den Nachweis von PDI wurde die Membran aus Abbildung 16 gestrippt, mit TBS-T gewaschen, mit PDI bei einer Verdünnung von 1:10000 über eine Stunde inkubiert, abermals mit TBS-T gewaschen, mit dem 2. Antikörper rabbit anti-mouse IgG bei einer Verdünnung von 1:20000 über eine Stunde inkubiert, mit TBS-T gewaschen, mit SuperSignal behandelt und der Film zuletzt nach einer Expositionszeit von 15 Sekunden entwickelt. PDI lässt sich durch immunoreaktive Banden bei einem Molekulargewicht von ca. 61 kDa nachweisen. Mit Ausnahme der Probe 20 weisen die PDI-Banden alle auf eine annähernd gleiche Proteinmenge hin.

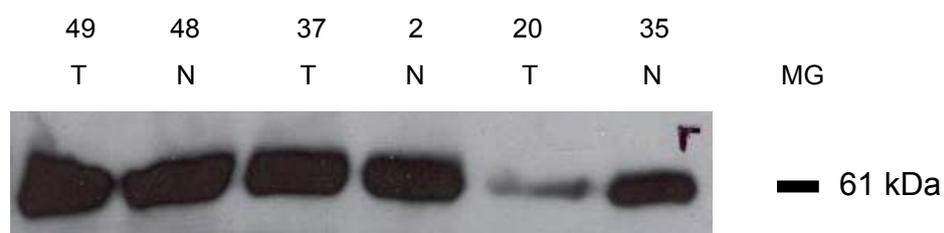


Abbildung 17: Western Blot Analyse des PDI in den Proben 49/48, 37/2 und 20/35.
Zusatz: Folgende Bedingungen wurden angewendet: Membran gestrippt, 1. Antikörper: PDI 1:10 000, 2. Antikörper: anti mouse 1:20 000, 15 Sekunden exponiert
Mit Ausnahme der Probe 20 weisen die gleichmäßigen Bandenstärken auf eine annähernd gleiche Proteinmenge in den Proben hin.

4.2.1.3. Nachweis von OATP1B1 in den Proben 17/43, 49/48, 14/10, 27/22

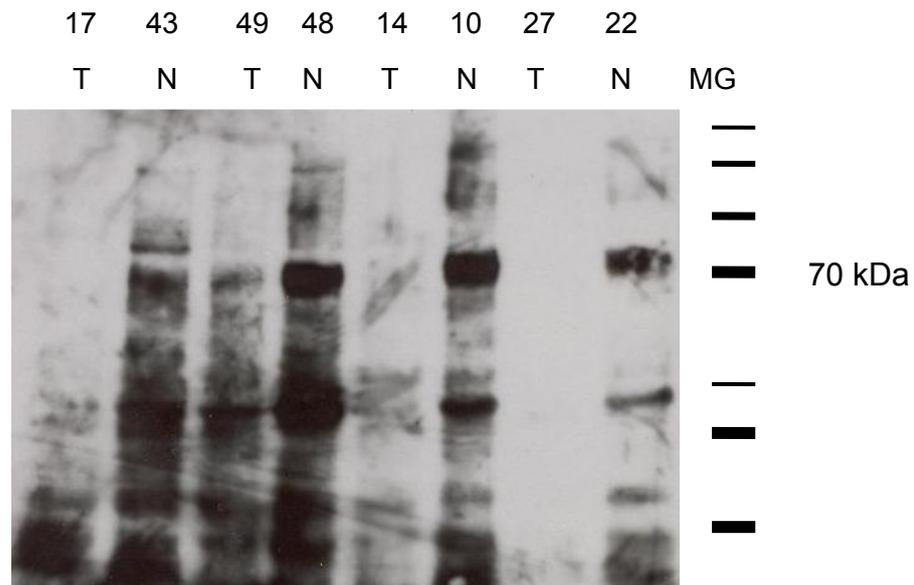


Abbildung 18: Western Blot Analyse von OATP1B1 in den Proben 17/43, 49/48, 14/10 und 27/22.

Zusatz: Folgende Bedingungen wurden angewendet: Membran gestrippt und ohne Milchlösung, 1. Antikörper: OATP1B1/1B3 (Acris) 1:200, 2. Antikörper: rabbit anti-mouse IgG 1: 10 000 + 1% rabbit serum, 10 Minuten exponiert.

OATP1B1 ist als deutliche Bande in den Proben N43, T49, N48, N10 und N22 bei einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa sichtbar. Bei ca. 30 kDa sind ebenfalls starke immunreaktive Banden erkenntlich, die auf Abbauprodukte von OATP1B1 hinweisen.

Für den Western Blot in Abbildung 18 wurden Membranproteine aus Normalgewebe (N), sowie Tumorgewebe (T) von vier Patienten verwendet. Die Konzentrationen der aufgetragenen Proben 17/43, 49/48, 14/10 und 27/22 sind in Tabelle 12 im Appendix ersichtlich. Nummer 14/10 sowie Nummer 27/22 entsprechen einem Adenokarzinoms (AC), Nummer 17/43 einem Cholangiokarzinom (CholC) und Nummer 49/48 Metastasen eines Blinddarmkarzinoms (O). Probe 49/48 wurde nochmals aufgetragen da die Proteinbande T49 der Western Blot Analyse in Abbildung 16 durch eine Luftblase verdeckt war. Probe 14/10 wurde ebenfalls ein weiteres Mal aufgetragen um die Proteinexpression deutlicher hervorzuheben.

Die Membran wurde gestrippt, mit TBS-T gewaschen und ohne Vorbehandlung mit einer Milchlösung gleich mit dem 1. Antikörper, OATP1B1/1B3 der Firma Acris, bei einer Verdünnung von 1:200 für zwei Stunden inkubiert. Danach wurde mit TBS-T gewaschen und die Membran mit dem 2. Antikörper, rabbit anti-mouse IgG bei einer Verdünnung von 1:10000, plus 1%igem rabbit serum über eine Stunde inkubiert. Nach nochmaligem Waschen mit TBS-T und Behandlung mit SuperSignal der

Membran wurde der Film nach einer Expositionszeit von 10 Minuten entwickelt. OATP1B1 ist als deutliche Bande in den Proben N43, T49, N48, N10 und N22 bei einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa sichtbar. Bei ca. 30 kDa sind ebenfalls starke immunreaktive Banden in den gesunden Proben erkenntlich, die auf Abbauprodukte von OATP1B1 hinweisen. Keine Banden des OATP1B1 konnten bei den Proben T17, T14 und T27 detektiert werden.

So zeigte sich bei allen Patienten eine erhöhte Expression des OATP1B1 Transporters im Normalgewebe im Vergleich zum Tumorgewebe.

4.2.1.4. Nachweis von OATP1B1 und PDI in den Proben 40/44, 34/38, 42/23, 41/12

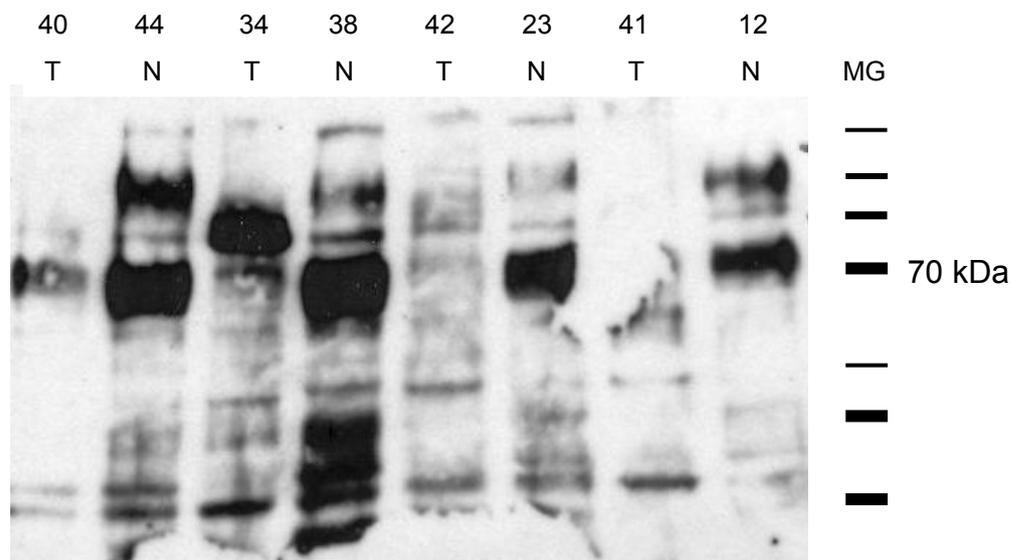


Abbildung 19: Western Blot Analyse von OATP1B1 in den Proben 40/44, 34/38, 42/23 und 41/12. Zusatz: Folgende Bedingungen wurden angewendet: Membran gestrippt, 1. Antikörper: OATP1B1/1B3 (Acris) 1:200, 2. Antikörper: rabbit anti-mouse IgG 1: 10 000, 2 Minuten exponiert. OATP1B1 ist als deutliche Bande in den Proben N44, N38, N23 und N12 bei einem Molekulargewicht von 70 kDa sichtbar.

Für den Western Blot in Abbildung 19 wurden Membranproteine aus Normalgewebe (N), sowie Tumorgewebe (T) von vier Patienten verwendet. Die Konzentrationen der aufgetragenen Proben 40/44, 34/38, 42/23 und 41/12 sind in Tabelle 13 im Appendix ersichtlich. Nummer 40/44 sowie Nummer 41/12 entsprechen einem fibrolamellaren hepatozellulären Karzinom (FHCC), Nummer 42/23 einem Adenokarzinom (AC) und

Nummer 34/38 einem Cholangiokarzinom (CholC). Die Behandlung der Membran erfolgte nach Methode 7. Die Expositionszeit des Films betrug 2 Minuten.

