Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf und Halschirurgie

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. T. Hoffmann

Die Expression von SLCO1B3 in Kopf-Hals-Tumoren und dessen Einfluss auf die Chemosensibilität

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Alexander Engelhardt, geb. in Düsseldorf

2019

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas Hoffmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Oliver Zolk

Tag der Promotion: 13.02.2020

Inhaltsverzeichnis

I Abkürzungsverzeichnis V
1 Einleitung 1
1.1 Organo-Anion-Transporter-Polypeptide 1
1.2 OATP1B3 3
1.3 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches 5
1.4 Taxane 6
1.5 Ziel dieser Arbeit 8
2 Material und Methoden 9
2.1 Material 9
2.1.1 Zellkultur 9
2.1.2 Kryokonservierung eukariotischer Zellen 11
2.1.3 Immunfluoreszenzfärbung 11
2.1.4 Ribonukleinsäure (RNA) Extraktion aus adhärenten Zellen 12
2.1.5 Reverse Transkription 13
2.1.6 Real Time PCR 13
2.1.7 Testung der Chemosensibilität 13
2.2 Methoden 14
2.2.1 Zelllinien und Zellkultur 14
2.2.2 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen 14
2.2.3 Immunfluoreszenzfärbung 15
2.2.4 RNA Extraktion aus adhärenten Zellen 16
2.2.5 Reverse Transkription 16
2.2.6 Real Time PCR 16
2.2.7 Testung der Chemosensibilität 19
2.2.8 Statistik 19
3 Ergebnisse 21
3.1 Immunfluoreszenz 21
3.2 Real Time PCR 28
3.3 Testung der Chemosensibilität 32
4 Diskussion 44
4.1 Immunfluoreszenz 44
4.2 Real Time PCR 47
4.3 Testung der Chemosensibilität 48

4.4 Zusammenhang zwischen der Expression von SLCO1B3 und der Chemoresistenz....50
4.5 HPV....51
5 Zusammenfassung....52
6 Literaturverzeichnis....54

Abkürzungsverzeichnis

Bcl 2 ..... *B cell lymphoma 2*
cDNA ..... *Complementary Desoxyribonukleinsäure*
CT-OATP1B3 ..... *Cancer-Type OATP1B3*
DAPI ..... *4',6-Diamidin-2-phenylindol*
DMEM ..... *Dulbecco´s Modified Eagle Medium*
DMSO ..... *Dimethyl Sulphoxide*
EDTA ..... *Ethylendiamintetraacetat*
EGFR ..... *Epidermal Growth Factor Receptor*
FibroA ..... *Primäre humane Fibroblasten aus Adenomgewebe*
FKS ..... *Fötales Kälberserum*
GAPDH *Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase*
HEK-293 ..... *Human embryonic kidney - 293*
HNO-Tumore ..... *Hals-Nasen-Ohren Tumore*
HPV ..... *Humanes Papillomavirus*
IC50 ..... *Mittlere inhibitorische Konzentration*
ICI ..... *Immun-Checkpoint-Inhibitoren*
LT-OATP1B3 ..... *Leber-Typ OATP1B3*
MDR 1 ..... *Multi-Drug-Resistance 1*
mRNA ..... *Messenger Ribonukleinsäue*
MTT-Assay ..... *3–(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazoliumbromid-Assay*
NOXA ..... *Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*
OATP ..... *Organo-Anion-Transporter-Polypeptide*
OATP1B3 ..... *Organo-Anion-Transporter-Polypeptid Member 1B3*
P21WAF1 ..... *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*
PANC1 ..... *Duktales Pankreaskarzinom 1*
PBS ..... *Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline*
PCR ..... *Polymerase Kettenreaktion*
PUMA ..... *P53 upregulated modulator of apoptosis*
RNA ..... *Ribonukleinsäure*
RT-PCR ..... *Real Time Polymerase Kettenreaktion*
SLCO ..... *Solute Carrier Organic Anion Transporter*

ß-Actin..... *Beta-Aktin*
TNM Klassifikation ..... *Tumor-Nodus-Metastasen Klassifikation*
UD-SSC ..... *Universität Düsseldorf - Squamous cell carcinoma*
UM-SSC..... *Universität Michigan - Squamous cell carcinoma*
UT-SSC..... *Universität Turku - Squamous cell carcinoma*
WT-OATP1B3 ..... *Wild-Typ OATP1B3*

1 Einleitung

1.1 Organo-Anion-Transporter-Polypeptide

Organo-Anion-Transporter-Polypeptide (OATP) gehören zur Familie der „Solute Carrier Organic Anion Transporter“ (SLCO) [16,18], einer Superfamilie von 52 Natrium-unabhängigen Membrantransportern, welche für eine Vielzahl von transmembranären Transporten verantwortlich sind. Sie werden eingeteilt in Familien (> / = 40% Übereinstimmung der Aminosäuresequenz) und Subfamilien (> / = 60% Übereinstimmung der Aminosäuresequenz) [16].

Die 11 beim Menschen vorkommenden OATP´s werden auf Grund ihrer Übereinstimmungen der Aminosäuresequenzen in sechs Familien eingeteilt [18].

Tabelle 1: Einteilung der 11 humanen SLCO Transporter in Familien, Name und deren Vorkommen

SLCO: Solute Carrier Organic Anion Transporter

Familie	Name	Überwiegende Lokalisation
SLCO1	SLCO1A2	Ubiquitär
	SLCO1B1	Leber
	SLCO1B3	Leber
	SLCO1C1	Gehirn, Hoden
SLCO2	SLCO2A1	Ubiquitär
	SLCO2B1	Ubiquitär
SLCO3	SLCO3A1	Hoden, Gehirn, Herz, Lunge, Milz
SLCO4	SLCO4A1	Herz, Plazenta, Lunge, Leber
	SLCO4C1	Niere
SLCO5	SLCO5A1	Brustdrüse, Prostata, fetales Gehirn
SLCO6	SLCO6A1	Hoden, Milz, Gehirn, Plazenta

OATP´s kommen beim Menschen in einer Vielzahl von Geweben vor, unter anderem in Lunge, Herz, Niere, Placenta und Hoden [17]. Daneben kommen sie in hoher Zahl auch in der Leber vor [21,24].

Ihre Aufgabe ist der Transport einer Vielzahl von Stoffen über die Zellmembranen. Zu den transportierten Stoffen gehören unter anderem Hormone, eine Vielzahl von Medikamenten und auch antineoplastische Substanzen [16,17,24].

Allen OATP´s gemeinsam ist, dass sie aus 12 transmembranären Domänen bestehen und einen großen fünften extrazellulären „Loop“ besitzen [17].

Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass es neben dem natürlichen Vorkommen in den unterschiedlichen Geweben, auch in diversen soliden Tumoren zur Expression von OATP´s kommt [5,57].

Dabei hat sich gezeigt, dass eine Überexpression von OATP´s eher mit einem schlechten „outcome“ verbunden ist [5,57]. Die verminderte Expression scheint eher mit einem besseren Überlebensvorteil der betroffenen Personen in Verbindung zu stehen [10,22].

Es wird vermutet, dass dies damit zusammenhängt, dass OATP´s unter anderem auch Chemotherapeutika über die Membran transportieren. Somit stellt dieser Mechanismus einen effektiven Weg dar, sich der Behandlung durch Chemotherapien zu entziehen, letztendlich also einen Selektionsvorteil für Tumorzellen [34].

1.2 OATP1B3

Ein Vertreter der humanen OATP´s ist das Organo-Anion-Transporter-Polypeptid Member 1B3 (OATP1B3). OATP1B3 wird durch das SLCO1B3 Gen codiert und kommt überwiegend in der Leber vor. Dort ist es für die basolaterale Aufnahme verschiedener Stoffe wichtig. So werden unter anderem Statine und Gallensäuren sowie Chemotherapeutika, wie zum Beispiel Docetaxel, über OATP1B3 aufgenommen [24-26]. Auch Paclitaxel, ebenfalls zu den Taxanen gehörend, wird effektiv über OATP1B3 aufgenommen [53].

Wie bereits erwähnt, besteht auch OATP1B3 aus 12 transmembranären Domänen [17]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das N-terminale Ende wichtig für die Anhaftung des Proteins an der Plasmamembran ist [9].

Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass es neben der in der Leber vorkommenden sogenannten Wild-Typ oder Leber-Typ Variante (WT-OATP1B3 oder LT-OATP1B3) auch eine tumorspezifische Variante, genannt Cancer-Type OATP1B3 (CT-OATP1B3) von OATP1B3 gibt [59]. In dieser Arbeit werden der Übersicht halber nur die Bezeichnungen LT-SLCO1B3 und CT-SLCO1B3 verwendet.

CT-OATP1B3 ist fast identisch mit LT-OATP1B3. Sie unterscheiden sich nur durch die ersten 28 Aminosäuren am N-terminalen Ende. Diese ersten 28 Aminosäuren fehlen bei CT-OATP1B3 vollständig.

Dies ist damit zu erklären, dass die im LT-OATP1B3 vorkommenden Exone 1 und 2 zu einem neuen Exon, genannt 2a, verschmelzen (Abbildung 1).

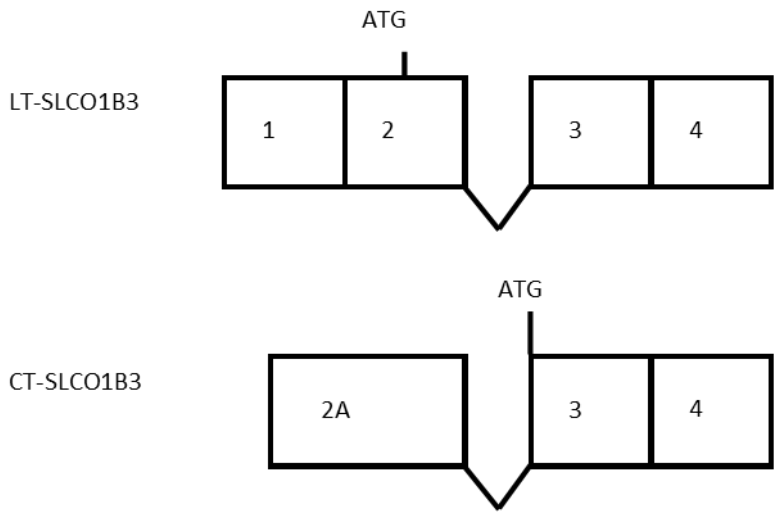

Abbildung 1: Schematische Darstellung der SLCO LT und CT Transkripte. Die ersten vier Exone sind als Boxen dargestellt. Das Startcodon der Translation ist dargestellt. Die restlichen Exone sind nicht dargestellt.

LT-SLCO: Leber-Typ Solute Carrier Organic Anion Transporter, CT-OATP: Cancer-Type Solute Carrier Organic Anion Transporter

CT-OATP1B3 zeigt außerdem eine deutlich geringere Transportaktivität im Vergleich zu LT-OATP1B3 und ist hauptsächlich im Zytoplasma und nicht in der Zellmembran vorzufinden [59].

Unter anderem konnte OATP1B3 bereits in verschiedenen soliden Tumoren nachgewiesen werden. Darunter sind neben dem Kolonkarzinom auch das Lungenkarzinom sowie das Pankreaskarzinom [59].

Auch für Hals-Nasen-Ohren-Tumore (HNO-Tumore) konnte bereits ein Vorkommen von OATP1B3 nachgewiesen werden. Jedoch ist noch unbekannt, ob hier LT-OATP1B3 oder CT-OATP1B3 exprimiert wird [7,8]. Weiterhin ist die Bedeutung der Expression dieses Transporters für das Ansprechen einer Chemotherapie von Kopf-Hals-Tumoren unbekannt.

1.3 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches

Die Einteilung von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich erfolgt anhand ihrer anatomischen Lokalisation. So werden vom Zentrum für Krebsregister des Robert Koch-Institutes für den Kopf-Hals-Bereich verschiedene Entitäten unterschieden. Die Tumore werden eingeteilt in Mundhöhlenkarzinome, inklusive Tumoren der Lippen und Speicheldrüsen, sowie Tumoren der Nase, des Rachens und des Kehlkopfes.

Dabei werden die Tumore des Rachens noch weiter eingeteilt in Naso-, Oro-, und Hypopharynxtumore. Das gleiche gilt auch für die Tumore des Kehlkopfes. Hier erfolgt eine Einteilung in Glottis-, Supra- und Subglottisches Karzinom.

Eine weitere Einteilung der Tumore erfolgt aufgrund ihres histologischen Ursprunges. So handelt es sich bei der überwiegenden Mehrzahl der Tumore um Plattenepithelkarzinome, welche aus entarteten Schleimhautepithelien entstehen. Daneben gibt es auch Tumore des Drüsengewebes (Mukoepidermoid-, Azinuszell-, Adeno-, Adenoid-, zystische Karzinome), des Knochen-, Knorpel-, Muskel- und Fettgewebes (Sarkome) und des Lymphsystems (Lymphome) [64].

Neben den allgemeinen Risikofaktoren, wie dem Rauchen oder dem Alkoholkonsum, [28,43] rücken auch andere Faktoren immer mehr in den Fokus der Wissenschaft.

So wird dem humanen Papillomavirus (HPV) insbesondere bei Tumoren der Mundhöhle eine immer größere Bedeutung zugesprochen. Dies zeigt sich auch in der aktuell achten Ausgabe der Tumor-Nodus-Metastasen Klassifikation (TNM Klassifikation). In dieser wird erstmals der HPV-Status für die Einteilung von Oropharynxkarzinomen hinzugezogen [11,46]. Dort hat HPV unter anderem einen Einfluss auf die Aggressivität des Tumors und die Prognose des Patienten [23,46].

Die Therapie der verschiedenen Kopf-Hals-Tumoren gestaltet sich je nach Tumorart und „Staging“ unterschiedlich. Zu den drei Säulen gehören unter anderem die operative Tumorentfernung, die Chemo- und die Strahlentherapie. Zu den gängigen Chemotherapeutika gehören die platinhaltigen Substanzen Cisplatin und Carboplatin, sowie 5-Fluorouracil und die Taxane Docetaxel und Paclitaxel. Zumeist werden sie in den unterschiedlichen Therapieregimen kombiniert eingesetzt [3,31].

Ein neuer Ansatzpunkt ist darüber hinaus die Immuntherapie. So wird Cetuximap, ein chimärer monklonaler Antikörper gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) bereits klinisch eingesetzt. Weitere Ansatzpunkte sind die Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ICI) wie zum Beispiel Nivolumap [15,49,51].