OATP1B1 ist als deutliche Bande in den Proben N44, N38, N23 und N12 bei einem Molekulargewicht von 70 kDa sichtbar. Schwächer Banden konnten bei den Proben T40, T34, T42 und T41 detektiert werden. Bei allen Patienten konnten somit erhöhte Expressionsraten des OATP1B1 Transporters im Normalgewebe im Vergleich zum Tumorgewebe festgestellt werden.

Im Western Blot in Abbildung 20 wurde PDI als Ladungskontrolle verwendet. Als Vorbehandlung wurde die Membran gestrippt, mit TBS-T gewaschen, schließlich mit dem 1. Antikörper PDI bei einer Verdünnung von 1:10000 über eine Stunde inkubiert, mit TBS-T gewaschen und mit dem 2. Antikörper rabbit anti-mouse IgG bei einer Verdünnung von 1:20000 über eine Stunde inkubiert. Nach nochmaligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran mit SuperSignal behandelt und der Film nach einer Expositionszeit von 15 Sekunden entwickelt. Die gleichmäßigen PDI-Banden in Höhe von ungefähr 61 kDa zeigen, dass von allen Proben ungefähr gleich hohe Proteinmengen aufgetragen wurden.

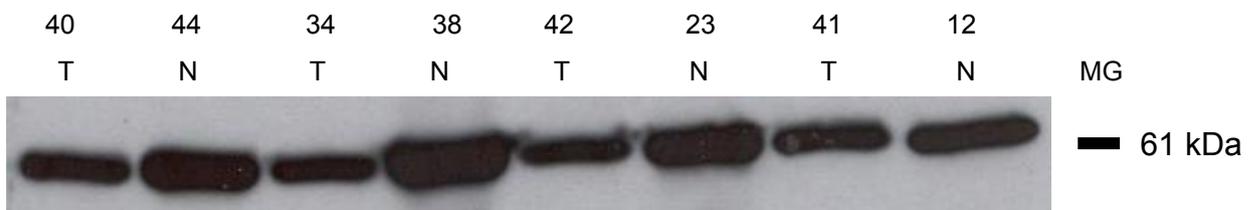


Abbildung 20: Western Blot Analyse des PDI in den Proben 40/44, 34/38, 42/23 und 41/12. Zusatz: Folgende Bedingungen wurden angewendet: Membran gestrippt, 1. Antikörper: PDI 1:10 000, 2. Antikörper: rabbit anti-mouse IgG 1:20 000, 15 Sekunden exponiert. In allen Proben zeigt sich dass eine annähernd gleiche Proteinmenge aufgetragen worden ist.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Western Blot Analysen von OATP1B1 in allen untersuchten Patientenproben im Normalgewebe höhere Expressionsraten aufzeigten als im Tumorgewebe.

4.2.2. Expression von OATP2A1

Für die Western Blot Analysen von OATP2A1 wurden die Behandlungsmethoden von OATP1B1 aus Abschnitt 4.1.2. übernommen.

4.2.2.1. Nachweis von OATP2A1 in den Proben 27/2, 26/39, 20/35, 49/48

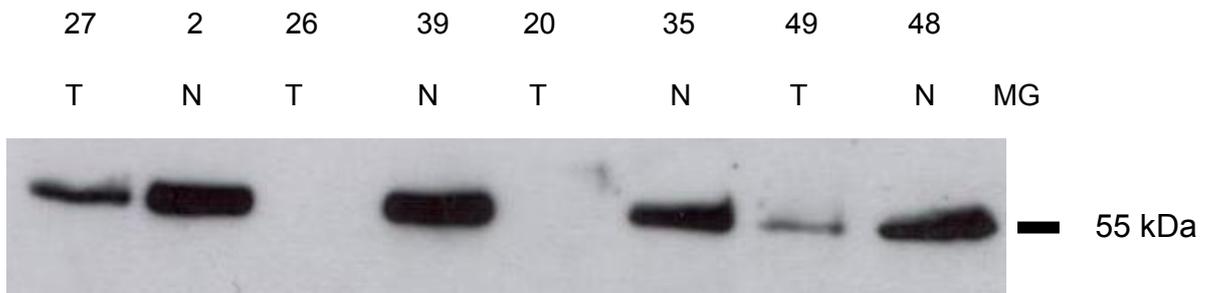


Abbildung 21: Western Blot Analyse von OATP2A1 in den Proben 27/2, 26/39, 20/35 und 49/48. Zusatz: Folgende Bedingungen wurden angewendet: Membran gestrippt, 1. Antikörper: OATP2A1 1:400, 2. Antikörper: goat anti rabbit IgG 1:10 000, 5 Minuten exponiert. OATP2A1 ist als deutliche Bande in den Proben T27, N2, N39, N35, T49 und N48 bei einem Molekulargewicht von ca. 55 kDa sichtbar.

Für den Western Blot in Abbildung 21 wurden Membranproteine aus Normalgewebe (N), sowie Tumorgewebe (T) von vier Patienten verwendet. Die Konzentrationen der aufgetragenen Proben 27/2, 26/39, 20/35 und 49/48 sind in Tabelle 14 im Appendix ersichtlich. Nummer 37/2 entspricht einem fibrolamellaren hepatozellulären Karzinom (FHCC), Nummer 49/48 Metastasen eines Blinddarmkarzinoms (O) und Nummer 20/35 sowie Nummer 26/29 einem Cholangiokarzinom (CholC).

Die Membran wurde nach Methode 7 in Abschnitt 4.1.1.2. behandelt. Als Erstantikörper wurde OATP2A1 bei einer Verdünnung von 1:400, als Zweitantikörper goat anti-rabbit IgG bei einer Verdünnung von 1:10000 verwendet. Die Expositionszeit des Films betrug 5 Minuten.

OATP2A1 ist als deutliche Bande in den Proben T27, N2, N39, N35, T49 und N48 bei einem Molekulargewicht von ca. 55 kDa sichtbar. Keine Banden konnten in den Proben T26 und T20 detektiert werden. Bei allen Patienten konnte eine erhöhte Expression von OATP2A1 im Normalgewebe festgestellt werden. Da jedoch auf mRNA Ebene, OATP2A1 im Tumor höher als im Normalgewebe war, könnte ein Teil des Proteins im Zytoplasma sei, was diese Diskrepanz zwischen Proteinexpression

und mRNA-Expression erklären könnte. Weiteres zeigte sich, dass die immunoreaktive OATP2A1 Banden bei ca. 50 kDa sichtbar wurden. Da aber das errechnete Molekulargewicht ca. 70 kDa betragen sollte, könnte es sich bei dem 50kDa Protein um ein Spaltprodukt von OATP2A1 handeln, das in der Membran lokalisiert ist. Das 70 kDa Protein könnte im Zytosol verbleiben und dies könnte dann auch die Menge der Gesamtexpression des Transporters im Tumor- und Normalgewebe verändern.

Es wurden daher für weitere Studien nicht nur Membranextrakte, sondern auch Gesamtproteinextrakte, die Membranen und Zytosol enthalten, der Patientenproben für die Western Blot Analyse verwendet.

4.2.2.2. Nachweis von OATP2A1 und PDI in den Proben 31/18, 26/39, PRT/PRN, FMT/FMN

Für die Western Blot Analyse von OATP2A1 und PDI wurden die Membranproteine sowie analog dazu die Gesamtextrakte von zwei Patienten verwendet. Nummer 31/18 entspricht der Membranproteinfraktion und PRT/PRN der Gesamtproteinfraktion aus dem Tumor- bzw. Normalgewebe des einen Patienten. Nummer 26/39 entspricht der Membranproteinfraktion und FMT/FMN entspricht der Gesamtproteinfraktion aus Tumor- und Normalgewebe des anderen Patienten. Die Membranproteinkonzentration der Proben 31/18 und 26/39 wurden mittels BCA-Assay in Abschnitt 4.1.2 ermittelt. Die Proteinkonzentrationen des Gesamtextraktes für PRT/PRN und FMT/FMN werden ebenfalls mittels BCA-Assays erfasst und mit Hilfe einer Eichgerade errechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 bzw. Abbildung 22 ersichtlich.

Tabelle 9: BCA-Assay: Nachweis der Probenkonzentration der Gesamtextrakte der Patienten PRT/PRN, FMT/FMG

Well	BCA Protein Assay 590nm (A)	Standards und Patientenproben	Proteinkonzentration $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
A01	1,53	3	2,88
A02	1,49	3	
A03	1,24	2,25	2,28
A04	1,20	2,25	
A05	0,86	1,5	1,55
A06	0,87	1,5	
B01	0,63	1	1,03
B02	0,59	1	

Well	BCA Protein Assay 590nm (A)	Standards und Patientenproben	Proteinkonzentration $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
B03	0,52	0,75	0,82
B04	0,50	0,75	
B05	0,39	0,5	0,58
B06	0,40	0,5	
C01	0,26	0,25	0,31
C02	0,26	0,25	
C03	0,14	0,05	0,05
C04	0,13	0,05	

Tabelle 9 fortlaufend: BCA-Assay: Nachweis der Probenkonzentration der Gesamtextrakte der Patienten PRT/PRN, FMT/FMG

Well	BCA Protein Assay 590nm (A)	Standards und Patientenproben	Proteinkonzentration $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
C05	0,10	0	
C06	1,52	FMNG	2,88
D01	1,50		
D02	0,57	FMTG	1,20
D03	0,82		
D04	1,53	PRNG	3,01
D05	1,61		
D06	1,14	PRTG	2,13
D07	1,15		

Zusatz: Wells A01 – C05: Standards;
Wells C06 – D07: Patientenproben

Die Proteinkonzentration im BCA-Assay wurde mittels fluorimetrischer Analyse bestimmt und an Hand der Standarts, A01-C05, errechnet.

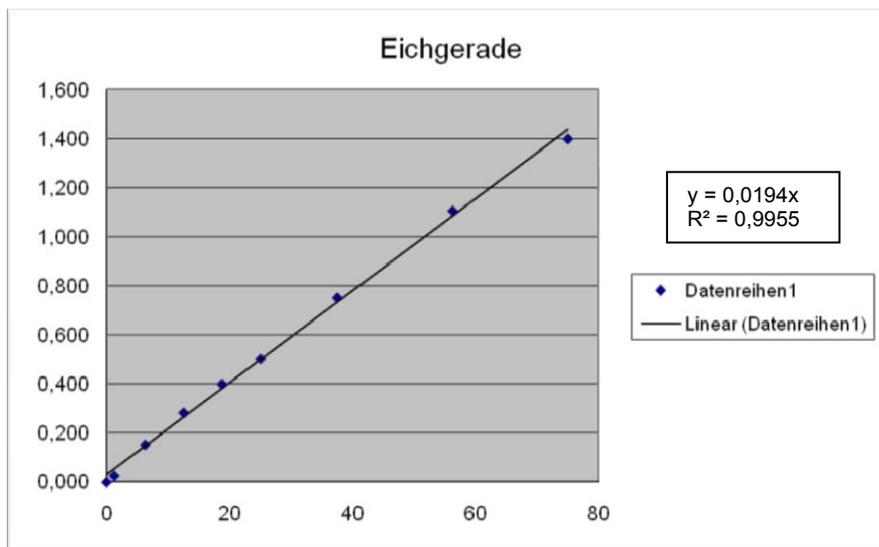


Abbildung 22: Eichgerade zum BCA-Assay zur Ermittlung der Proteinkonzentration des Gesamtextraktes der Patientenproben PRT/PRN und FMT/FMN.

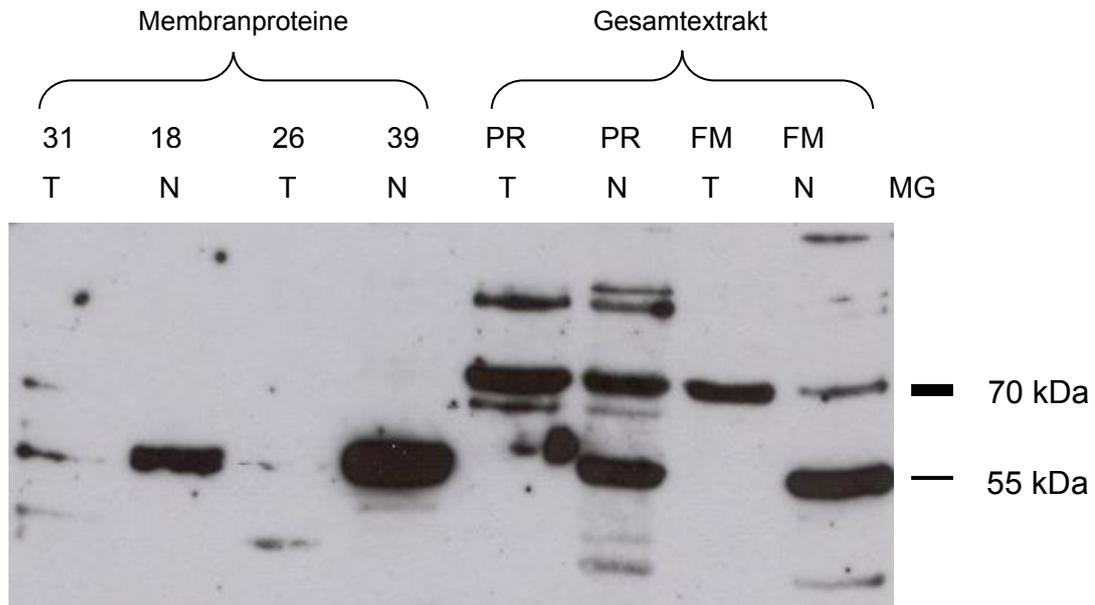


Abbildung 23: Western Blot Analyse von OATP2A1 in den Proben 31/18, 26/39, PRT/PRN, FMT/FMN. Zusatz: Folgende Bedingungen wurden angewendet: Membran gestrippt, 1. Antikörper: OATP2A1 1:400, 2. Antikörper: goat anti-rabbit IgG 1:10 000 + 1% goat serum, 5 Minuten exponiert OATP2A1 ist als deutliche Bande im Gesamtextrakt in den Proben PRT, PRN, FMT und FMN bei einem Molekulargewicht von 70 kDa sichtbar. In der Membranfraktion bzw. im Gesamtextrakt sind Banden des OATP2A1 in den Proben N18, N39, PRN und FMN bei einem Molekulargewicht von 55 kDa ersichtlich.

Für den Western Blot in Abbildung 23 wurde die Membranproteinfraktion sowie zum Vergleich die Gesamtextrakte aus Normalgewebe (N) und Tumorgewebe (T) zweier Patienten verwendet. Die Konzentrationen der aufgetragenen Proben 31/18, 26/39, PRT/PRN und FMT/FMN sind in Tabelle 15 im Appendix ersichtlich. Nummer 31/18 bzw. PRT/PRN entsprechen einem Adenokarzinoms (AC), Nummer 26/39 bzw. FMT/FMN entsprechen einem Cholangiokarzinoms (CholC). Probe 26/39 wurde für diese Western Blot Analyse abermals verwendet, da eine erfolgreiche Expression des OATP2A1 in dieser Probe gewährleistet werden konnte.

Die Membran wurde gestrippt, mit TBS-T gewaschen und für zwei Stunden mit dem 1. Antikörper, OATP2A1, bei einer Verdünnung von 1:400 inkubiert. Danach wurde wieder mit TBS-T gewaschen und für eine Stunde mit dem 2. Antikörper goat anti-rabbit IgG bei einer Verdünnung von 1:10000 plus 1%em goat serum inkubiert. Nach nochmaligem Waschen der Membran mit TBS-T und Behandlung mit SuperSignal wurde der Film nach einer Expositionszeit von 5 Minuten entwickelt.

OATP2A1 ist als deutliche Bande im Gesamtextrakt in den Proben PRT, PRN, FMT und FMN bei einem Molekulargewicht von 70 kDa sichtbar. In der Membranfraktion bzw. im Gesamtextrakt sind Banden des OATP2A1 in den Proben N18, N39, PRN und FMN bei einem Molekulargewicht von 55 kDa ersichtlich. Immunreaktive Banden der Proben 31/18 und 26/39 konnten bei einem Molekulargewicht von 70 kDa nicht detektiert werden. Zudem konnten auch keine immunreaktiven Banden bei den Proben PRT, FMT sowie nur schwache Banden bei den Proben 31 und 26 detektiert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die 70 kDa Banden, die dem errechneten Molekulargewicht des Proteins entspricht, im Tumorgewebe stärker ausgeprägt ist als im Normalgewebe. Dies würde mit der erhöhten mRNA Expression, die zuvor in unserem Labor gezeigt wurde, übereinstimmen. Bei der Membranproteinfraktion der Banden in Höhe von 55 kDa ist anzunehmen, dass es sich dabei um ein Spaltprodukt von OATP2A1 handelt.

Im Western Blot in Abbildung 24 wurde PDI als Ladungskontrolle verwendet. Als Vorbehandlung wurde die Membran gestrippt, mit TBS-T gewaschen, schließlich mit dem 1. Antikörper PDI bei einer Verdünnung von 1:10000 über eine Stunde inkubiert, mit TBS-T gewaschen und mit dem 2. Antikörper rabbit anti-mouse IgG bei einer Verdünnung von 1:20000 über eine Stunde inkubiert. Nach nochmaligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran mit SuperSignal behandelt und der Film nach einer Expositionszeit von 15 Sekunden entwickelt. Die gleichmäßigen PDI-Banden in Höhe von ungefähr 61 kDa zeigen, dass von allen Proben, mit Ausnahme von Probe 31 und 26, ungefähr gleich hohe Proteinmengen aufgetragen wurden

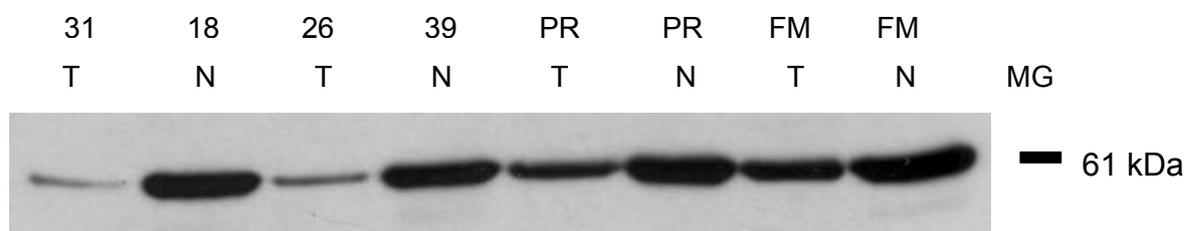


Abbildung 24: Western Blot Analyse des PDI in den Proben 31/18, 26/39, PRT/PRN und FMT/FMN. Zusatz: Folgende Bedingungen wurden angewendet: Membran gestrippt, 1. Antikörper: PDI 1:10 000, 2. Antikörper: goat anti-mouse IgG 1:20 000, 30 Sekunden exponiert. Mit Ausnahmen der Proben 31 und 26 weisen die gleichmäßigen Bandenstärken auf eine annähernd gleiche Proteinmenge in den Proben hin.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Western Blot Analysen von OATP2A1 in den Gesamtproteinfraktionen der untersuchten Patientenproben im Tumorgewebe höhere Expressionsraten aufzeigten als im Normalgewebe bzw. in der Membranproteinfraktion höhere Expressionsraten im Normalgewebe im Vergleich zum Tumorgewebe zu detektieren waren.