1.4 Taxane

Taxane wurden ursprünglich in der Rinde der pazifischen Eibe (*Taxus Brevifolia*) identifiziert und daraus isoliert, zuerst durch die Arbeitsgruppe von Wall und Wani in den 1960er Jahren [36].

Später gelang es der Arbeitsgruppe um Dr. Susan Horowitz zu zeigen, dass das isolierte Paclitaxel in der Lage ist, die Polymerisation zytoplasmatischen Tubulins zu steigern. Auch ist Taxol in der Lage, direkt mit Mikrotubuli zu interagieren und schützt diese so vor der Depolymerisation. Dies geschieht auch in Abwesenheit von Cofaktoren wie Guanosintriphosphat. Dadurch ist Taxol in der Lage, Zellen in der G2 / M Phase des Zellzyklus zu blockieren und eine weitere Teilung zu unterbinden [4,20].

Die erste Zulassung zur klinischen Anwendung erfolgte gegen Ovarialzellkarzinome. Heute wird die Wirkstoffgruppe unter anderem auch bei kleinzelligen Lungenkarzinomen, Brustkrebs oder Kaposi-Sarkomen eingesetzt [36].

Mittlerweile besteht die Gruppe der Taxane aus den Wirkstoffen Docetaxel, Paclitaxel und dem neueren Cabazitaxel [62]. Daneben wird zurzeit an weiteren, besser wirksamen, Darreichungsformen geforscht [6].

Darüber hinaus werden Taxane, insbesondere das Paclitaxel, auch zur Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren eingesetzt. Dazu wird es in den verschiedenen Behandlungsregimen sowohl zur Erst-, als auch Zweitlinientherapie eingesetzt. Ebenso kommen Taxane bei der Behandlung von metastasierten Kopf-Hals-Tumoren zum Einsatz [15,32].

Im klinischen Alltag wird meistens eine Dosierung von 175 bis 225 mg/m² Körperoberfläche verwendet. Bis zu einer Dosierung von 225 mg/m² gilt die Anwendung für den Menschen als sicher. Aufgrund der ausgeprägten, nicht linearen Pharmakokinetik, führt eine weitere Dosissteigerung nicht zu einer Steigerung der maximalen Plasmakonzentration. Diese liegt nach Vasantha et al. bei 2 µg/ml [33,54,61]. Andere Autoren beschreiben eine maximale Plasmakonzentration von 4,3 µg/ml [29].

1.5 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es daher zunächst, die Expressionsrate der OATP1B3 Isoformen (LT-OATP1B3 versus CT-OATP1B3) in den uns vorliegenden Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches mittels Immunfluoreszenzfärbung sowie quantitativer Real Time Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) zu bestimmen.

Um die Bedeutung der Expression der entsprechenden Isoformen dieses Transporters für das Ansprechen einer Chemotherapie bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches zu untersuchen, sollte der Einfluss der Expression von OATP1B3 auf die Wirksamkeit der Chemotherapeutika Docetaxel und Paclitaxel, bei den untersuchten Zelllinien analysiert werden. Sollte sich eine Korrelation zwischen der Expression von OATP1B3 und dem Ansprechen auf bestimmte Chemotherapeutika zeigen, könnte dies eine Basis für eine personalisierte Chemotherapie darstellen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkultur

2.1.1.1 Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden Zelllinien verwendet, die von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches etabliert wurden. Von der Universität Michigan wurden freundlicherweise die Zelllinien UM-SSC 11B (Universität Michigan - Squamous cell carcinoma), UM-SSC 17B und UM-SSC 22B zur Verfügung gestellt. Die Universität Düsseldorf stellte freundlicherweise die Zelllinien UD-SSC 1 (Universität Düsselorf – Squamous cell carcinoma), UD-SSC 2, UD-SSC 3, UD-SSC 5, UD-SSC 6 und UD-SSC 8 zur Verfügung. Die Zelllinien UT-SSC 24A (Universität Turku – Squamous cell carcinoma) und UT-SSC 50 wurden freundlicherweise von der Universität Turku bereitgestellt. Außerdem wurden noch weitere Tumor- bzw. Kontrollzelllinien verwendet. Die HEK-293 (Human ebmryonic kidney - 293) Zelllinie stammt von der Universität Erlangen. Das Institut für Pathologie der Universität Ulm stellte die primären humanen Fibroblasten aus Adenomgewebe (FibroA) freundlicherweise zur Verfügung. Die PANC1 (Duktales Pankreaskarzinom 1) Zelllinie lag bereits im Institut vor. Alle verwendeten Zelllinien und deren Charakteristika sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Ein Ethikvotum durch die Ethikkommission der Universität Ulm, zur molekularen Untersuchung dieser Zelllinien, liegt vor: # 219/17.

Tabelle 2: Zelllinien, Tumorart und TNM Status, HPV-16E Transkription

HPV: Humanes Papillomavirus, UD-SSC: Universität Düsseldorf - Squamous cell carcinoma, UM-SSC: Universität Michigan - Squamous cell carcinoma, UT-SSC: Universität Turku - Squamous cell carcinoma, HEK-293: Human embryonic kidney, PANC1: Duktales Pankreaskarzinom 1, FibroA: Primäre humane Fibroblasten aus Adenomgewebe, TNM: Tumor-Nodus-Metastasen Klassifikation

Zelllinie	Tumorart und TNM Status	HPV-16 E Transkript
UD-SSC 1	Oropharynx, T3N2b	-
UD-SSC 2	Hypopharynx, T3N3	+
UD-SSC 3	Larynx	-
UD-SSC 5	Larynx, T1N1	-
UD-SSC 6	Oropharynx, T3N0	-
UD-SSC 8	Larynx	-
UM-SSC 11B	Larynx, T2N2aM0	-
UM-SSC 17B	Metastase von UM-SSC 17A	-
UM-SSC 22B	Hypopharynx, T2N1M0	-
UT-SSC 24A	Mundhöhle, T2N0M0	-
UT-SSC 50	Larynx, T2N0	-
Fibroblasten (FibroA)	Primäre humane Fibroblasten	-
HEK-293	Humane embryonale Niere	-
PANC1	Humanes Pankreaskarzinom	-

2.1.1.2 Zellkulturmedium

Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM; + 4,5 g/l D-Glucose, +L-Glutamine, -Pyruvat; Life Technologies; Carlsbad, CA, USA) sublimentiert mit 10% hitzeinaktivierten fötalem Kälberserum (FKS; Bio Sell; Feucht; Deutschland) sowie 1% Penicillin / Streptomycin (Penicillin / Streptomycin; 10.000 U/ml / 10.000 µg/ml; Biochrome; Berlin; Deutschland)

2.1.1.3 Brutschrank

Hera Cell 150; Thermo Fischer Scientific; Walthan; MA; USA

2.1.1.4 Trypsin / Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Solution

Trypsin / EDTA Solution 0,05% / 0,02% in Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline (PBS; Gibco; Live Technologies; Carlsbad; CA; USA), Biochrome; Berlin; Deutschland

2.1.1.5 Trypanblau

0,04% Trypanblau: 0,4% Trypanblau (Biochrom; Berlin; Deutschland) 1 : 10 verdünnt mit 1 x PBS

2.1.1.6 Neubauer Zählkammer

Paul Marienfeld GmbH & Co. KG; Lauda Königsfeld; Deutschland

2.1.1.7 Zellkulturflaschen

80 cm² Nunclon Surface; Thermo Scientific; Waltham; MA; USA

2.1.2 Kryokonservierung eukariotischer Zellen

2.1.2.1 Dimethyl Sulphoxide

Dimethyl Sulphoxide (DMSO); Sigma-Aldrich; St. Louis; MO; USA

2.1.2.2 Kryomedium

Zellkulturmedium (siehe 2.1.1.2) + 20% FKS (siehe 2.1.1.2) + 10% DMSO (siehe 2.1.2.1)

2.1.3 Immunfluoreszenzfärbung

2.1.3.1 Gekammerte Objektträger

Chamber Slides mit vier Kammern; BD Bioscience; Franklin Lakes; NJ; USA

2.1.3.2 Fibronectin

Fibronectin from human plasma; Sigma Adrich; St. Louis; MO; USA

2.1.3.3 Image iT-Fix-Perm kit

Life Technologies; Carlsbad; CA; USA

2.1.3.4 Goat Serum

Goat Serum; Dako; Glostrup; Dänemark

2.1.3.5 Primärantikörper

HPA 004943; Anti SLCO1B3 polyclonal produced in rabbit; Sigma Aldrich; St. Louis; MO; USA

2.1.3.6 Protein Block, Serum Free; Dako; Glostrup; Dänemark

2.1.3.7 Sekundärantikörper

Alexa Fluor 488 goat anti rabbit IgG (H+L); life technologies; Carlsbad; CA; USA

2.1.3.8 4′,6-Diamidin-2-phenylindo (DAPI)

Prolong Gold antifade reagent with DAPI; life technologies; Carlsbad; CA; USA

2.1.3.9 Isotypenkontrolle

Negativ control rabbit immunoglobulin fraction (Solid-phase absorbed); Dako; Glostrup; Dänemark

2.1.3.10 Fluoreszenzmikroskop

Biorevo BZ-9000; Keyence; Osaka; Japan

2.1.3.11 Software Flureszenzmikroskop

BZ II Viewer Version 2.1; Keyence; Osaka; Japan

2.1.4 Ribonukleinsäure (RNA) Extraktion aus adhärenten Zellen

2.1.4.1 QIAshredder; Qiagen; Venlo; NL

2.1.4.2 2-Mercaptoethanol; Sigma Aldrich; St. Louis; USA

2.1.4.3 RNeasy Mini Kit; Qiagen; Venlo; NL

2.1.5 Reverse Transkription

2.1.5.1 QuantiTec Reverse Transcription Kit; Qiagen; Venlo; NL

2.1.6 Real Time PCR

2.1.6.1 Applied Biosystem 7300 Real Time PCR System; Applied Biosystems, Waltham; MA; USA

2.1.6.2 Primer SLCO1B3; Human; Hs00251986_m1; Applied Biosystems; Waltham; MA; USA

2.1.6.3 Primer Beta Actin; Human; Hs00357333_g1; Applied Biosystems; Waltham; MA; USA

2.1.6.4 Primer Gap-DH; Human; Hs02758991_g1; Applied Biosystems; Waltham; MA; USA

2.1.6.5 Micro Amp Optical 96 Well Reaction plate; Applied Biosystems; Waltham; MA; USA

2.1.6.6 QuantiFast Probe PCR Kit; Qiagen; Venlo; NL

2.1.7 Testung der Chemosensibilität

2.1.7.1 CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay; Promega; Fitchburg; WI; USA

2.1.7.2 Tissue Culture Plate 96 Well, Flat Bottom; DB Falcon; Corning; NY; USA

2.1.7.3 Docetaxel; Taxotere 20 mg/ml; Sanofi; Paris; Frankreich

2.1.7.4 Paclitaxel; Taxol; 6 mg/ml; Bristol-Meyers Squibb; New York; USA

2.1.7.5 Tecan infinite M200 PRO; Tecan; Männedorf; Schweiz

2.2 Methoden

2.2.1 Zelllinien und Zellkultur

Alle untersuchten Zelllinien wurden in Kulturmedium (siehe 2.1.1.2) bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% CO_2 im Brutschrank (siehe 2.1.1.3) kultiviert. Sobald die Zellen die Kulturoberfläche zu ca. 80% bis 90% besiedelten wurden sie trypsiniert (siehe 2.1.1.4) und entweder erneut mit einer Zelldichte von 10.000 Zellen / cm² in die Zellkulturflaschen (siehe 2.1.1.7) ausgesät, oder für die Versuche verwendet. Die Zellzahl wurde mit der Neubauer Zählkammer (siehe 2.1.1.6) bestimmt.

2.2.2 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Die Kryokonservierung erfolgte mittels DMSO (siehe 2.1.2.1), welches in die Zelle diffundiert und eine Kristallbildung und damit Zellzerstörung verhindert. Dazu wurden die sedimentierten Zellen mit einer Anzahl von maximal 100 x 10^6 je Tube mit Kryomedium (siehe 2.1.2.2) versehen. Pro Tube wurde 1 ml des Mediums hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen 24 Stunden bei -80 °C in einer speziellen, mit Alkohol gefüllten Einfrierkammer aufbewahrt, bevor sie in den Stickstofftank überführt wurden. Zum Auftauen wurden die Zellen im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen dann direkt in 10 ml Kulturmedium (siehe 2.1.1.2) überführt. Nach Zentrifugation erfolgte ein Mediumwechsel, um Reste des Kryomediums zu entfernen. Danach wurde die Zellzahl mithilfe der Neubauer Zählkammer (siehe 2.1.1.6) erneut bestimmt. Es erfolgte die Aussaat mit 1 x 10^4 Zellen pro cm².

2.2.3 Immunfluoreszenzfärbung

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen im ersten Schritt trypsiniert (siehe 2.1.1.4). Anschließend erfolgte die Zellzählung mit Hilfe der Neubauer Zählkammer (siehe 2.1.1.6). Dann wurden die Zellen mit einer Anzahl von 2,5 x 10^4 und jeweils 1 ml Zellkulturmedium (siehe 2.1.1.2) in die gekammerten Objektträger (siehe 2.1.3.1) ausgesät. Je Objektträger standen vier Kammern zur Verfügung. Vor der Zellaussaat wurde die Kulturfläche einer jeden Kammer mit Fibronektin (siehe 2.1.3.2) vorbehandelt. Dazu wurde Fibronektin in PBS auf eine Konzentration von 12 µg/ml verdünnt. Dann wurden in jede Kammer 110 µl der Lösung gegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 37 °C, in wasserdampfgesättigter Atmosphäre, mit 5% CO_2 für eine Stunde. Nach der Inkubation wurde die Fibronektinlösung abgesaugt und die Objektträger direkt mit den Zellen besiedelt. Nun wurden die besiedelten Objektträger bei 37 °C, in wasserdampfgesättigter Atmosphäre, bei 5% CO_2 im Brutschrank (siehe 2.1.1.3) kultiviert. Sobald die Zellen ca. 80% der Kulturfläche bedeckten, folgte die eigentliche Färbung. Dazu wurde die Kultur beendet und das Kulturmedium entfernt. Danach erfolgte die Fixation der Zellen mit Hilfe des Image iT Fix-Perm kit (siehe 2.1.1.3) nach beiliegender Gebrauchsanweisung. Nach der Fixation wurden die Zellen mit 20%igem Ziegenserum (siehe 2.1.3.4) für eine Stunde bei Raumtemperatur behandelt, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu vermeiden. Anschließend wurden die Zellen vier Mal, für je zehn Minuten, in PBS gewaschen. Danach erfolgte das Aufbringen des primären Antikörpers (siehe 2.1.3.5) in einer Konzentration von 2 µg/ml, in einem Volumen von 110 µl pro Kammer. Zur Verdünnung aller Antikörper wurde ein serumfreier Proteinblocker (siehe 2.1.3.6) verwendet. Anschließend erfolgte die Inkubation für 24 Stunden bei 4 °C. Daran angeschlossen wurden die Objektträger erneut vier Mal, jeweils zehn Minuten, in PBS gewaschen. Danach erfolgte das Auftragen des sekundären Antikörpers (siehe 2.1.3.7), wobei dieser 1 : 5000 verdünnt wurde, in einem Volumen von 110 µl. Dieser wurde bei Raumtemperatur für 90 Minuten inkubiert. Nach erneutem viermaligem Waschen in PBS wurden die Kammeraufsätze der Objektträger mit Hilfe des mitgelieferten Werkzeuges entfernt. Anschließend folgte die Kernfärbung mittels DAPI (siehe 2.1.3.8) und die Eindeckung der Objektträger. Als negative Kontrollen wurden je Zelllinie drei Kammern mitgeführt. In der ersten Kammer, zur Überprüfung der

Autofluoreszenz, wurden beide Antikörper durch PBS ersetzt. In der nächsten Kammer, zur Überprüfung der Spezifität des sekundären Antikörpers, wurde der primäre Antikörper durch PBS ersetzt. Die dritte Kontrollkammer enthielt die Isotypenkontrolle. Dabei wurde der primäre Antikörper durch eine Isotypenkontrolle (siehe 2.1.3.9) ersetzt. Diese wurde ebenfalls mit einer Verdünnung von 2 µg/ml aufgetragen. Die anschließende Auswertung wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop (siehe 2.1.3.10) durchgeführt.