Abschließend kann man sagen, dass von den 20 Patientenproben 12 Proben für die Western Blot Analyse von OATP1B1 und 5 Proben für die Western Blot Analyse von OATP2A1 herangezogen worden sind.

Es konnte gezeigt werden, dass OATP1B1, das immunoreaktive Banden bei einem Molekulargewicht von 70 kDa in Membranfraktionen gab, in allen Proben eine höhere Expression im Normalgewebe als im Tumor aufweist.

Der Prostaglandintransporter OATP2A1 gibt im Western Blot in Membranfraktionen immunoreaktive Banden bei 50 kDa, während in Gesamtextrakten sowohl bei 50 als auch beim errechneten Molekulargewicht von 70 kDa immunoreaktive Banden nachzuweisen sind. Das 70 kDa Protein in den Gesamtextrakten zeigte eine höhere Expressionsrate im Tumorgewebe aller Patienten verglichen zum Normalgewebe, während das 50 kDa Protein der Gesamt- und Membranextrakte im Normalgewebe eine höhere Expressionsrate als im Tumor hatte. Diese Ergebnisse korrelieren mit den mRNA-Ergebnissen unseres Labors. Wie sich diese Resultate auf den Transport von Substraten und Medikamenten, deren Wirkung und unerwünschte Wirkungen auswirken, ist noch unklar. Jedoch stellen sie eine Grundlage für weitere Forschungsarbeiten in der Antikrebstherapie bei Leberkrebs dar.

In Proben von Patienten mit Lebertumoren (siehe Patientenverzeichnis Tabelle 5, Abschnitt 4) wurde die Expression von OATP1B1 und OATP2A1 in Normalgewebe (N) und Tumorgewebe (T) bestimmt. Tabelle 10 und 11 zeigen eine Zusammenfassung der Expressionsraten der einzelnen Transporter in den Proben.

OATP1B1

Tabelle 10: Expressionsraten von OATP1B1 in den gepaarten Proben 21/1, 14/10, 16/7, 20/35, 49/48, 37/2, 17/43, 27/22, 40/44, 34/38, 42/23 und 41/12. OATP1B1 weist in allen Proben eine höhere Expression im Normalgewebe im Vergleich zum Tumorgewebe auf.

Sample #		Expressionsraten von OATP1B1	
T	N	T	N
21	1	-	+++
14	10	-	+++
16	7	-	++
20	35	-	+++
49	48	++	+++
37	2	++	+++
17	43	-	++
27	22	-	+++
40	44	++	+++
34	38	+	+++
42	23	-	+++
41	12	+	+++

OATP2A1

Tabelle 11: Expressionsraten von OATP2A1 in den gepaarten Proben 27/2, 26/39, 20/35, 49/48, PRT/PRN und FMT/FMN. OATP2A1 weist in den Proben 27/2, 26/39, 20/35 und 49/48 eine höhere Expression im Normalgewebe im Vergleich zum Tumorgewebe auf. In den Proben PRT/PRN und FMT/FMN ist die Expression von OATP2A1 im Tumorgewebe höher als im Normalgewebe.

Sample #		Expressionsraten von OATP2A1	
T	N	T	N
27	2	+	+++
26	39	-	+++
20	35	-	+++
49	48	-	+++
PRT	PRN	+++	++
FMT	FMN	++	+

5. Zusammenfassung

Leberkrebs ist eine der Tumorerkrankungen mit sehr schlechter Prognose. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sie meist erst in einem späten Stadium erkannt werden und auch meistens weitgehend chemoresistent sind. Neben operativer Entfernung des Tumors wird meist anschließend eine Chemotherapie mit Zytostatika durchgeführt. Ob solch eine Therapie den gewünschten Erfolg erzielt, hängt unter anderem davon ab, ob die Konzentration der Zytostatika in den Zellen ausreichend ist. Es ist bekannt, dass eine Überexpression des ABC-Efflux-Transporters einen vermehrten Efflux von Arzneistoffen aus der Zelle hinaus bewirkt. Es wäre möglich, dass Aufnahmetransporter der OATP-Familie den erhöhten Abtransport durch eine effektive Aufnahme kompensieren könnten. Dafür müssen aber OATP-Proteine in den Tumoren exprimiert sein.

Daher war es das Ziel dieser Arbeit die Expression der OATP-Transporter auf Proteinebene in Proben von Lebertumoren zu untersuchen. Dies wurde mittels Western Blot Analyse durchgeführt und die Expression der Transporter OATP1B1 und 2A1 im Tumorgewebe und den dazugehörigen nicht-malignen Lebergewebe in Tumorproben von Patienten bestimmt. Die ausgewählten Proben umfassten primäre Leberkarzinome (hepatozelluläre Karzinome und Cholangiokarzinome), sowie Lebermetastasen maligner Tumore anderer Gewebe (Kolonkarzinome).

Von den 20 Patientenproben wurden 12 für die Western Blot Analyse von OATP1B1 herangezogen. Es konnte gezeigt werden, dass OATP1B1, das immunoreaktive Banden bei einem Molekulargewicht von 70 kDa in Membranfraktionen gab, in allen Proben eine höhere Expression im Normalgewebe als im Tumor aufweist. Für die Western Blot Analyse von OATP2A1 wurden 5 der 20 Patientenproben herangezogen. Der Prostaglandintransporter OATP2A1 gibt im Western Blot in Membranfraktionen immunoreaktive Banden bei 50 kDa, während in Gesamtextrakten sowohl bei 50 als auch beim errechneten Molekulargewicht von 70 kDa immunoreaktive Banden nachzuweisen sind. Das 70 kDa Protein zeigte eine höhere Expressionsrate im Tumorgewebe aller Patienten verglichen zum Normalgewebe, während OATP2A1 das in Membranextrakten bei 50 kDa nachweisbar war, im Normalgewebe eine höhere Expressionsrate als im Tumor hatte. Ein Vergleich der Proteinexpression mit den im Labor bekannten mRNA Expressionsdaten zeigte, dass

die niedrige mRNA Expression für OATP1B1 in den Tumoren mit den geringeren Proteinspiegeln im Normalgewebe korrelierte.

Die höheren OATP2A1 mRNA Spiegel in den Tumoren korrelierten auch mit den höheren OATP2A1 Proteinspiegeln in den Proteinextrakten.

Zusammenfassend kann man sagen, dass diese Arbeit das unterschiedliche Expressionsmuster der OATP1B1 und 2A1 Transporter in Lebertumor- und Normalgewebe aufzeigt. Diese Daten können als Grundlage für weitere Forschungsarbeiten dienen, die die Rolle der Transporter OATP1B1 und OATP2A1 für die Aufnahme von Zytostatika untersuchen. Dies könnte für die Chemotherapie der Lebertumoren von Bedeutung sein.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomische Lage der Leber	5
Abbildung 2: Rolle der verschiedenen Transporter bei der Aufnahme und Ausscheidung von Wirkstoffen und ihr Zusammenspiel mit dem Phase I und II Metabolismus in der hepatischen Elimination von Wirkstoffen	13
Abbildung 3: Transmembranmodell des humanen OATP1B1	15
Abbildung 4: Das Ergebnis einer funktionellen Änderung in der Transportaktivität auf pharmakologische und toxikologische Effekte von Wirkstoffen	25
Abbildung 5: Genetische Polymorphismen des OATP1B1	28
Abbildung 6: BCA-Reaktion.....	33
Abbildung 7: Schematische Darstellung der SDS-PAGE	36
Abbildung 8: SDS (Sodium Dodecyl Sulfat).....	37
Abbildung 9: β -Mercaptoethanol	37
Abbildung 10: Acrylamid-Polymerisation	37
Abbildung 11: Prinzip des Western Immunoblots	41
Abbildung 12: Western Blot Sandwich	43
Abbildung 13: Eichgerade zum BCA-Assay zur Ermittlung der Protein- konzentration aller Patientenproben von Tabelle 7	57
Abbildung 14: Western Blot Analyse von OATP1B1 in den Proben 21/1, 14/10, 16/7, 26 und 20/35.	58
Abbildung 15: Western Blot Analyse des PDI in den Proben 21/1, 14/10, 16/7, 26 und 20/35.	59
Abbildung 16: Western Blot Analyse von OATP1B1 in den Proben 49/48, 37/2 und 20/35	60
Abbildung 17: Western Blot Analyse des PDI in den Proben 49/48, 37/2 und 20/35.	61
Abbildung 18: Western Blot Analyse von OATP1B1 in den Proben 17/43, 49/48, 14/10 und 27/22.	62
Abbildung 19: Western Blot Analyse von OATP1B1 in den Proben 40/44, 34/38, 42/23 und 41/12.	63

Abbildung 20: Western Blot Analyse des PDI in den Proben 40/44, 34/38, 42/23 und 41/12.	64
Abbildung 21: Western Blot Analyse von OATP2A1 in den Proben 27/2, 26/39, 20/35 und 49/48.	65
Abbildung 22: Eichgerade zum BCA-Assay zur Ermittlung der Protein- konzentration des Gesamtextraktes der Patientenproben PRT/PRN und FMT/FMN.	67
Abbildung 23: Western Blot Analyse von OATP2A1 in den Proben 31/18, 26/39, PRT/PRN, FMT/FMN.	68
Abbildung 24: Western Blot Analyse des PDI in den Proben 31/18, 26/39, PRT/PRN und FMT/FMN.	69