2.2.4 RNA Extraktion aus adhärenten Zellen

Zur Extraktion der RNA wurden die Zellen mithilfe des QIAshredder (siehe 2.1.4.1) unter Verwendung von 2-Mercaptoethanol (siehe 2.1.4.2) lysiert. Die RNA Aufbereitung wurde mittels RNeasy Mini Kit (siehe 2.1.4.3), nach Angaben des Herstellerprotokolls, durchgeführt. Anschließend wurde die gewonnene RNA bei -80 °C gelagert. Für jede Zellreihe wurden vier RNA-Lysate zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnen.

2.2.5 Reverse Transkription

Zur reversen Transkription wurden alle RNA Proben auf 200 ng/µl eingestellt. Anschließend wurde die reverse Transkription, nach Herstellervorgaben, mit dem QuantiTec Reverse Transcription Kit (siehe 2.1.5.1) durchgeführt. Die gewonnene cDNA wurde anschließend bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.6 Real Time PCR

Die RT-PCR wurde mit dem Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System (siehe 2.1.6.1), unter Verwendung der entsprechenden 96 Well Platten (siehe 2.1.6.5), durchgeführt. Die vorgefertigten Primer Assays wurden über Life Technologies bezogen (siehe 2.1.6.2 bis 2.1.6.4). Als „Housekeeping“ Gene kamen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Beta-Aktin (ß-Actin)

zum Einsatz. Als Zielgen wurde SLCO1B3 sowohl in seiner Leber-Typ Form, als auch in seiner Tumorvariante eingesetzt. Die Primer zur Detektion der Leber-Typ Form wurden dabei ebenfalls über Life Technologies bezogen. Dieses Primer-Paar kann nicht zwischen den beiden Varianten unterscheiden, da es intronübergreifend an die Exone 10 und 11 bindet. Diese sind in beiden SLCO1B3 Varianten gleich. Die Primer zur Amplifikation der Tumorvariante wurden in Anlehnung an die Arbeit von Thakkar et al. designt. Diese binden in 5´- 3´ Richtung intronübergreifend an die Exone 2a und 3. Somit sind sie spezifisch für CT-SLCO1B3, da Exon 2a, wie bereits gezeigt, nicht in LT-SLCO1B3 vorkommt. Die PCR wurde mit dem QuantiFast Probe PCR Kit (siehe 2.1.6.6) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden je PCR Ansatz 5 µL TaqMan Genotyping Master Mix, 1 µL Q-solution, 0.5 µL TaqMan geotyping assay Mix und 2,5 µL DNase RNase freies Wasser in ein Well pipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 µL der zuvor gewonnenen cDNA. Nach dem kompletten Bestücken der 96 Well Platte erfolgte die 30-sekündige Zentrifugation bei 6500 Umdrehungen pro Minute. Die Einstellungen der danach durchgeführten PCR waren die Folgenden: Zuerst erfolgte die Hitzeaktivierung über 3 Minuten bei 95 °C, dann folgten 40 Zyklen aus Denaturierung für 3 Sekunden bei 95 °C, sowie die anschließende Abkühlung und Anlagerung für 30 Sekunden bei 60 °C. Jeder Versuch wurde mit einem Triplet je Zelllinie, sowie einer Negativkontrolle und einer Standardverdünnung durchgeführt (siehe Abbildung 2). Alle Versuche wurden drei Mal wiederholt. Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta$cT-Methode [30,44].

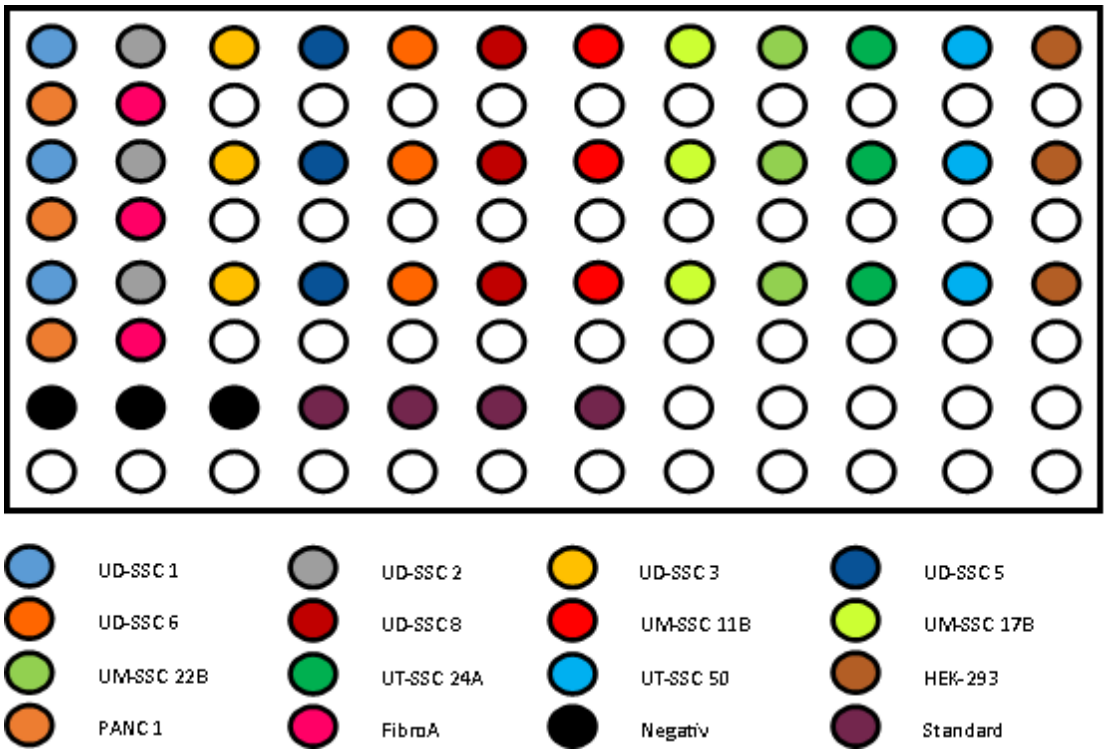

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Anordnung der Proben in der 96 Well Platte. Jede Probe wurde als Triplet geführt. Je 96 Well Platte wurde zudem eine Negativkontrolle und eine Standardverdünnungsreihe mitgeführt.

UD-SSC: Universität Düsseldorf - Squamous cell carcinoma, UM-SSC: Universität Michigan - Squamous cell carcinoma, UT-SSC: Universität Turku - Squamous cell carcinoma, HEK-293: Human embryonic kidney - 293, PANC1: Duktales Pankreaskarzinom 1, FibroA: Primäre humane Fibroblasten aus Adenomgewebe

2.2.7 Testung der Chemosensibilität

Zur Testung der Chemosensibilität der verwendeten Zelllinien wurde der CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (siehe 2.1.7.1) verwendet. In einem ersten Schritt wurden die Zellen mit je 2000 Zellen / Well in eine 96 Well Platte (siehe 2.1.7.2) unter Zugabe von 100 µl Kulturmedium ausgesät. Nach 24 Stunden, um die Adhäsion der Zellen zu gewährleisten, wurde das Kulturmedium gewechselt. Diesem war eine logarithmisch aufsteigende Konzentration (0,01 µg/ml bis 100 µg/ml) von jeweils einem der zu testenden Chemotherapeutika zugesetzt. Docetaxel und Paclitaxel wurden dabei über die hauseigene Apotheke (siehe 2.1.7.3 und 2.1.7.4), gelöst in Ethanol, bezogen. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation wurde der AQueous One Solution Cell Proliferation Assay nach Angaben des Herstellers verwendet. Zwei Stunden nach Einbringen des Testreagenz wurde die Absorption mithilfe des Tecan Readers (siehe 2.1.7.5) ermittelt. Als Positivkontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt. Für die Negativkontrolle wurden die Zellen statt mit dem Chemotherapeutikum mit 10% DMSO, gelöst in Kulturmedium, versetzt. Um zu zeigen, dass die Trägersubstanz Ethanol keinen Einfluss auf den Test hat, wurde noch eine dritte Kontrolle mitgeführt. Dazu wurden die Zellen der entsprechenden Menge an Ethanol ausgesetzt, wie sie bei den Verdünnungsstufen von 10 µg/ml bis 100 µ/ml auftreten.

2.2.8 Statistik

Die Datenerfassung sowie auch deren Verarbeitung erfolgten mittels Excel 2013. Die erhaltenen Werte wurden als absolute Maßzahlen bzw. als Mittelwerte angegeben. Außerdem wurde die Standardabweichung vom Mittelwert (MW ± SD) ermittelt und angegeben. Für die RT-PCR wurde die Applied Biosystem 7300 Real Time PCR System Software SDS Version 1.4.1 verwendet. Anschließend wurden die so gewonnenen Daten ebenfalls in Excel 2013 überführt und ausgewertet.

Die Immunfluoreszenzaufnahmen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop und der zugehörigen Software angefertigt (siehe 2.1.3.10 und 2.1.3.11).

Die IC50 Werte wurden mittels GraphPad Prism ermittelt. Die IC50 beschreibt diejenige Konzentration eines Stoffes, bei der eine 50%ige Inhibition, in unserem Fall der des Zellwachstumes, erreicht wird. Dazu wurden die im CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay ermittelten Vitalitätswerte der einzelnen Zelllinien gegenüber der logarithmischen Konzentration der Chemotherapeutika in GraphPadPrism überführt. Anschließend erfolgte, über die Berechnung der linearen Regression, die Ermittlung des IC50 für jede einzelne getestete Zelllinie.

Die Korrelationsanalysen wurden, da kein linearer Zusammenhang vorlag, mit Hilfe des nicht parametrischen Testverfahrens nach Spearman, unter Zuhilfenahme von Excel 2013, durchgeführt. Zur Berechnung der Korrelation r nach Spearman wurde die folgende Formel verwendet:

$$r = \frac{6 * \sum_{i=1}^{n} d_i^2}{n(n^2 - 1)}$$

$r = Spearman\ Korrelationskoeffizient;\ n = Anzahl\ der\ Zelllinien;\ d = Rangplatz$

Anschließend wurde die Signifikanz anhand der Formel

$$t_{(r)} = \frac{r}{\sqrt{(1 - r^2)/(n - 2)}}$$

$t_{(r)} = Testprüfgröße\ des\ T - Test\ in\ Abhängigkeit\ von\ r$

errechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Immunfluoreszenz

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Expression des Transporters OATP1B3 und der Chemosensitivität von Karzinomzellen zu untersuchen, wurden zunächst 11 unterschiedliche Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches bezüglich der Expression von OATP1B3 auf Proteinebene hin untersucht. Diese Analysen wurden mittels Immunfluoreszenz durchgeführt. Anhand von Negativkontrollen konnte für jede Zelllinie ein einwandfreies Funktionieren des Färbeprotokolls nachgewiesen werden. Exemplarisch für alle Zelllinien wird dies anhand der Zelllinie UD-SSC 2 dargestellt (Abbildung 3).

Als Positivkontrolle wurden Pankreaskarzinomzellen verwendet. Von diesen ist bekannt, dass sie SLCO1B3 exprimieren [19].

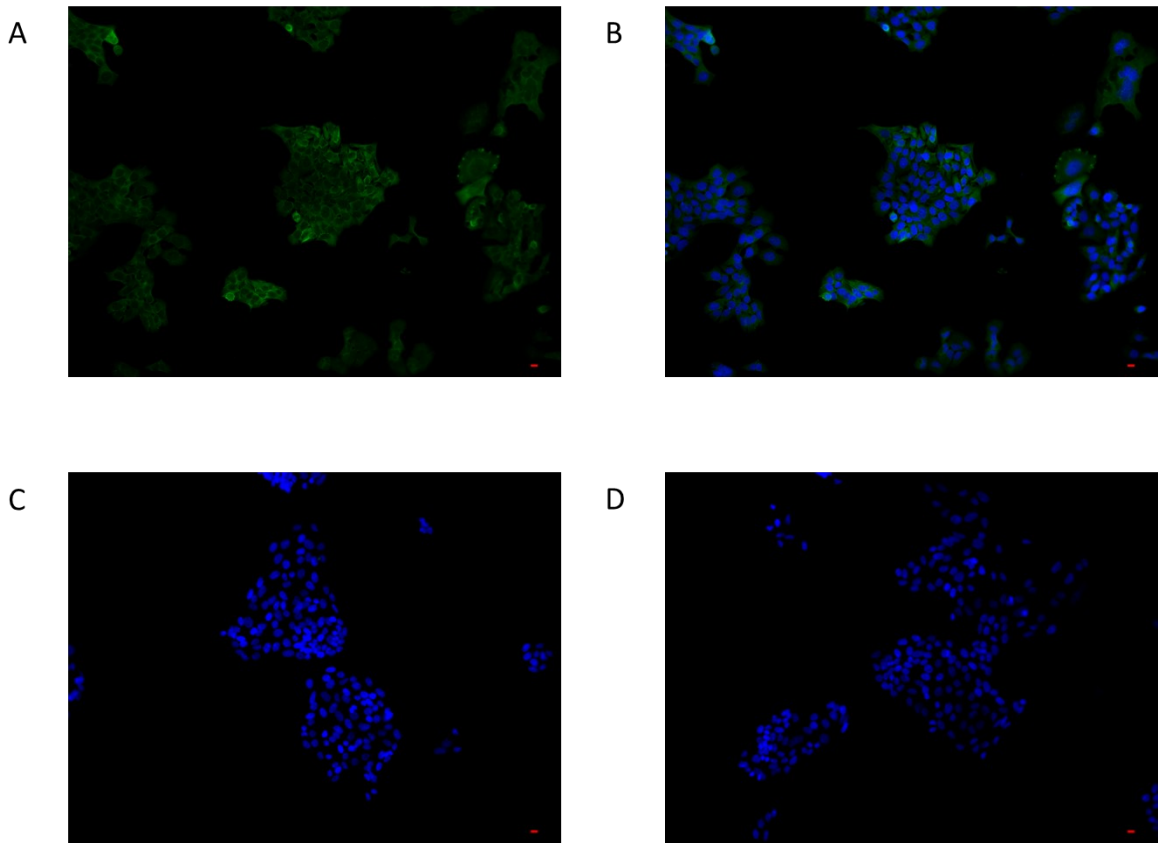

Abbildung 3: Ergebnisse der Imunfluoreszenz, beispielhaft anhand der Zelllinie UD-SSC 2. A: Immunfluoreszenzaufnahme, das Target des Primärantikörpers ist OATP1B3; B: Overlay-Bild aus A und einer Aufnahme der Kernfärbung (hier nicht gezeigt); C: Negativkontrolle, eine Autofluoreszenz konnte nicht nachgewiesen werden; D: Isotypenkontrolle, eine unspezifische Bindung des Antikörpers konnte nicht nachgewiesen werden.