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation.....	7
Tabelle 2: Neue und alte Gen- und Proteinnameklatur	16
Tabelle 3: Substrate der humanen OATPs.....	23
Tabelle 4: Polymorphismen, Allele und Aminosäureaustausch in SLCO Genen.....	26
Tabelle 5: Patientenverzeichnis.....	48
Tabelle 6A: Semiquantitative Bestimmung der Protein-, Sample Buffer (+ β Mercaptoethanol)- und PBS-Menge von Membranproteinen aus Normalgewebe (N), Tumorgewebe (T), sowie vom Gesamtextrakt aus dem Normalgewebe (G) unspezifischer humaner Leberzellen, die pro Tasche des Gels aufgetragen werden.....	50
Tabelle 6B: Auftragschema für die Proben N, T und G	51
Tabelle 7: Zusammenfassung der Ergebnisse unterschiedlicher Behandlungsmethoden der Membranen 1-7	55
Tabelle 8: BCA-Assay: Nachweis der Probenkonzentration der Membranextrakte aus Normal- und Tumorgewebe aller Patienten.....	56
Tabelle 9: BCA-Assay: Nachweis der Probenkonzentration der Gesamtextrakte der Patienten PRT/PRN, FMT/FMG	66
Tabelle 10: Expressionsraten von OATP1B1 in den gepaarten Proben 21/1, 14/10, 16/7, 20/35, 49/48, 37/2, 17/43, 27/22, 40/44, 34/38, 42/23 und 41/12.	71
Tabelle 11: Expressionsraten von OATP2A1 in den gepaarten Proben 27/2, 26/39, 20/35, 49/48, PRT/PRN und FMT/FMN.....	71
Tabelle 12: Semiquantitative Bestimmung der Protein-, Sample Buffer- und PBS-Konzentration für die Patienten 21/1, 14/10, 16/7, 20/35.....	78
Tabelle 13: Semiquantitative Bestimmung der Protein-, Sample Buffer- und PBS-Konzentration für die Patienten 49/48, 37/2, 20/35	78
Tabelle 14: Semiquantitative Bestimmung der Protein-, Sample Buffer- und PBS-Konzentration für die Patienten 17/43, 49/48, 14/10, 27/22.....	79
Tabelle 15: Konzentrationsbestimmungen von Probe, Sample Buffer und PBS für die Patienten 40/44, 34/38, 42/23, 41/12.....	79

Tabelle 16: Semiquantitative Bestimmung der Protein-, Sample Buffer- und PBS-Konzentration für die Patienten 37/2, 26/39, 20/35, 49/48..... 80

Tabelle 17: Semiquantitative Bestimmung der Protein-, Sample Buffer- und PBS-Konzentration für die Patienten 31/18, 26/39, Gesamt PR tumor, Gesamt PR normal, Gesamt FM tumor, Gesamt FM normal..... 80

8. Appendix A

Tabelle 12: Semiquantitative Bestimmung der Protein-, Sample Buffer- und PBS-Konzentration für die Patienten 21/1, 14/10, 16/7, 20/35

Patienten #	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Menge in μl an Probe, Sample Buffer (+ β -Mercaptoethanol) und PBS die pro Tasche des Gels aufgetragen werden		
		Probe	sample buffer	PBS
35	0,97	21,45	11,81	13,98
20	1,22	17,13	11,81	18,30
26	0,89	23,56	11,81	11,87
7	1,64	12,73	11,81	22,70
16	0,67	30,94	11,81	4,49
10	1,24	16,89	11,81	18,54
14	0,82	25,59	11,81	9,841
1	1,10	18,94	11,81	16,48
21	1,24	16,89	11,81	18,54
			93,55	4X-sample buffer
			23,38	β -Mercaptoethanol

Tabelle 13: Semiquantitative Bestimmung der Protein-, Sample Buffer- und PBS-Konzentration für die Patienten 49/48, 37/2, 20/35

Patienten #	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Menge in μl an Probe, Sample Buffer (+ β -Mercaptoethanol) und PBS die pro Tasche des Gels aufgetragen werden		
		Probe	sample buffer	PBS
35	0,97	18,23	11,81	17,20
20	1,22	14,56	11,81	20,87
2	0,98	18,13	11,81	17,30
37	0,79	22,39	11,81	13,04
48	0,78	22,83	11,81	12,60
49	0,50	35,16	11,81	0,27
			83,16	4X-sample buffer
			20,79	β -Mercaptoethanol

Tabelle 14: Semiquantitative Bestimmung der Protein-, Sample Buffer- und PBS-Konzentration für die Patienten 17/43, 49/48, 14/10, 27/22

Menge in μl an Probe, Sample Buffer (+ β -Mercaptoethanol) und PBS die pro Tasche des Gels aufgetragen werden				
Patienten #	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Probe	sample buffer	PBS
22	0,91	19,53	11,81	15,90
27	0,83	21,49	11,81	13,94
10	1,24	14,36	11,81	21,07
14	0,82	21,75	11,81	13,68
48	0,78	22,83	11,81	12,60
49	0,50	35,16	11,81	0,27
43	1,86	9,590	11,81	25,84
17	1,60	11,09	11,81	24,34
			83,16	4X-sample buffer
			20,79	β -Mercaptoethanol

Tabelle 15: Konzentrationsbestimmungen von Probe, Sample Buffer und PBS für die Patienten 40/44, 34/38, 42/23, 41/12

Menge in μl an Probe, Sample Buffer (+ β -Mercaptoethanol) und PBS die pro Tasche des Gels aufgetragen werden				
Patienten #	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Probe	sample buffer	PBS
12	1,37	12,96	11,81	22,47
41	0,79	22,58	11,81	12,84
23	1,85	9,63	11,81	25,80
42	0,77	23,06	11,81	12,37
38	1,57	11,30	11,81	24,12
34	1,01	17,63	11,81	17,80
44	1,29	13,77	11,81	21,66
40	0,65	27,24	11,81	8,18
			83,16	4X-sample buffer
			20,79	β -Mercaptoethanol

Tabelle 16: Semiquantitative Bestimmung der Protein-, Sample Buffer- und PBS-Konzentration für die Patienten 37/2, 26/39, 20/35, 49/48

Menge in μl an Probe, Sample Buffer (+ β -Mercaptoethanol) und PBS die pro Tasche des Gels aufgetragen werden				
Patienten #	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Probe	sample buffer	PBS
48	0,78	22,83	11,81	12,60
49	0,50	35,16	11,81	0,271
35	0,97	18,23	11,81	17,20
20	1,22	14,56	11,81	20,87
39	1,68	10,56	11,81	24,87
26	0,89	20,02	11,81	15,41
2	0,98	18,13	11,81	17,30
37	0,79	22,39	11,81	13,04
			83,16	4X-sample buffer
			20,79	β -Mercaptoethanol

Tabelle 17: Semiquantitative Bestimmung der Protein-, Sample Buffer- und PBS-Konzentration für die Patienten 31/18, 26/39, Gesamt PR tumor, Gesamt PR normal, Gesamt FM tumor, Gesamt FM normal

Menge in μl an Probe, Sample Buffer (+ β -Mercaptoethanol) und PBS die pro Tasche des Gels aufgetragen werden				
Patienten #	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Probe	sample buffer	PBS
Gesamt FM normal	2,88	5,81	11,81	29,62
Gesamt FM tumor	1,20	13,92	11,81	21,51
Gesamt PR normal	3,01	5,57	11,81	29,86
Gesamt PR tumor	2,13	7,86	11,81	27,56
39	1,68	9,94	11,81	25,49
26	0,89	18,84	11,81	16,58
18	1,29	13,00	11,81	22,43
31	0,67	24,72	11,81	10,70
			83,16	4X-sample buffer
			20,79	β -Mercaptoethanol

9. Literaturverzeichnis

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

Abe T, Unno M, Onogawa T, Tokui T, Kondo TN, Nakagomi R, Adachi H, Fujiwara K, Okabe M, Suzuki T, Nunoki K, Sato E, Kakyo M, Nishio T, Sugita J, Asano N, Tanemoto M, Seki M, Date F, Ono K, Kondo Y, Shiiba K, Suzuki M, Ohtani H, Shimosegawa T, Iinuma, Nagura H, Ito S, Matsuno S (**2001**) LST-2, a human liver-specific organic anion transporter, determines methotrexate sensitivity in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology* 120:1689-1699

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

Baminger H, Kombinierte Vorgangsweise beim hepatozellulären Karzinom (HCC): Ein neues Behandlungskonzept bei nicht resezierbarer Erkrankung (**2009**) *Journal für Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen* 7:25-27

Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS (**1981**) Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus: a prospective study of 22,707 men in Taiwan. *Lancet* 2:1129-1133.

Berlakovich G, Graziadei I, Grünberger T, Lammer L, Leutgeb C, Margreiter R, Peck Radosavlijevic M, Scheithauer W, Trauner M (**2008**) Stellenwert von Sorafenib in der Behandlung des Hepatozellulären Karzinoms (HCC). *Internationale Zeitschrift für ärztliche Fortbildung* 19:1726-0027

Boyault S, Rickman DS, de Reynies A, Balabaud C, Rebouissou S, Jeannot E, Hérault A, Saric J, Belghiti J, Franco D, Bioulac-Sage P, Laurent-Puig P, Zucman-Rossi J (**2007**) Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology* 45:42-52.

Breuhahn K, Vreden S, Haddad R, Beckebaum S, Stippel D, Flemming P, Nussbaum T, Caselmann WH, Haab BB, Schirmacher P (**2004**) Molecular profiling of human hepatocellular carcinoma defines mutually exclusive interferon regulation and insulin-like growth factor II overexpression. *Cancer Research* 64:6058-6064.

Bronger H, König J, Kopplow K, Steiner HH, Ahmadi R, Herold-Mende C, Keppler D, Nies AT (2005) ABCC drug efflux pumps and organic anion uptake transporters in human gliomas and the blood-tumor barrier. *Cancer Research* 65:11419-11428.