UD-SSC: Universität Düsseldorf - Squamous cell carcinoma, OATP1B3: Organo-Anion-Transporter Member 1B3

Das Fluoreszenzsignal ist am ehesten als feingranuläres intrazytoplasmatisches Muster anzusehen. Ein intranukleäres Vorkommen von SLCO1B3 lässt sich nicht erkennen. Ebenso lässt sich eine überwiegend membrangebundene Fluoreszenz, wie sie bei einem Membrantransporter zu erwarten wäre, nicht erkennen.

Anhand der mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommenen Bilder lässt sich eine unterschiedliche Intensität der Fluoreszenz erkennen. Es erfolgte eine visuelle Einteilung der Zelllinien nach der Intensität der Färbung, von negativ bis dreifach positiv (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Visuelle Bewertung der Fluoreszenz der untersuchten Zelllinien

UD-SSC: Universität Düsseldorf - Squamous cell carcinoma, UM-SSC: Universität Michigan - Squamous cell carcinoma, UT-SSC: Universität Turku - Squamous cell carcinoma, HEK-293: Human embryonic kidney - 293, PANC1: Duktales Pankreaskarzinom 1, FibroA: Primäre humane Fibroblasten aus Adenomgewebe, TNM: Tumor-Nodus-Metastasen Klassifikation

Zelllinie	Tumorart und TNM Status	Intensität der Fluoreszenz
UD-SSC 1	Oropharynx, T3N2b	+
UD-SSC 2	Hypopharynx, T3N3	+++
UD-SSC 3	Larynx	+
UD-SSC 5	Larynx, T1N1	++
UD-SSC 6	Oropharynx, T3N0	+++
UD-SSC 8	Larynx	+++
UM-SSC 11B	Larynx, T2N2aM0	+++
UM-SSC 17B	Metastase	++
UM-SSC 22B	Hypopharynx, T2N1M0	+++
UT-SSC 24A	Mundhöhle, T2N0M0	++
UT-SSC 50	Larynx, T2N0	+++
Fibroblasten (FibroA)	Primäre humane Fibroblasten	-
HEK-293	Humane embryonale Niere	-
PANC1	Humanes Pankreaskarzinom	+

Die Zelllinien HEK-293 und FibroA zeigen keinerlei Expression von SLCO1B3, wie es auch zu erwarten war (siehe Abbildung 4).

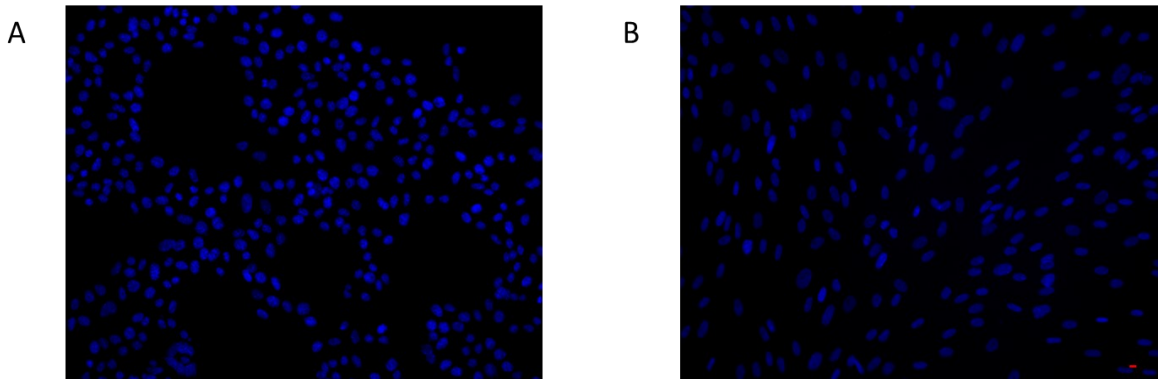

Abbildung 4: Immunfluoreszenzaufnahmen A: HEK-293, kein Fluoreszenzsignal zu erkennen; B: FibroA, kein Fluoreszenzsignal zu erkennen.

HEK-293: Human embryonic kidney - 293, FibroA: Primäre humane Fibroblasten aus Adenomgewebe

Dagegen zeigen die Linien PANC1 und UD-SSC 3 eine geringe Intensität in der Färbung (siehe Abbildung 5).

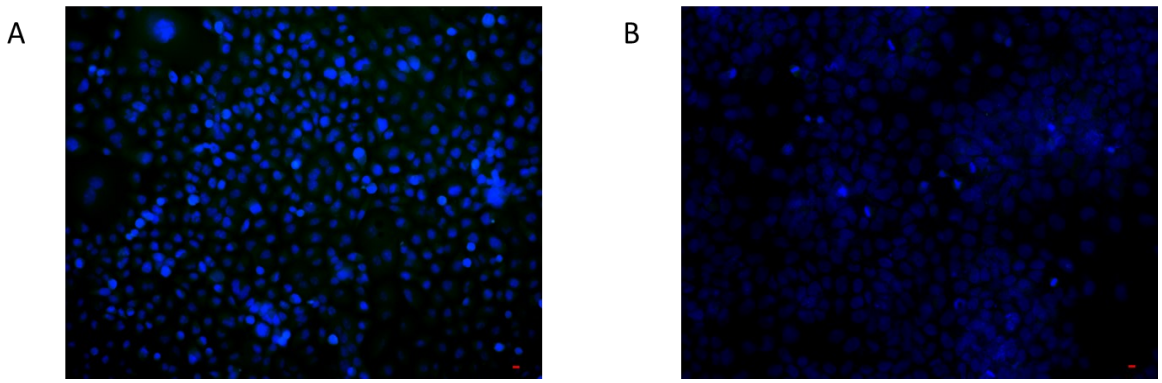

Abbildung 5: Immunfluoreszenzaufnahme A: PANC1, geringe Intensität des Fluoreszenzsignales; B: UD-SSC 3, geringe Intensität des Fluoreszenzsignales.

PANC1: Duktales Pankreaskarzinom 1, UD-SSC: Universität Düsseldorf - Squamous cell carcinoma

Ein mittelstarkes Fluoreszenzsignal zeigen die Zelllinien UD-SSC 1, UD-SSC 5, UM-SSC 17B und die Linie UT-SSC 24A (Abbildung 6).

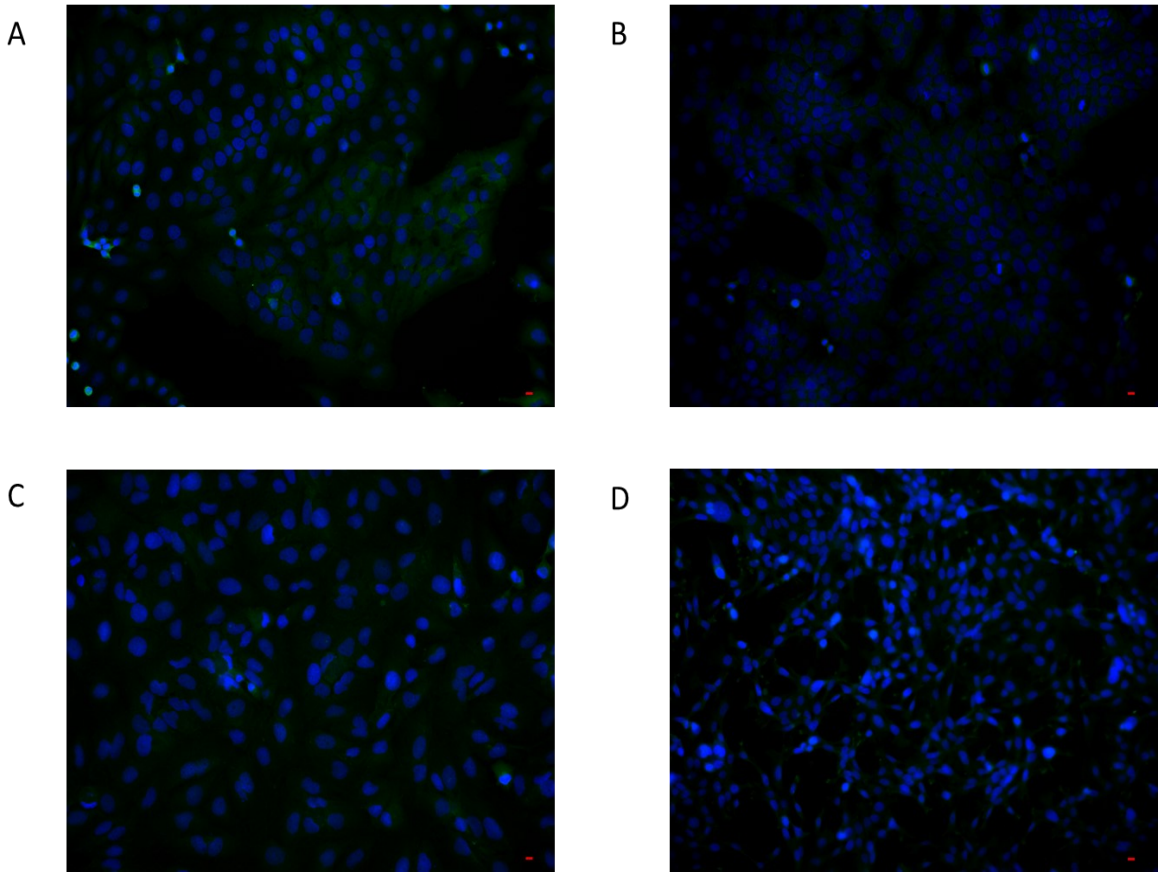

Abbildung 6: Zelllinien mit mittelstarkem Fluoreszenzsignal; A: UD-SSC 1; B: UD-SSC 5; C: UM-SSC 17B; D: UT-SSC 24A

UD-SSC: Universität Düsseldorf - Squamous cell carcinoma, UM-SSC: Universität Michigan - Squamous cell carcinoma, UT-SSC: Universität Turku - Squamous cell carcinoma

Alle weiteren Zelllinien zeigen ein starkes Fluoreszenzsignal, wobei den Zelllinien UM-SSC 11B, UM-SSC 22B und UT-SSC 50 auch ein sehr starkes Fluoreszenzsignal zugeteilt werden könnte (Abbildung 7).

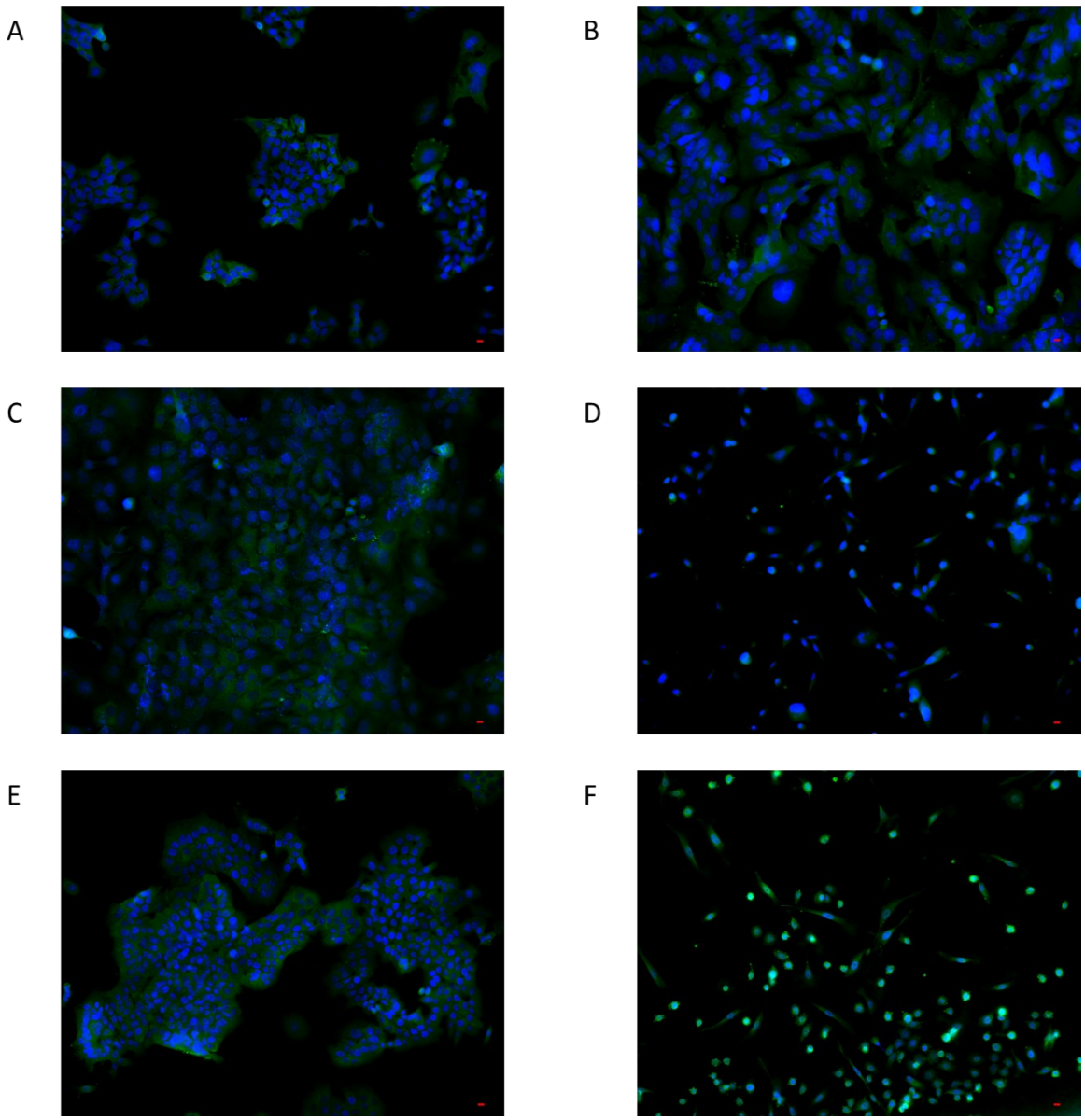

Abbildung 7: Zelllinien mit starkem Fluoreszenzsignal A: UD-SSC 2; B: UD-SSC 6; C: UD-SSC 8; D: UM-SSC 11B; E: UM-SSC 22B; F: UT-SSC 50

UD-SSC: Universität Düsseldorf - Squamous cell carcinoma, UM-SSC: Universität Michigan - Squamous cell carcinoma, UT-SSC: Universität Turku - Squamous cell carcinoma

Ein Zusammenhang zwischen der Tumorlokalisation und der Stärke des Fluoreszenzsignales konnte nicht erbracht werden. So zeigen zum Beispiel die Zelllinien UD-SSC 3, UD-SSC 5 und UD-SSC 8, welches alles Larynxkarzinome darstellen, eine Intensität der Fluoreszenz von einfach (UD-SSC 3) bis dreifach (UD-SSC 8) positiv. Da von anderen Tumorlokalitäten, wie zum Beispiel den Hypopharynxkarzinomen oder den Oropharynxkarzinomen, nur maximal zwei

unterschiedliche Zelllinien zur Verfügung standen, kann ebenfalls kein Zusammenhang hergestellt werden.

Mithilfe der Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Tumorzelllinien aus dem Kopf-Hals-Bereich SLCO1B3, zumindest in einem geringen Maße, exprimieren.

3.2 Real Time PCR

Nachdem mithilfe der Immunfluoreszenz nachgewiesen werden konnte, dass die verwendeten Zelllinien SLCO1B3 auf Proteinebene exprimieren, sollte untersucht werden, ob dies mit der Expression von SLCO1B3 auf RNA-Niveau korreliert.

Dazu wurde mit den vorliegenden Zelllinien eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Als Bezugsgröße für die Berechnung der relativen Expression von SLCO1B3, nach der ΔΔcT-Methode, in den untersuchten Zelllinien, diente das Expressionsniveau von SLCO1B3 in den PANC1 Zellen. Als „Housekeeping"-Gene wurden GAPDH und ß-Actin verwendet.

Für SLCO1B3 kamen zwei unterschiedliche Primer-Paare zum Einsatz. Primer-Paar 1 detektiert sowohl die unveränderte Form LT-SLCO1B3, als auch die tumorspezifische Variante CT-SLCO1B3. Primer-Paar 2 dagegen ist spezifisch für die Tumorvariante.

Da die beiden „Housekeeping"-Gene vergleichbare Ergebnisse lieferten, werden hier nur die Ergebnisse von GAPDH graphisch dargestellt und angegeben. Abbildung 8 zeigt exemplarisch den typischen Verlauf der Fluoreszenzkurven aller Zelllinien im Verlauf einer RT-PCR über 40 Zyklen.

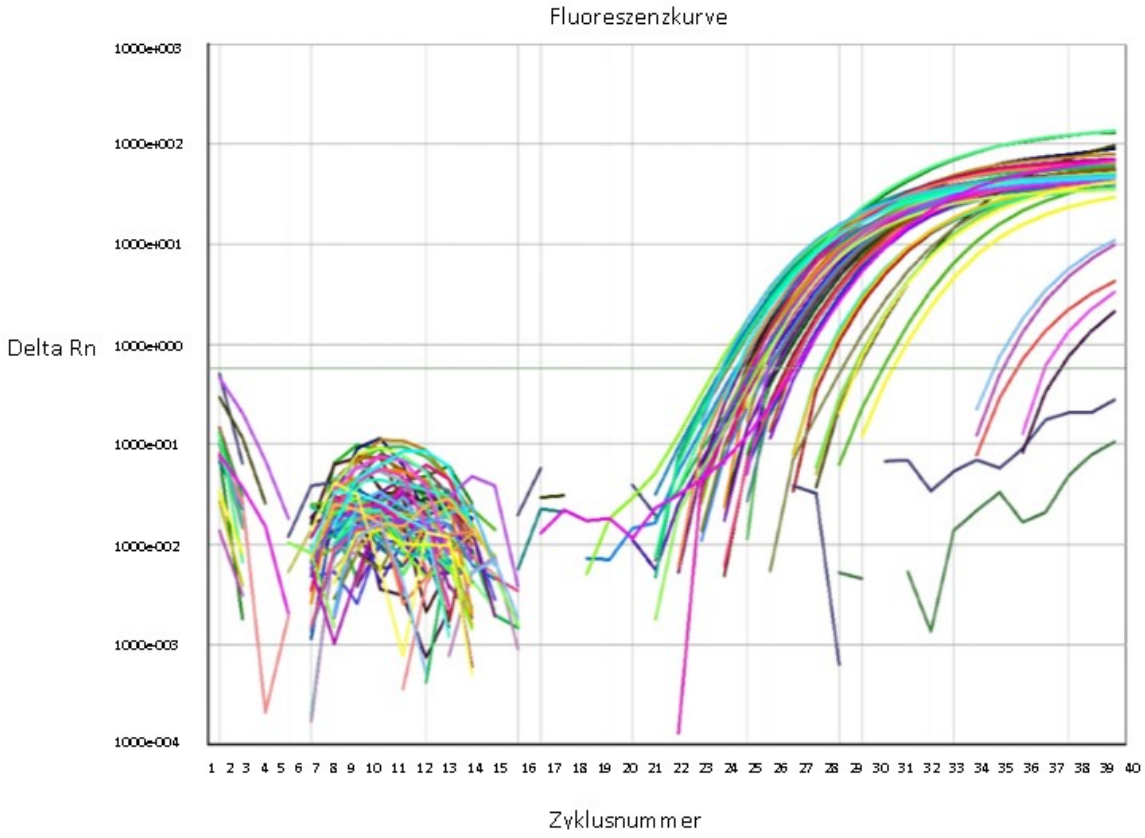

Abbildung 8: Exemplarische Darstellung der Fluoreszenzkurven aller verwendeten Zelllinien über 40 Zyklen RT-PCR

Delta Rn = gemessene Fluoreszenz / passive Referenz, RT-PCR: Real Time Polymerase Kettenreaktion

Für jedes Primer-Paar wurde zunächst die Effizienz anhand der Steigung der Standardkurve ermittelt. Die ermittelte Effizienz wurde dann in der Auswertung entsprechend berücksichtigt. Alle Messungen wurden als Triplets durchgeführt, unabhängig voneinander drei Mal wiederholt und in den dargestellten Ergebnissen zusammengefasst.

Die erste Untersuchung wurde mit dem unspezifischen Primer-Paar 1 durchgeführt, das nicht zwischen den beiden, in dieser Arbeit untersuchten Varianten von SLCO1B3, unterscheiden kann. Anschließend erfolgte der gleiche Versuch mit dem Primer-Paar 2. Dieses ist darauf ausgelegt, die tumorspezifische Variante CT-SLCO1B3 zu erkennen. Abbildung 9 zeigt schematisch den Unterschied zwischen den beiden Primer-Paaren.

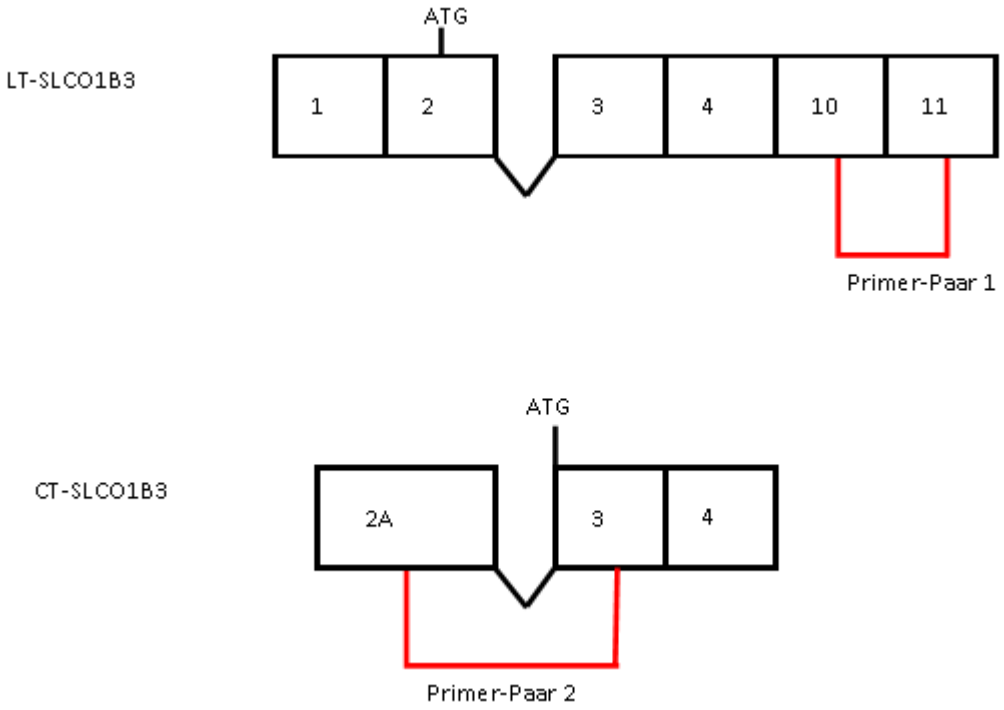

Abbildung 9: Schematische Darstellung der SLCO1B3 LT und CT Transkripte. Die ersten vier Exone sind als Boxen dargestellt. Bei CT-SLCO1B3 ist das Exon 1 mit dem Exon 2 zu dem Exon 2a verschmolzen. Das Startcodon der Translation ist dargestellt (ATG). Bei LT-SLCO1B3 sind zusätzlich noch die Exone 10 und 11 dargestellt. Die restlichen Exone sind nicht dargestellt. Die roten Klammern veranschaulichen die Amplifikate, die durch die Verwendung der verschiedenen Primer-Paare generiert werden.

CT-SCLO1B3: Cancer-Type Solute Carrier Organic Anion Transporter Member 1B3, LT-SLCO1B3: Leber-Typ Solute Carrier Organic Anion Transporter Member 1B3

Errechnet wurde anschließend die Expression von CT-SLCO1B3 relativ zu LT-SLCO1B3. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 10. PANC1 diente als Bezugsgröße, da bereits bekannt ist, dass Pankreaskarzinome ebenfalls SLCO1B3 exprimieren. Als negative Kontrollzelllinien wurden die Zelllinien HEK-293 und FibroA verwendet. Beide zeigten bei der Immunfluoreszenzfärbung kein Vorhandensein von SLCO1B3.

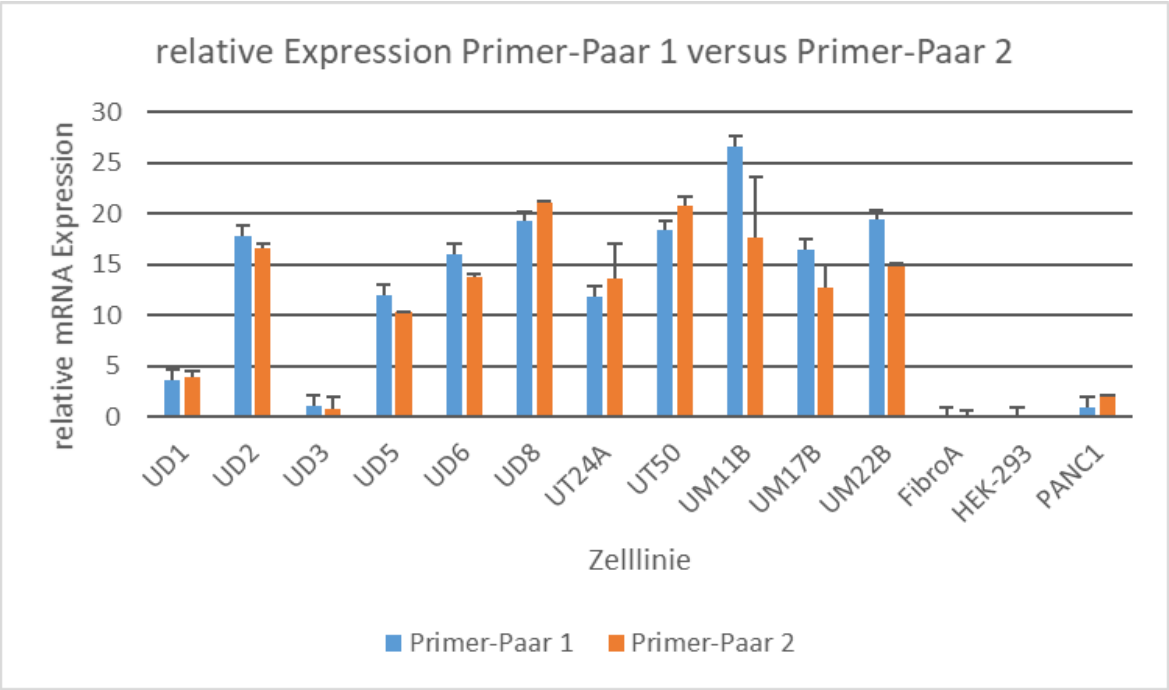

Abbildung 10: Relative SLCO1B3 Expression von Primer-Paar 1 versus Primer-Paar 2 in den untersuchten Zelllinien. Ausgewertet nach der ΔΔcT-Methode. Normalisiert relativ zur GAPDH Expression und bezogen auf PANC1 (=1). Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung von Mittelwerten dreier unabhängiger Experimente, die wiederum in Triplikaten durchgeführt wurden.