Brown KA, Bouchard N, Lussier JG, Sirois J (2007) Down-regulation of messenger ribonucleic acid encoding an importer of sulfoconjugated steroids during human chorionic gonadotropin-induced follicular luteinization in vivo. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 103:10-9.

Bruix J, Calvet J, Costa J, et al. (1989) Prevalence of antibody to hepatitis C virus in Spanish patients with hepatocellular carcinoma and hepatic cirrhosis. *Lancet* 2:1004-1006.

Bruix J, Boix L, Sala M, Llovet J (2004) Focus on hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 5:215-219.

Bruix J, Sherman M (2005) Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 42:1208-1236.

Chang MH, Chen CJ, Lai MS, Hsu HM, Wu TC, Kong MS, Liang DC, Shau WY, Chen DS (1997) Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. *New England Journal of Medicine* 336:1855-1859.

Chiang D, Villanueva A, Hoshida Y, Peix J, Newell P, Minguez B, LeBlanc AC, Donovan DJ, Thung SN, Solé M, Tovar V, Alsinet C, Ramos AH, Barretina J, Roayaie S, Schwartz M, Waxman S, Bruix J, Mazzaferro V, Ligon AH, Najfeld V, Friedman SL, Sellers WR, Meyerson M, Llovet JM (2008) Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Cancer Research* 68:6779-6788.

Colombo M, Choo QL, Del Ninno E, Tommasini MA, Dioguardi N, Houghton M (1989) Prevalence of antibody to hepatitis C virus in Italian patients with hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2:1006-1008.

Cui Y, König J, Nies AT, Pfannschmidt M, Hergt M, Franke WW, Alt W, Moll R, Keppler D (2003) Detection of the human organic anion transporters SLC21A6 (OATP2) and SLC21A8 (OATP8) in liver and hepatocellular carcinoma. *Laboratory Investigation* 83:527-538.

Dancygier H (2003) *Klinische Hepatologie* 1:10-11.

- Dancygier H (2003a)** Klinische Hepatologie 1:761.
- Denoix PF (1946)** Enquete permanent dans les centres anticancereaux, Bulletin. Institut National d'Hygiene 1:70-75.
- Dixon K (2003)** Liver Cancer Treatment. <http://www.livercancertreatment.org/>, entnommen am 28. Jän. 2010
- Dobson PD, Kell DB (2008)** Carrier-mediated cellular uptake of pharmaceutical drugs: an exception or the rule? Nature Reviews Drug Discovery. 7:205-220.
- Farazi PA, DePinho RA (2006)** Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. Nature Reviews of Cancer 6:674-687.
- Fujiwara K, Adachi H, Nishio T, Unno M, Tokui T, Okabe M, Onogawa T, Suzuki T, Asano N, Tanemoto M, Seki M, Shiiba K, Suzuki M, Kondo Y, Nunoki K, Shimosegawa T, Iinuma K, Ito S, Matsuno S, Abe T. (2001)** Identification of thyroid hormone transporters in humans: Different molecules are involved in a tissue-specific manner. Endocrinology 142:2005-2012.
- Furihata T, Satoh N, Ohishi T, Ugajin M, Kameyama Y, Morimoto K, Matsumoto S, Yamashita K, Kobayashi K, Chiba K (2009)** Functional analysis of a mutation in the SLCO1B1 Gene (c.1628T>G) identified in a japanese patient with pravastatin-induced myopathy. Pharmacogenomics 9:185-193.
- Gao B, Hagenbuch B, Kullak-Ublick GA, Benke D, Aguzzi A, Meier PJ (2000)** Organic anion-transporting polypeptides mediate transport of opioid peptides across blood–brain barrier. Journal of Pharmacology and Experimental Therapy 294:73-79.
- Gao B, Huber RD, Wenzel A, Vavricka SR, Ismail MG, Reme C, Meier PJ (2005)** Localization of organic anion transporting polypeptides in the rat and human ciliary body epithelium. Experimental Eye Research 80:61-72.
- Geyer J, Doring B, Failing K, Petzinger E (2004)** Molecular cloning and functional characterization of the bovine (*Bos taurus*) organic anion transporting polypeptide Oatp1a2 (*Slco1a2*). Comparison of Biochemistry and Physiology, Biochemistry and Molecular Biology 137:317-329.
- Giacomini KM, Sugiyama Y (2005)** Membrane transporters and drug response 11:41-70.
- Glaeser H, Bailey DG, Dresser GK, Gregor JC, Schwarz UI, McGrath JS, Jolicoeur E, Lee W, Leake BF, Tirona RG, Kim RB (2007)** Intestinal drug transporter

expression and the impact of grapefruit juice in humans. *Clinical Pharmacology and Therapy* 81:362-70

Grube M, Köck K, Oswald S, Draber K, Meissner K, Eckel L, Bohm M, Felix SB, Vogelgesang S, Jedlitschky G, Jedlitschky G, Siegmund W, Warzok R, Kroemer HK (2006) Organic anion transporting polypeptide 2B1 is a high-affinity transporter for atorvastatin and is expressed in the human heart. *Clinical Pharmacology and Therapy* 80:607-620.

Gupta SC, Gupta CD, Arora AK (1977) Subsegmentation of the human liver. *Journal of Anatomy* 124:413-23

Hagenbuch B, Meier PJ (2003) The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochimica et Biophysica Acta* 1609:1-18.

Hagenbuch B, Meier PJ (2004) Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: Phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Archives* 447:653-665.

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

Hänggi E, Grundschober AF, Leuthold S, Meier PJ, St-Pierre MV (2006) Functional analysis of the extracellular cysteine residues in the human organic anion transporting polypeptide, OATP2B1. *Molecular Pharmacology* 70:806-817.

Ho RH, Kim RB (2005) Transporters and drug therapy: implications for drug disposition and disease. *Journal of Clinical Pharmacology and Therapy* 78:260-277.

Hiang B, Zhu Y, Wang Z, Wu Y, Sasseville V, Yang W-P, Kirchgessner TG (1999) A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2). *Journal of Biology and Chemistry* 274:37161-37168

Huang Y (2007) Pharmacogenetics/genomics of membrane transporters in cancer chemotherapy, *Cancer Metastasis Review* 26:183-201.

Huber RD, Gao B, Sidler Pfandler MA, Zhang-Fu W, Leuthold S, Hagenbuch B, Folkers G, Meier PJ, Stieger B (2007) Characterization of two splice variants of human organic anion transporting polypeptide 3A1 isolated from human brain. *American Journal of Physiology* 292:C795-C806.

Igel M, Arnold KA, Niemi M, Hofmann U, Schwab M, Lutjohann D, von Bergmann K, Eichelbaum M, Kivisto, KT (2006) Impact of the SLCO1B1 polymorphism on the

pharmacokinetics and lipid-lowering efficacy of multiple-dose pravastatin. *Journal of Clinical Pharmacology and Therapy* 79:419-426.

Iida A, Saito S, Sekine A, Mishima C, Kondo K, Kitamura Y, Harigae S, Osawa S, Nakamura Y (2001) Catalog of 258 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes encoding three organic anion transporters, three organic anion-transporting polypeptides, and three NADH: ubiquinone oxidoreductase flavoproteins. *Journal of Human Genetics* 46:668-683

Ishak KG, Anthony PP, Sobin LH (1994) *Histological Typing of Tumours of the Liver* 2:11-13.

Ishak KG, Goodman ZD, Stocker JT (1999) *Atlas of Tumor Pathology, Tumors of the Liver and Intrahepatic Bile Ducts*. Armed Forces Institute of Pathology 2:199-200.

Jacquemin E, Hagenbuch B, Stieger B, Wolkoff AW, Meier PJ (1994) Expression cloning of a rat liver Na(+)-independent organic anion transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91:133-137.

Jung D, Hagenbuch B, Gresh L, Pontoglio M, Meier PJ, Kullak-Ublick GA (2001) Characterization of the human OATP-C (SLC21A6) gene promoter and regulation of liver-specific OATP genes by hepatocyte nuclear factor 1 alpha. *Journal of Biology and Chemistry* 276:37206-37214

Jung D, Podvinec M, Meyer UA, Mangelsdorf DJ, Fried M, Meier PJ, Kullak-Ublick GA (2002) Human organic anion transporting polypeptide OATP8 (SLC21A8) promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *Gastroenterology* 122:1954-1966

Kaetzel CS, Rao CK, Lamm ME (1987) Protein disulphide-isomerase from human placenta and rat liver. Purification and immunological characterization with monoclonal antibodies. *Biochemical Journal* 241:39-47.

Kalliokoski A, Backman JT, Neuvonen PJ, Niemi M (2008a) Effects of the SLCO1B1*1B haplotype on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of repaglinide and nateglinide. *Pharmacogenetics and Genomics* 18:937-942.

Kalliokoski A, Neuvonen M, Neuvonen PJ, Niemi M (2008b) The effect of SLCO1B1 polymorphism on repaglinide pharmacokinetics persists over a wide dose range. *Journal of Clinical Pharmacology* 66:818-825.