SLCO1B3: Solute Carrier Organic Anion Transporter Member 1B3, GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, UD-SSC: Universität Düsseldorf - Squamous cell carcinoma, UM-SSC: Universität Michigan - Squamous cell carcinoma, UT-SSC: Universität Turku - Squamous cell carcinoma, HEK-293: Human embryonic kidney - 293, PANC1: Duktales Pankreaskarzinom 1, FibroA: Primäre humane Fibroblasten aus Adenomgewebe, mRNA: Messenger Ribonukleinsäure

Diese Daten zeigen, dass alle untersuchten Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches eine Expression von SLCO1B3 aufweisen, wobei die meisten (Ausnahme ist die Zelllinie UD-SCC 3) eine wesentlich stärkere Expression im Vergleich zur Kontrollzelllinie PANC1 zeigen.

Deutlich zeigt sich, dass die untersuchten Zelllinien fast ausschließlich SLCO1B3 in seiner Tumorvariante exprimieren, da die Ergebnisse für das spezifische Primer-Paar 2 nahezu identisch mit denen des unspezifischen Primer-Paares sind.

3.3 Testung der Chemosensibilität

Nachdem festgestellt wurde, dass die vorliegenden Tumorzellen SLCO1B3 stark exprimieren, sollte untersucht werden, ob dies einen Einfluss auf die Wirkung von Chemotherapeutika hat.

Dazu wurden die Zelllinien mit den Chemotherapeutika Docetaxel und Paclitaxel in unterschiedlichen Konzentrationen (0,01 µg/ml; 0,1 µg/ml; 1 µg/ml; 10 µg/ml; 100 µg/ml) behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde anschließend mit Hilfe eines Fluoreszenztests untersucht, wie hoch der Anteil an noch lebenden Zellen, bezogen auf eine unbehandelte Kontrollgruppe ist.

Ebenfalls getestet wurde, ob Ethanol, als Hauptlösungsmittel der Chemotherapeutikazubereitung, einen Einfluss auf die Zellvitalität hat. Dazu wurden Zellen mit den entsprechenden Konzentrationen Ethanols behandelt, wie sie auch in den Versuchen mit der pharmakologischen Substanz zur Verwendung kamen. Dabei zeigte sich, dass die verwendeten Mengen an Ethanol keinen Einfluss auf die Testergebnisse haben (Daten nicht dargestellt).

Alle gezeigten Darstellungen sind repräsentativ für Ergebnisse aus drei voneinander unabhängigen Experimenten. Für die Kontrollzelllinien PANC1, HEK-293 und FibroA werden die Ergebnisse in Abbildung 11 dargestellt. Es zeigt sich, dass alle drei Zelllinien unterschiedlich auf die Testsubstanzen reagieren. So zeigen sich die Zellen der Linie FibroA sehr resistent gegenüber den Chemotherapeutika. Die Vitalität liegt in der Konzentrationsspanne von 0,01 µg/ml bis 10 µg/ml zwischen 90 bis 80%. PANC1 dagegen liegt bei den gleichen Konzentrationen zwischen 75 und 60% Vitalität. HEK-293 sogar nur bei 70 bis 60% Vitalität. Bei Paclitaxel liegen die Werte noch etwas darunter.

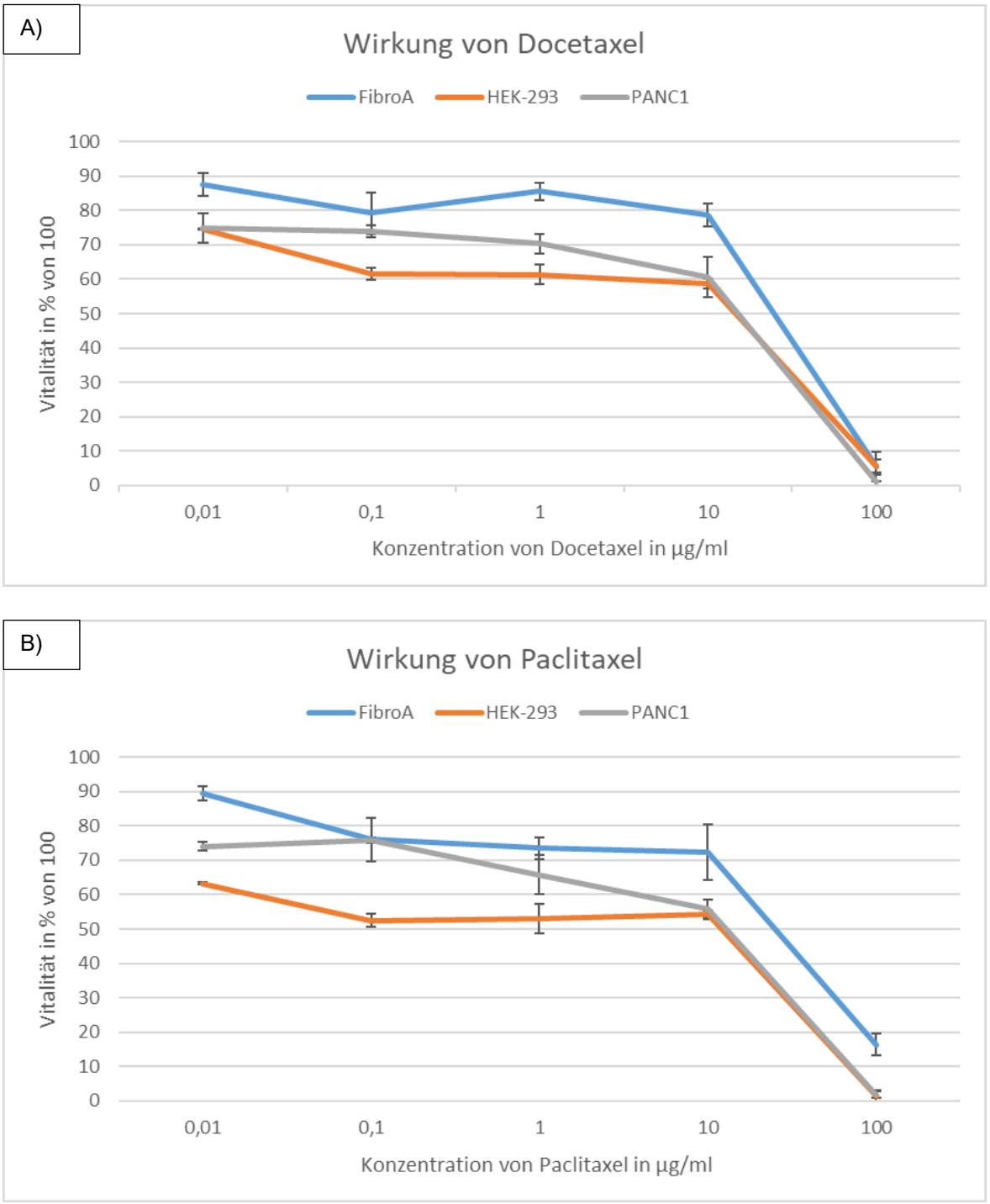

Abbildung 11: Wirkung des Chemotherapeutikums A) Docetaxel bzw. B) Paclitaxel. Dargestellt ist die Vitalität der Zellen in Prozent von 100%, in Abhängigkeit der Konzentration von Docetaxel oder Paclitaxel in µg/ml. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung von Mittelwerten dreier unabhängige Experimente, die wiederum in Triplikaten durchgeführt wurden. Ausgesät wurden 2000 Zellen / Well. Nach 24 Stunden erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums und die Zugabe des Chemotherapeutikums Docetaxel (A) oder Paclitaxel (B), in Konzentrationen wie angegeben. Nach weiteren 24 Stunden wurde die Vitalität mittels des Cell Titer 96 AQueous One Solution Proliferation Assay (Promega) lumineszenzbasiert gemessen.

HEK-293: Human embryonic kidney - 293, PANC1: Duktales Pankreaskarzinom 1, FibroA: Primäre humane Fibroblasten aus Adenomgewebe, mRNA: Messenger Ribonukleinsäure

Die Untersuchung der Zelllinien UD-SSC 1, UD-SSC 2, UD-SSC 3, UD-SSC 5, UD-SSC 6 und UD-SSC 8 ergab ähnliche Ergebnisse. Der Übersicht halber sind die Ergebnisse in mehreren Diagrammen dargestellt (Abbildung 12 und 13).

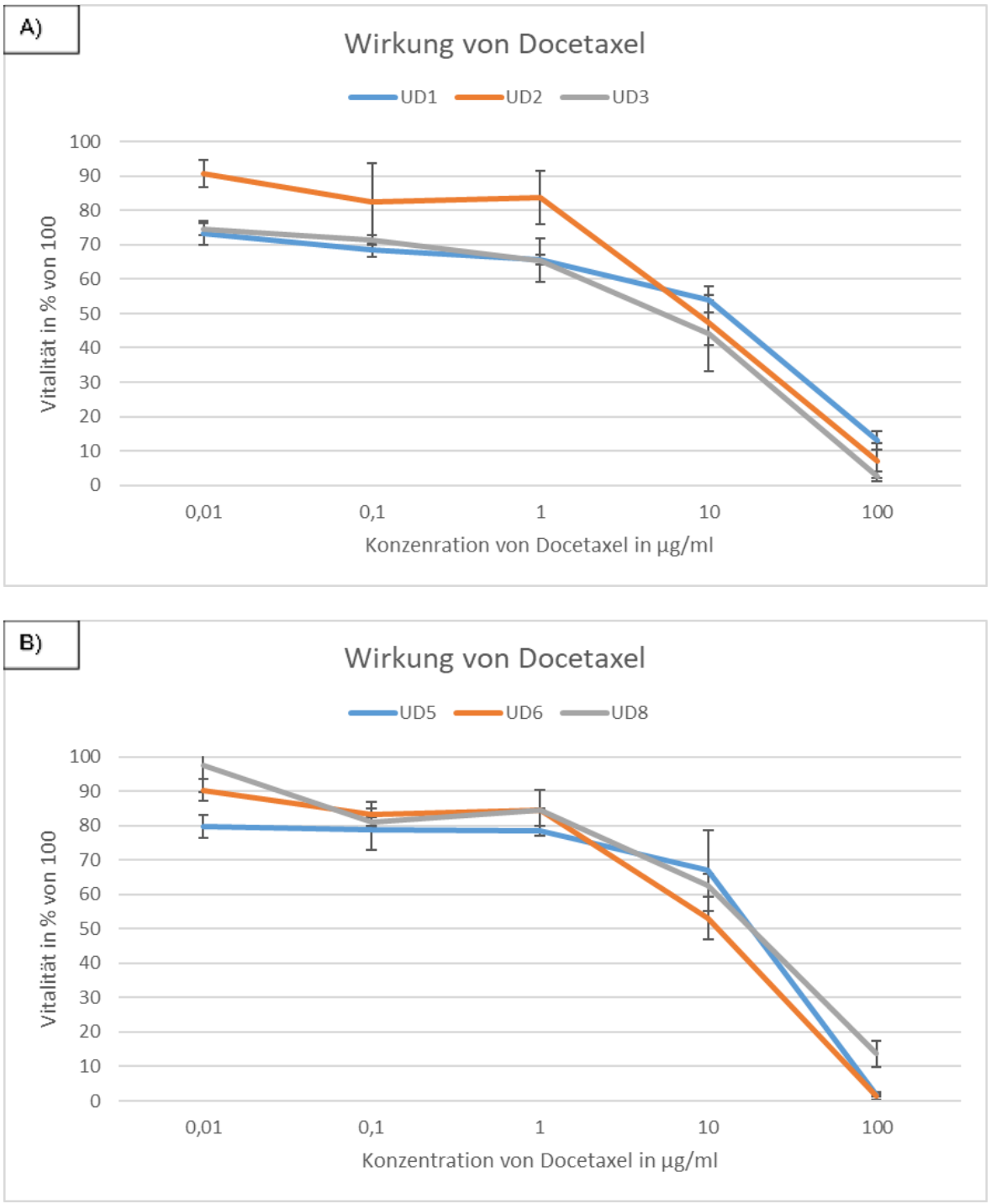

Abbildung 12: Wirkung des Chemotherapeutikums Docetaxel. Dargestellt ist die Vitalität der Zellen in Prozent von 100%, in Abhängigkeit der Konzentration von Docetaxel in µg/ml. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung von Mittelwerten dreier unabhängige Experimente, die wiederum in Triplikaten durchgeführt wurden. Ausgesät wurden 2000 Zellen / Well. Nach 24 Stunden erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums und die Zugabe des Chemotherapeutikums Docetaxel, in Konzentrationen wie angegeben. Nach weiteren 24 Stunden wurde die Vitalität mittels des Cell Titer 96 AQueous One Solution Proliferation Assay (Promega) lumineszenzbasiert gemessen.