- Kalliokoski A, Neuvonen M, Neuvonen PJ, Niemi M (2008c)** Different effects of SLCO1B1 polymorphism on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of repaglinide and nateglinide. *Journal of Clinical Pharmacology* 48:311-321.
- Kalliokoski A, Niemi M (2009)** Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Journal of Clinical Pharmacology* 158:693-705.
- Kameyama Y, Yamashita K, Kobayashi K, Hosokawa M, Chiba K (2005)** Functional characterization of SLCO1B1 (OATP-C) variants, SLCO1B1*5, SLCO1B1*15 and SLCO1B1*15+C1007G, by using transient expression systems of HeLa and HEK293 cells. *Pharmacogenetics and Genomics* 15:513-522.
- Kanai N, Lu R, Satriano AJ, Bao Y, Wolkoff AW, Schuster VL (1995)** Identification and characterization of a prostaglandin transporter. *Science* 268:866-869.
- Katz DA, Carr R, Grimm DR, Xiong H, Holley-Shanks R, Mueller T, Leake B, Wang Q, Han L, Wang PG, Edeki T, Sahelijo L, Doan T, Allen A, Spear BB, Kim RB (2006)** Organic anion transporting polypeptide 1B1 activity classified by SLCO1B1 genotype influences atrasentan pharmacokinetics. *Clinical Pharmacology and Therapy* 79:186-196.
- Kobayashi D, Nozawa T, Imai K, Nezu J, Tsuji A, Tamai I (2003)** Involvement of human organic anion transporting polypeptide OATP-B (SLC21A9) in pH-dependent transport across intestinal apical membrane. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy* 306:703-708.
- König J, Cui Y, Nies AT, Keppler D (2000)** A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane. *American Journal of Physiology* 278:G156-G164
- König J, Cui Y, Nies AT, Keppler D (2000a)** Localization and genomic organization of a new hepatocellular organic anion transporting polypeptide. *Journal of Biology and Chemistry* 275:23161-23168.
- König J, Seithel A, Gradhand U, Fromm MF (2006)**. Pharmacogenomics of human OATP transporters. *Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology* 372:432-443.
- Kullak-Ublick GA, Hagenbuch B, Stieger B, Schteingart CD, Hofmann AF, Wolkoff AW, Meier PJ (1995)** Molecular and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide cloned from human liver. *Gastroenterology* 109:1274-1282

Kullak-Ublick GA, Glasa J, Boker C, Oswald M, Grutzner U, Hagenbuch B, Stieger B, Meier PJ, Beuers U, Kramer W, Wess G, Paumgartner G (1997) Chlorambucil-taurocholate is transported by bile acid carriers expressed in human hepatocellular carcinomas. *Gastroenterology* 113:1295-1305.

Kullak-Ublick GA, Ismair MG, Stieger B, Landmann L, Huber R, Pizzagalli F, Fattinger K, Meier PJ, Hagenbuch B (2001) Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology* 120:525-533

Kullak-Ublick GA, Stieger B, Hagenbuch B, Meier PJ (2000) Hepatic transport of bile salts. *Thieme Journal* 20:273-92.

Lee JS, Heo J, Libbrecht L, Chu IS, Kaposi-Novak P, Calvisi DF, Mikaelyan A, Roberts LR, Demetris AJ, Sun Z, Nevens F, Roskams T, Thorgeirsson SS (2006) A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Native Medicine* 12:410-416.

Lee SY, Williamson B, Caballero OL, Chen YT, Scanlan MJ, Ritter G, Jongeneel CV, Simpson AJ, Old LJ (2004) Identification of the gonad-specific anion transporter SLCO6A1 as a cancer/testis (CT) antigen expressed in human lung cancer. *Cancer Immunity: a Journal of the Academy of Cancer Immunology* 4:13.

Lee TK, Koh AS, Cui Z, Pierce RH, Ballatori N (2003) N-glycosylation controls functional activity of Oatp1, an organic anion transporter. *American Journal of Physiology and Gastrointestinal Liver Physiology* 285:G371-G381.

Lee W, Glaeser H, Smith LH, Roberts RL, Moeckel GW, Gervasini G, Leake BF, Kim RB (2005) Polymorphisms in human organic anion-transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2): implications for altered drug disposition and central nervous system drug entry. *Journal of Biology and Chemistry* 280:9610-9617.

Li L, Meier PJ, Ballatori N (2000) Oatp2 mediates bidirectional organic solute transport: a role for intracellular glutathione. *Molecular Pharmacology* 58:335-340

Li LQ, Lee TK, Meier PJ, Ballatori N (1998) Identification of glutathione as a driving force and leukotriene C-4 as a substrate for oatp1, the hepatic sinusoidal organic solute transporter. *Journal of Biology and Chemistry* 273:16184-16191

- Link E, Parish S, Armitage J, Bowman L, Heath S, Matsuda F, Gut I, Lathrop M, Collins R (2008)** SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy genome-wide Study. *New England Journal of Medicine* 359:789-799.
- Llovet JM, Burroughs A, Bruix J (2003)** Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 362:1907-1917.
- Llovet JM, Bruix J (2003a)** Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: chemoembolization improves survival. *Hepatology* 37:429-442.
- Lopez P, Villanueva A, Llovet JM (2006)** Systematic review: evidence-based management of hepatocellular carcinoma--an updated analysis of randomized controlled trials. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 23:1535-47.
- Lu R, Kanai N, Bao Y, Schuster VL (1996)** Cloning, in vitro expression, and tissue distribution of a human prostaglandin transporter cDNA (HPGT). *Journal of Clinical Investigation* 98:1142-1149
- Markus PM, König S, Liersch T, Becker H (2000)** Die Leberregeneration. *Der Onkologe* 6:348-355
- Maeda K, Sugiyama Y (2008)** Impact of genetic polymorphisms of transporters on the pharmacokinetic, pharmacodynamic and toxicological properties of anionic drugs. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 23:223-35.
- McMahon BJ, Alberts SR, Wainwright RB, Bulkow L, Lanier AP (1990)** Hepatitis B related sequelae. Prospective study in 1400 hepatitis B surface antigen-positive Alaska native carriers. *Archives of International Medicine* 150:1051-1054.
- Meier PJ, Eckhardt U, Schroeder A, Hagenbuch B, Stieger B (1997)** Substrate specificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake systems in rat and human liver. *Hepatology* 26:1667-1677.
- Meier PJ, Stieger B (2002)** Bile salt transporters. *Annual Reviews of Physiology* 64:635-661
- Michalski C, Cui Y, Nies AT, Nuessler AK, Neuhaus P, Zanger UM, Klein K, Eichelbaum M, Keppler D, König J (2002)** A naturally occurring mutation in the SLC21A6 gene causing impaired membrane localization of the hepatocyte uptake transporter. *Journal of Biology and Chemistry* 277:43058-43063.

Miki Y, Suzuki T, Kitada K, Yabuki N, Shibuya R, Moriya T, Ishida T, Ohuchi N, Blumberg B, Sasano H (2006) Expression of the steroid and xenobiotic receptor and its possible target gene, organic anion transporting polypeptide-A, in human breast carcinoma. *Cancer Research* 66:535-542.

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

Montalto G, Cervello M, Giannitrapani L, Dantona F, Terranova A, Castagnetta LA (2002) Epidemiology, risk factors, and natural history of hepatocellular carcinoma. *Annals of the New York Academy of Science* 963:13-20.

Morimoto K, Oishi T, Ueda S, Ueda M, Hosokawa M, Chiba K (2004) A novel variant allele of OATP-C (SLCO1B1) found in a Japanese patient with pravastatin-induced Myopathy. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 19:453-455.

Muto M, Onogawa T, Suzuki T, Ishida T, Rikiyama T, Katayose Y, Ohuchi N, Sasano H, Abe T, Unno M (2007) Human liver-specific organic anion transporter-2 is a potent prognostic factor for human breast carcinoma. *Cancer Science* 98:1570-1576.

Nakao N, Takagi T, Iigo M, Tsukamoto T, Yasuo S, Masuda T, Yanagisawa T, Ebihara S, Yoshimura T (2006) Possible involvement of organic anion transporting polypeptide 1c1 in the photoperiodic response of gonads in birds. *Endocrinology* 147:1067-1073.

Neumann J (2005) Universität Bonn, Skriptum Kurs Immunbiologie, <http://www.immunbiologie.uni-bonn.de/juergen/PDF/Skript%20WS0506.pdf>, entnommen am 10. Jän. 2010.

Niemi M, Schaeffeler E, Lang T, Fromm MF, Neuvonen M, Kyrklund C, Backman JT, Kerb R, Schwab M, Neuvonen PJ, Eichelbaum M, Kivistö KT (2004) High plasma pravastatin concentrations are associated with single nucleotide polymorphisms and haplotypes of organic anion transporting polypeptide-C (OATP-C, SLCO1B1). *Pharmacogenetics and Genomics* 14:429-440.

Niemi M, Neuvonen PJ, Hofmann U, Backman JT, Schwab M, Lutjohann D, von Bergmann K, Eichelbaum M, Kivisto K.T (2005) Acute effects of pravastatin on

cholesterol synthesis are associated with SLCO1B1 (encoding OATP1B1) haplotype *17. *Pharmacogenetics and Genomics* 15:303-309.

Niemi M, Kivistö KT, Hofmann U, Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF (2005a) Fexofenadine pharmacokinetics are associated with a polymorphism of the SLCO1B1 gene (encoding OATP1B1). *Journal of Clinical Pharmacology and Therapy* 59:602-604.

Niemi M, Backman JT, Kajosaari LI, Leathart JB, Neuvonen M, Daly AK, Eichelbaum M, Kivistö KT, Neuvonen PJ (2005b) Polymorphic organic anion transporting polypeptide 1B1 is a major determinant of repaglinide pharmacokinetics. *American Journal of Clinical Pharmacology and Therapy* 77:468-478.

Niemi M, Pasanen MK, Neuvonen PJ (2006) SLCO1B1 polymorphism and sex affect the pharmacokinetics of pravastatin but not fluvastatin. *American Journal of Clinical Pharmacology and Therapy* 80:356-366.

Niemi M (2007) Role of OATP transporters in the disposition of drugs. *Pharmacogenomics* 8:787-802.

Nies AT (2007) The role of membrane transporters in drug delivery to brain tumors. *Cancer Letters* 254:11-29.

Nishioka K, Watanabe J, Furuta S, Tanaka E, Iino S, Suzuki H, Tsuji T, Yano M, Kuo G, Choo QL, et al. (1991) A high prevalence of antibody to the hepatitis C virus in patients with hepatocellular carcinoma in Japan. *Cancer* 67:429-433.

Nishizato Y, Leiri I, Suzuki H, Kimura M, Kawabata K, Hirota T, Takane H, Irie S, Kusahara H, Urasaki Y, Urae A, Higuchi S, Otsubo K, Sugiyama Y (2003) Polymorphisms of OATP-C (SLC21A6) and OAT3 (SLC22A8) genes: consequences for pravastatin pharmacokinetics. *Journal of Clinical Pharmacology and Therapy* 73:554-565.

Noe B, Hagenbuch B, Stieger B, Meier PJ (1997) Isolation of a multispecific organic anion and cardiac glycoside transporter from rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 94:10346-10350

Nozawa T, Nakajima M, Tamai I, Noda K, Nezu J, Sai Y, Tsuji A, Yokoi T (2002) Genetic polymorphisms of human organic anion transporters OATP-C (SLC21A6) and OATP-B (SLC21A9): allele frequencies in the Japanese population and

functional analysis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy* 302:804-813.

Nozawa T, Suzuki M, Takahashi K, Yabuuchi H, Maeda T, Tsuji A, Tamai I (2004) Involvement of estrone-3-sulfate transporters in proliferation of hormone-dependent breast cancer cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy* 311:1032-1037.

Nozawa T, Minami H, Sugiura S, Tsuji A, Tamai I (2005) Role of organic anion transporter OATP1B1 (OATP-C) in hepatic uptake of irinotecan and its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin: in vitro evidence and effect of single nucleotide polymorphisms. *Drug Metabolism and Disposition* 33:434-439.

Okabe M, Szakács G, Reimers MA, Suzuki T, Hall MD, Abe T, Weinstein JN, Gottesmann MM (2008) Profiling SLCO and SLC22 genes in the NCI-60 cancer cell lines to identify drug uptake transporters. *Molecular Cancer Therapy* 7:3081-91.

Österreichische Krebshilfe (2002)

http://www.krebshilfe.net/beratung/_leberkrebs.shtml, (Zugriff am 28. Okt. 2009)

Pasanen MK, Neuvonen M, Neuvonen PJ, Niemi M (2006) SLCO1B1 polymorphism markedly affects the pharmacokinetics of simvastatin acid. *Pharmacogenetics and Genomics* 16:873-879.

Pasanen MK, Neuvonen PJ, Niemi M (2008) Global analysis of genetic variation in SLCO1B1. *Pharmacogenomics* 9:19-33.

Pisani P, Parkin DM, Muñoz N, Ferlay J (1997) Cancer and infection: estimates of the attributable fraction in 1990. *Cancer Epidemiology* 6:387-400.

Pizzagalli F, Hagenbuch B, Stieger B, Klenek U, Folkers G, Meier PJ (2002) Identification of a novel human organic anion transporting polypeptide (OATP-F) as a high affinity thyroxine transporter. *Molecular Endocrinology* 16:2283-2296

Pizzagalli F, Varga Z, Huber RD, Folkers G, Meier PJ, St-Pierre MV (2003) Identification of steroid sulfate transport processes in the human mammary gland. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88:3902-3912.

Proteinchemie II, Praktikumsskript, Biochemisches Praktikum für BSc-Studiengänge. Abteilung für Biochemie und Molekularbiologie, Fachbereich Chemie Universität Hamburg, www.chemie.uni-hamburg.de/bc/BC_Praktikum_Proteinchemie_II.pdf, Letzte Aktualisierung am 29. Okt. 2009, entnommen am 10. Jän. 2010.

Proteinchemie III Praktikumsskript, Biochemisches Praktikum für BSc-Studiengänge. Abteilung für Biochemie und Molekularbiologie, Fachbereich Chemie Universität Hamburg, www.chemie.uni-hamburg.de/bc/BC_Praktikum_Proteinchemie_III.pdf, Letzte Aktualisierung am 29. Okt. 2009, entnommen am 10. Jän. 2010.

Sai Y, Tsuji A (2004) Transporter-mediated drug delivery: recent progress and experimental approaches, *Drug Discovery Today* 9:712-720.

Sai Y, Kaneko Y, Ito S, Mitsuoka K, Kato Y, Tamai I, Artursson P, Tsuji A (2006) Predominant contribution of organic anion transporting polypeptide OATP-B (OATP2B1) to apical uptake of estrone-3-sulfate by human intestinal Caco-2 cells. *Drug Metabolism and Disposition* 34:1423-1431.

Santosh Patnaik (2004) Western Blotting, http://stanxterm.aecom.yu.edu/wiki/index.php?page=Western_blotting, Letzte Aktualisierung am 21. Dez. 2005, entnommen am 10. Jän. 2010.

Satlin LM, Amin V, Wolkoff AW (1997) Organic anion transporting polypeptide mediates organic anion/HCO₃-exchange. *Journal of Biology and Chemistry* 272:26340-26345

Sato K, Sugawara J, Sato T, Miutamari H, Suzuki T, Ito A, Mikkaichi T, Onogawa T, Tanemoto M, Unno M, Abe t, Okamura K (2003) Expression of organic anion transporting polypeptide E (OATP-E) in human placenta. *Placenta* 24:144-148.

Schuster VL (2002) Prostaglandin transport. *Prostaglandins and Other Lipid Mediation* 68-69:633-647

Seithel A, Glaeser H, Fromm MF, König J (2008) The functional consequences of genetic variations in transporter genes encoding human organic anion-transporting polypeptide family members. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* 4:51-64.

Shi XY, Bai S, Ford AC, Burk RD, Jacquemin E, Hagenbuch B, Meier PJ, Wolkoff AW (1995) Stable inducible expression of a functional rat liver organic anion transport protein in HeLa cells. *Journal of Biology and Chemistry* 270:25591-25595

St-Pierre MV, Ugele B, Hagenbuch B, Meier PJ, Stallmach T (2002) Characterization of an organic anion transporting polypeptide (OATP-B) in human placenta. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87:1856-1863.

- Suzuki T**, Onogawa T, Asano N, Mizutamari H, Mikkaichi T, Tanemoto M, Abe M, Satoh F, Unno M, Nunoki K, Suzuki M, Hishinuma T, Goto J, Shimosegawa T, Matsuno S, Ito S, Abe T **(2003)** Identification and characterization of novel rat and human gonad specific organic anion transporters. *Molecular Endocrinology* 17:1203-1215.
- Takane H**, Miyata M, Burioka N, Shigemasa C, Shimizu E, Otsubo K, Leiri I **(2006)** Pharmacogenetic determinants of variability in lipid-lowering response to pravastatin therapy. *Journal of Human Genetics*, 51:822-826.
- Tamai I**, Nezu J, Uchino H, Sai Y, Oku A, Shimane M, Tsuji A **(2000)** Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family. *Biochemistry and Biophysics Research Communications* 273:251-260.
- Thorgeirsson SS**, Grisham JW **(2002)** Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Natural Genetics* 31:339-346.
- Tirona RG**, Leake BF, Merino G, Kim RB **(2001)** Polymorphisms in OATP-C: identification of multiple allelic variants associated with altered transport activity among European- and African-Americans. *Journal of Biology and Chemistry* 276:35669-35675
- Tirona RG**, Leake BF, Wolkoff AW, Kim RB **(2003)** Human organic anion transporting polypeptide-C (SLC21A6) is a major determinant of rifampin-mediated pregnane X receptor activation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy* 304:223-228.
- Towbin H**, Staehelin T, Gordon J **(1979)** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Science in the USA* 76:4350-4.
- Tozer TN**, Rowland M **(2006)** Introduction to Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *The Quantitative Basis of Drug Therapy* 1:265-266.
- Trédan O**, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF **(2007)** Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *Journal of the National Cancer Institute* 99:1441-1454.
- UICC (2009)** TNM classification of malignant tumours. International Union against Cancer. <http://www.uicc.org/tnm>. Zugriff am 18. Nov. 2009.

Villanueva A, Newell P, Chiang D, Friedman S, Llovet JM (2007) Genes and signaling pathways involved in the pathogenesis of HCC. *Thieme Journal* 27:55-76.

Vogelstein B, Kinzler KW (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine* 10:789-799.

Vormfelde SV, Toliat MR, Schirmer M, Meineke I, Nürnberg P, Brockmöller J (2008) The polymorphisms Asn130Asp and Val174Ala in OATP1B1 and the CYP2C9 allele *3 independently affect toremide pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Journal of Clinical Pharmacology and Therapy* 83:815-817.

Walters HC, Craddock AL, Fusegawa H, Willingham MC, Dawson PA (2000) Expression, transport properties, and chromosomal location of organic anion transporter subtype 3. *American Journal of Physiology* 279:G1188-G1200

Wlcek K, Svoboda M, Thalhammer T, Sellner F, Krupitza G, Jaeger W (2008) Altered expression of organic anion transporter polypeptide (OATP) genes in human breast carcinoma. *Cancer Biology and Therapy* 7:1450-5

10. Curriculum vitae

PERSONENANGABEN

Name, Vorname: Schuster Roswitha

Geburtsdatum: 5. März 1986

Geburtsort: Klosterneuburg

Staatsangehörigkeit: Österreich

AUSBILDUNG

1992 – 1996	Volkschule Weidling
1996 – 2004	Bundesgymnasium/Bundesrealgymnasium BG/BRG Klosterneuburg
Feb. 2003 – Juli 2003	Auslandssemester in Australien
24. Juni 2004	Reifeprüfung mit ausgezeichnetem Erfolg
2004 – 2010	Pharmaziestudium an der Universität Wien
Okt. 2009 – März 2010	Diplomarbeit, Department für Klinische Pharmazie und Diagnostik, Universität Wien, in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathophysiologie, Medizinische Universität Wien, AKH Wien