UD-SSC: Universität Düsseldorf - Squamous cell carcinoma,

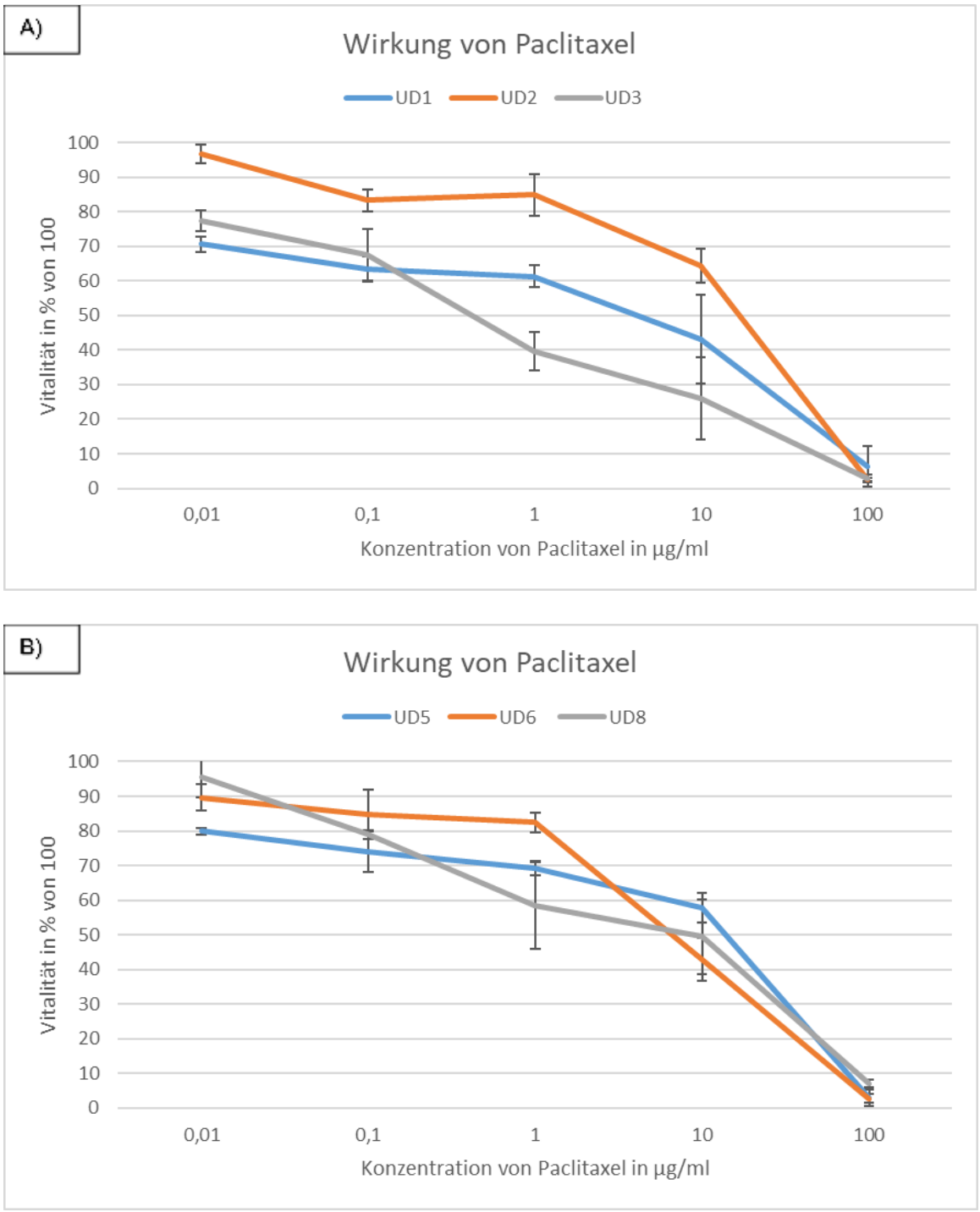

Abbildung 13: Wirkung des Chemotherapeutikums Paclitaxel. Dargestellt ist die Vitalität der Zellen in Prozent von 100%, in Abhängigkeit der Konzentration von Paclitaxel in µg/ml. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung von Mittelwerten dreier unabhängige Experimente, die wiederum in Triplikaten durchgeführt wurden. Ausgesät wurden 2000 Zellen / Well. Nach 24 Stunden erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums und die Zugabe des Chemotherapeutikums Paclitaxe, in Konzentrationen wie angegeben. Nach weiteren 24 Stunden wurde die Vitalität mittels des Cell Titer 96 AQueous One Solution Proliferation Assay (Promega) lumineszenzbasiert gemessen.

UD-SSC: Universität Düsseldorf - Squamous cell carcinoma

Auch für die restlichen untersuchten Zelllinien ergaben sich vergleichbare Daten (Abbildung 14 und 15).

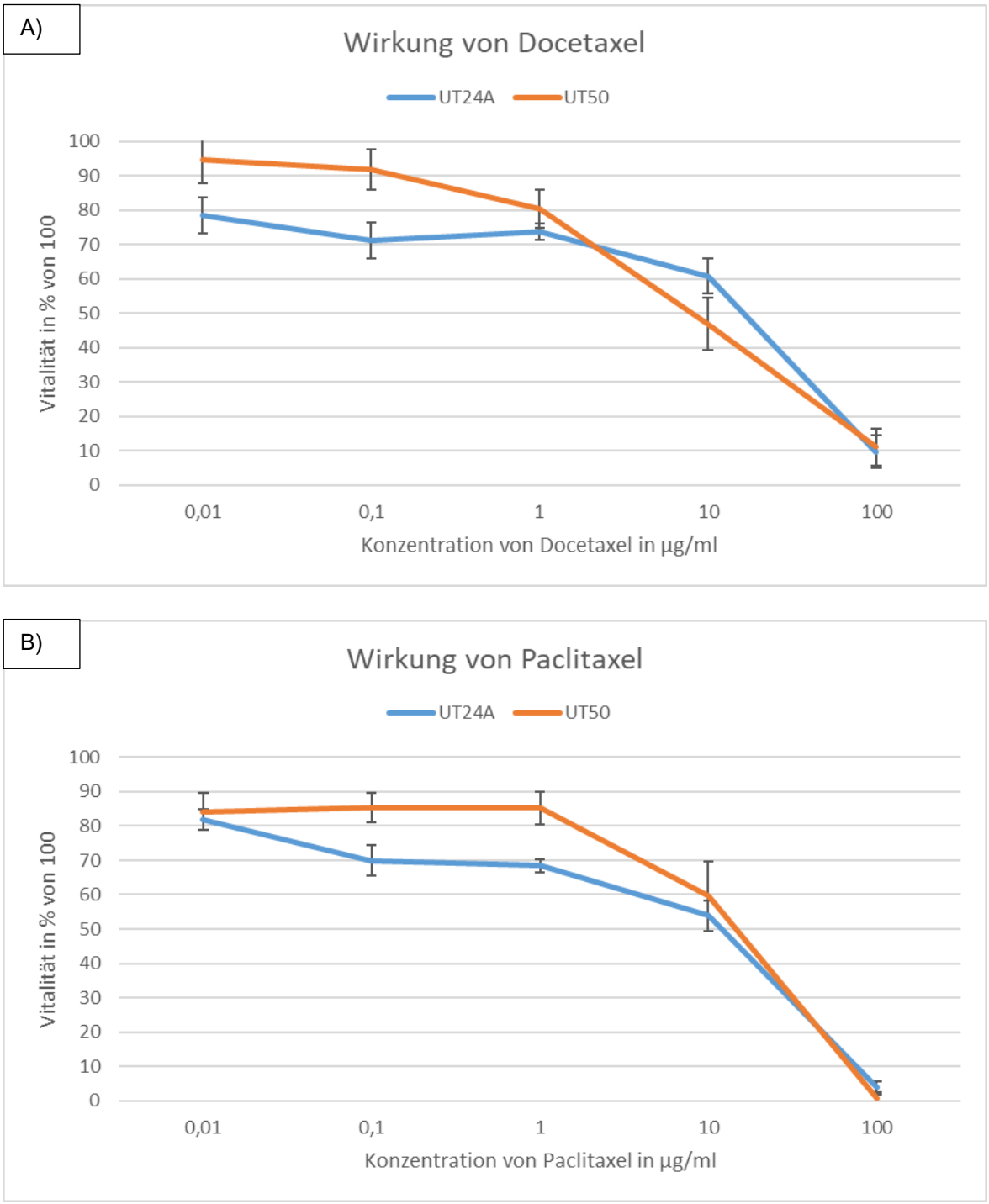

Abbildung 14: Wirkung des Chemotherapeutikums A) Docetaxel bzw. B) Paclitaxel. Dargestellt ist die Vitalität der Zellen in Prozent von 100%, in Abhängigkeit der Konzentration von Docetaxel bzw. Paclitaxel in µg/ml. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung von Mittelwerten dreier unabhängige Experimente, die wiederum in Triplikaten durchgeführt wurden. Ausgesät wurden 2000 Zellen / Well. Nach 24 Stunden erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums und die Zugabe des Chemotherapeutikums Docetaxel (A) bzw. Paclitaxel (B), in Konzentrationen wie angegeben. Nach weiteren 24 Stunden wurde die Vitalität mittels des Cell Titer 96 AQueous One Solution Proliferation Assay (Promega) lumineszenzbasiert gemessen.

UT-SSC: Universität Turku - Squamous cell carcinoma

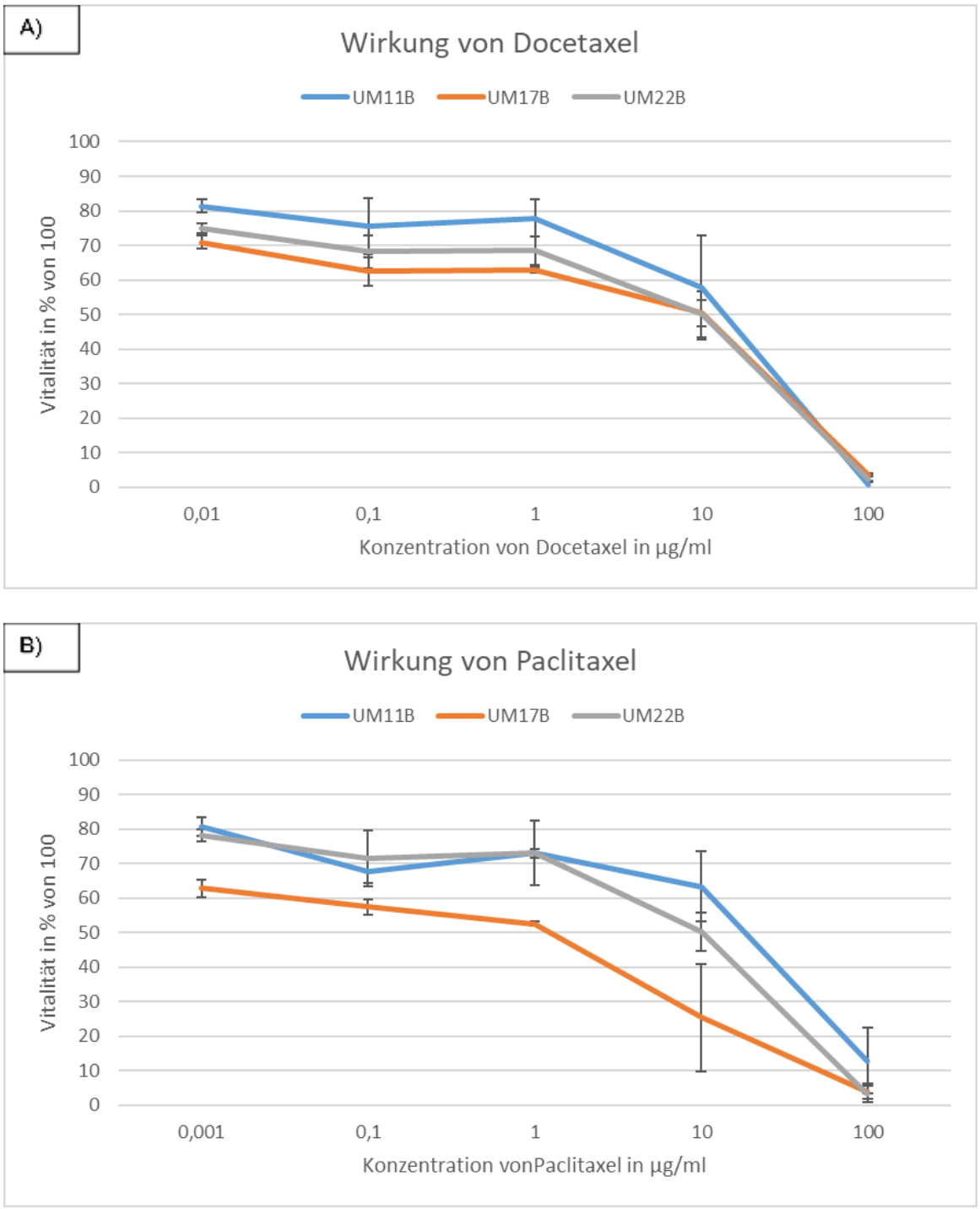

Abbildung 15: Wirkung des Chemotherapeutikums A) Docetaxel bzw. B) Paclitaxel. Dargestellt ist die Vitalität der Zellen in Prozent von 100%, in Abhängigkeit der Konzentration von Docetaxel bzw. Paclitaxel in µg/ml. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung von Mittelwerten dreier unabhängige Experimente, die wiederum in Triplikaten durchgeführt wurden. Ausgesät wurden 2000 Zellen / Well. Nach 24 Stunden erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums und die Zugabe des Chemotherapeutikums Docetaxel (A) bzw. Paclitaxel (B), in Konzentrationen wie angegeben. Nach weiteren 24 Stunden wurde die Vitalität mittels des Cell Titer 96 AQueous One Solution Proliferation Assay (Promega) lumineszenzbasiert gemessen.

UM-SSC: Universität Michigan - Squamous cell carcinoma

Vergleicht man die Expression von SLCO1B3 mit der Vitalität der Zellen nach der Behandlung mit den gewählten Substanzen, so zeigt sich, dass es scheinbar keinen besonders engen Zusammenhang zwischen der Wirkung der Substanzen und der Expression von SLCO1B3 gibt.

So liegen Zelllinien mit einer niedrigen Expression von SLCO1B3, wie zum Beispiel UD-SSC 1 und UD-SSC 3 bei einer Konzentration von 0,01 µg/ml Docetaxel bei einer Vitalität von 73% beziehungsweise 74%. Jedoch zeigen auch die Zelllinien UM-SSC 17B und UM-SSC 22B, welche eine deutlich höhere Expression von SLCO1B3 besitzen, nur eine Vitalität von 70% beziehungsweise 74% bei einer Konzentration von 0,01 µg/ml Docetaxel.

Auch die Zelllinie UM-SSC 11B, welche eine sehr hohe Expression von SLCO1B3 zeigt, hat lediglich eine Vitalität von 81% bei einer Konzentration von 0,01 µg/ml Docetaxel.

Dagegen zeigen die Zelllinien UD-SSC 8 und UT-SSC 50 bei gleicher Konzentration von Docetaxel und bei einer der Zelllinie UM-SSC 11B ähnlichen Expression von SLCO1B3 eine Vitalität von 97% beziehungsweise 94%. Dieses Ergebnis lässt sich auch auf die Anwendung von Paclitaxel übertragen.

Abbildung 16 zeigt den Vergleich zwischen der Expression von LT-SLCO1B3 und CT-SLCO1B3 gegenüber der Vitalität der Zellen bei 1 µg/ml Paclitaxel. Die Konzentration von 1 µg/ml wurde der Übersicht halber ausgewählt, da sie der physiologischen, während einer Chemotherapie im Körper erreichbaren, maximalen Plasmakonzentration am nächsten kommt.

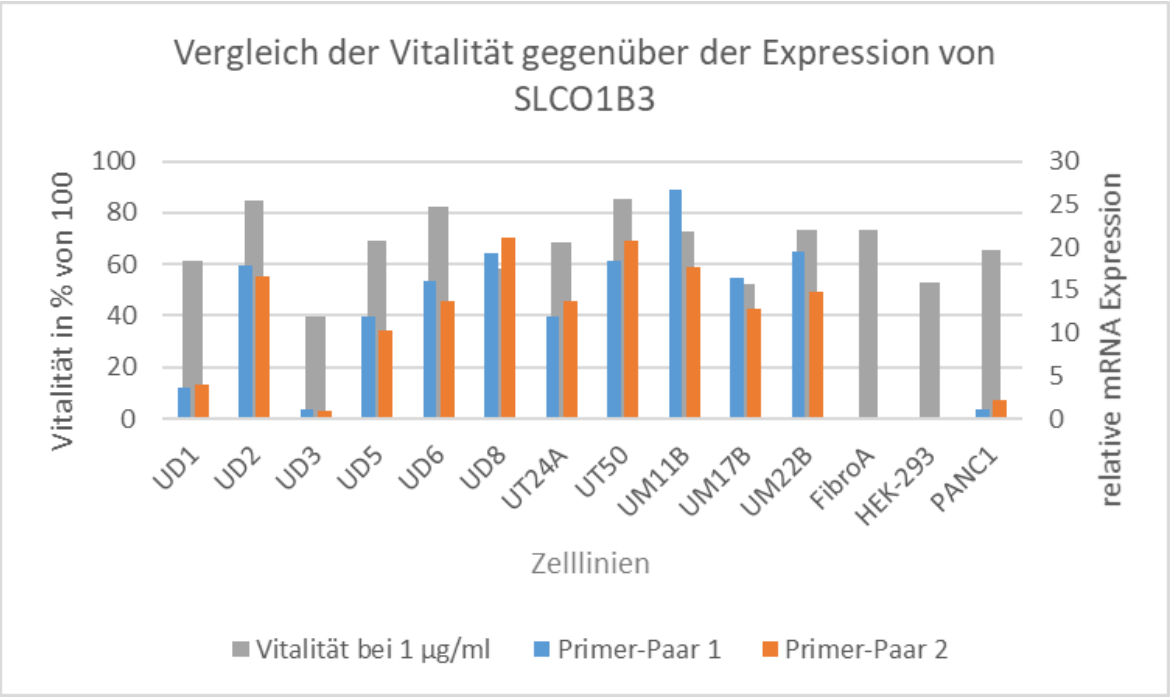

Abbildung 16: Vergleich der Vitalität, bei einer Konzentration von 1 µg/ml Paclitaxel, gegenüber der Expression von Primer-Paar 1 und Primer-Paar 2. Die Expression ist normalisiert relativ zur GAPDH Expression und bezogen auf PANC1 (=1).

SCLO1B3: Solute Carrier Organic Anion Transporter Member 1B3, GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, UD-SSC: Universität Düsseldorf - Squamous cell carcinoma, UM-SSC: Universität Michigan - Squamous cell carcinoma, UT-SSC: Universität Turku - Squamous cell carcinoma, HEK-293: Human embryonic kidney - 293, PANC1: Duktales Pankreaskarzinom 1, FibroA: Primäre humane Fibroblasten aus Adenomgewebe, mRNA: Messenger Ribonukleinsäure

Dabei zeigt sich, dass Zelllinien mit einer höheren Expression tendenziell eher auch eine höhere Vitalität zeigen, daher also weniger stark durch das Chemotherapeutikum beeinflusst werden. Jedoch gilt dies nicht für alle untersuchten Zelllinien. So zeigen UD-SSC 8 und UM-SSC 17B zwar eine relativ hohe Expression von SLCO1B3, jedoch scheinen sie relativ sensibel auf die Behandlung mit dem Chemotherapeutikum reagiert zu haben, denn ihre Vitalität liegt im Vergleich zu den anderen Zelllinien relativ niedrig.

Um festzustellen, ob nun ein Zusammenhang zwischen der Expression von SLCO1B3 und der Resistenz gegenüber der Chemotherapie besteht, führten wir Korrelationsanalysen nach Spearman durch. Betrachtet man dabei alle untersuchten Zelllinien, so erhält man für das Primer-Paar 1 einen Spearman Korrelationskoeffizienten von r = 0.38. Jedoch ist das Ergebnis nicht signifikant.

Ebenso verhält es sich bei der Betrachtung von Primer-Paar 2, hier liegt der Korrelationskoeffizient nach Spearman bei r = 0.43, doch auch hier ist das Ergebnis nicht signifikant.

Zieht man jedoch nur diejenigen Zelllinien, bei denen SLCO1B3 auch tatsächlich nachgewiesen werden konnte, in die Berechnung mit ein, so ändert sich das Ergebnis deutlich. Dann wird für das Primer-Paar 2 eine Spearman Korrelation von r = 0.58 erreicht und das Ergebnis ist signifikant mit $p \leq 0.05$. Ebenso erhält man für das Primer-Paar 1 eine Korrelation von r= 0.53, dies ist ebenfalls Signifikant mit $p \leq 0.05$.

Daher lässt sich vermuten, dass wenn Tumorzellen SLCO1B3, insbesondere in seiner Tumorvariante CT-SLCO1B3 exprimieren, resistenter gegenüber der chemotherapeutischen Behandlung sind. Dabei ist natürlich zu beachten, dass SLCO1B3 anscheinend auf keinen Fall ausschließlich Ursache einer solchen Resistenz ist. Auch ist zu beachten, dass andere Zellen, welche überhaupt kein SLCO1B3 exprimieren, ebenfalls sehr unterschiedlich auf die Behandlung mit Chemotherapeutika reagieren und somit von SLCO1B3 unabhängige Mechanismen zur Resistenzentwicklung besitzen müssen.

Somit zeigen unsere Ergebnisse zumindest, dass SLCO1B3 vermutlich einen Beitrag zur Resistenzentwicklung von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches gegenüber der Chemotherapie leistet. Der genaue Anteil an der vermutlich multifaktoriellen Genese bleibt damit natürlich unbeantwortet.

Anschließend wurde noch die mittlere inhibitorische Konzentration (IC50) bestimmt. Die Ergebnisse sowohl für Paclitaxel, als auch Dozetaxel zeigt Tabelle 4.

Tabelle 4: Darstellung der IC50 der untersuchten Zelllinien

UD-SSC: Universität Düsseldorf - Squamous cell carcinoma, UM-SSC: Universität Michigan - Squamous cell carcinoma, UT-SSC: Universität Turku - Squamous cell carcinoma, HEK-293: Human embryonic kidney - 293, PANC1: Duktales Pankreaskarzinom 1, FibroA: Primäre humane Fibroblasten aus Adenomgewebe, IC50: Mittlere Inhibitorische Konzentration in µM/L, rot = der errechnete IC50 Wert liegt oberhalb der im klinischen Alltag erreichbaren Plasmakonzentration, grün = der errechnete IC50 Wert liegt unterhalb der im klinischen Alltag erreichbaren Plasmakonzentration

Zelllinien	IC50 Paclitaxel	IC50 Docetaxel
UD-SSC 1	1,00	2,47
UD-SSC 2	14,14	7,11
UD-SSC 3	0,41	1,77
UD-SSC 5	3,88	11,46
UD-SSC 6	5,91	8,81
UD-SSC 8	3,04	13,71
UT-SSC 24A	3,03	5,07
UT-SSC 50	11,85	7,32
UM-SSC 11B	5,30	6,23
UM-SSC 17B	0,25	1,23
UM-SSC 22B	3,19	2,11
FibroA	12,27	21,14
HEK-293	0,42	1,66
PANC1	2,94	3,97

Es zeigt sich, dass bei Paclitaxel die IC50 für die meisten untersuchten Zelllinien unterhalb der maximalen, im klinischen Alltag erreichbaren, Plasmakonzentration von 2 - 4 µg/ml liegt. Bei Docetaxel liegen die meisten der IC50 Werte dagegen deutlich oberhalb der maximalen physiologischen Plasmakonzentration, die je nach Quelle zwischen 1,6 und 4 µg/ml liegt. Besonders fällt auf, dass bei den Zelllinien UD-SSC 5, UD-SSC 8 und UT-SSC 24A die IC50 für Paclitaxel innerhalb dieses Bereiches liegen, jedoch bei Docetaxel deutlich darüber.

4 Diskussion

4.1 Immunfluoreszenz

Im ersten Schritt dieser Arbeit wurden die zur Verfügung stehenden Tumorzellen mittels Immunfluoreszenz gefärbt. Die Immunfluoreszenz ist eine vielfach angewandte Methode zum Nachweis von Proteinen [41]. Sie ist, bei korrekter Durchführung, eine relativ schnelle und kostengünstige Methode, um auch eine größere Anzahl von Proben zu bearbeiten. Deshalb wurde sie auch im Rahmen dieser Arbeit zuerst verwendet, um nachzuweisen, dass OATP1B3 in den vorliegenden Tumorzellen überhaupt vorhanden ist. Anschließend erfolgte die visuelle Einteilung nach der Intensität der Fluoreszenz. Auch wenn die visuelle Einteilung nach der Intensität der Fluoreszenz ein eher subjektives und auch vom Untersucher abhängiges Verfahren ist, war dies, für die zu beantwortende Fragestellung, im Falle dieser Arbeit, ausreichend. Darüber hinaus werden visuelle Einteilungen bereits standardmäßig im klinischen Alltag eingesetzt. Bestes Beispiel ist die Anwendung beim Mammakarzinom zur Bestimmung des Hormonrezeptorstatus. Untersuchungen haben gezeigt, dass die interindividuelle Beurteilung der gleichen Probe, durch unterschiedliche Pathologen, ausreichend genaue Übereinstimmungen liefert, um im klinischen Alltag eingesetzt werden zu können [40].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte damit gezeigt werden, dass alle zur Verfügung stehenden Tumorzelllinien OATP1B3 exprimieren. Auch wenn die Expression zwischen den untersuchten Zelllinien starke Unterschiede aufweist, so scheint die Expression von OATP1B3 damit sehr häufig, bis regelhaft, bei diesen Tumoren vorzukommen. Diese Erkenntnis deckt sich mit der bereits bestehenden Literatur, so ist bereits bekannt, dass Kopf-Hals-Tumore SLCO1B3 exprimieren [66]. Doch wir konnten keine Untersuchung finden, in der eine so große Anzahl von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches (N = 11) gleichzeitig auf die Expression von OATP1B3 untersucht wurden.

Einschränkend ist natürlich anzumerken, dass in dieser Arbeit mit 11 unterschiedlichen Tumorzelllinien, keine ausreichende Anzahl an Proben untersucht wurde, um auf eine Allgemeingültigkeit zu schließen. Dazu müssten

systematisch weitere Proben bzw. primäres Tumormaterial untersucht werden. Jedoch ergänzt diese Arbeit die bestehenden Hinweise in diese Richtung.

Auch zeigte sich in der von uns durchgeführten Färbung ein feingranuläres intrazytoplasmatisches Färbeverhalten. Dies deckt sich mit der bereits bestehenden Literatur [59].

Ausgehend von der Annahme, dass wir mit der Immunfluoreszenz überwiegend CT-OATP1B3 nachgewiesen haben, ließe sich dies mit Veränderungen am N-terminalen Ende erklären. So konnte die Arbeitsgruppe um Chun et al. zeigen, dass die ersten 50 Aminosäuren am N-terminalen Ende entscheidend für die Membranbindung sind [9]. Da die ersten 28 Aminosäuren jedoch bei CT-OATP1B3 fehlen [59], ist dies eine gute Erklärung für das intrazytoplasmatische Vorkommen.

Warum OATP1B3 in seiner Tumorvariante hauptsächlich intrazytoplasmatisch und nicht, wie von einem Membrantransporter zu erwarten, membrangebunden vorkommt, ist noch nicht abschließend geklärt. Die Arbeitsgruppe um Thakkar et al. stellt die Vermutung an, dass CT-OATP vielleicht intrazellulär in Zellorganellen vorkommt und somit eine wichtige, noch unbekannte, Funktion ausfüllt. Dass diese Funktion nicht unbedingt mit der ursprünglichen Transportfunktion zusammenhängt, konnte die Arbeitsgruppe ebenfalls bereits zeigen. So hat CT-OATP1B3 eine geringere Transportfunktion als LT-OATP1B3 [59].

Da CT-SLCO1B3 jedoch in mehreren verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen wurde [19,56], lässt sich daraus schließen, dass Tumorzellen dieses Protein selektiv synthetisieren. Am wahrscheinlichsten ist unserer Meinung nach die Annahme, dass Zellen dadurch einen Überlebensvorteil generieren. In der Literatur finden sich bereits erste Hinweise in diese Richtung. So konnte nachgewiesen werden, dass Zellen, welche CT-OATP1B3 vermehrt exprimieren, wahrscheinlich einen Überlebensvorteil über den p53 „Pathway“ haben [27]. OATP1B3 scheint Einfluss auf die untergeordnete Signalkette des p53 „Pathways“ zu haben. So werden die Proteine P21WAF1 (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A), NOXA (Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1), und PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis) von OATP1B3 runterreguliert [27]. Diese werden aber normalerweise von p53 angesteuert und spielen eine wichtige Rolle bei der Apoptose. Ihr Fehlen

sorgt damit für eine vermehrte Apoptoseresistenz, auch wenn p53 an sich gar nicht betroffen ist [37,63].

Auch die Erstbeschreiber von CT-OATP1B3 konnten bis jetzt noch keine konkrete Aussage über die biologische Funktion des Proteins treffen. So bleibt die Frage zur biologischen Funktion noch unbeantwortet und bedarf weiterer Forschung.

4.2 Real Time PCR

Die in dem ersten Schritt der Arbeit gewonnene Erkenntnis, dass die zu untersuchenden Zelllinien OATP1B3 exprimieren, bildete die Grundlage für den nächsten Teil dieser Arbeit. In Anlehnung an die Arbeit von Nagai et al. [35] wurde untersucht, wie hoch die relative Expression von SLCO1B3 in den untersuchten Zelllinien ist. Dabei zeigte sich, dass für die meisten untersuchten Zelllinien eine deutliche Expression von SLCO1B3 besteht. Auch dies deckt sich mit der bereits vorhandenen Literatur. So wurde bereits mehrfach gezeigt, dass verschiedene Tumorentitäten, wie das Kolon oder Pankreaskarzinom, eine deutliche Überexpression von SLCO1B3 zeigen [59]. Das gleiche gilt für andere, bereits untersuchte, HNO-Tumorzellen [66].

Ebenfalls im gleichen Schritt wurde nach Vorgabe von Thakkar et al. [59] untersucht, welche Variante von SLCO1B3 (LT-SLCO1B3 oder CT-SLCO1B3) in den untersuchten Zellen vorliegt. Thakkar et al. konnte erstmals zeigen, dass die von Ihnen untersuchten Kolon- und Pankreaskarzinomzellen fast ausschließlich die von Nagai et al. neu entdeckte und beschriebene Tumorvariante CT-SLCO1B3 exprimieren.

Auch wir konnten erstmals nachweisen, dass die von uns untersuchten Tumorzelllinien zu einem Großteil, jedoch nicht ausschließlich, CT-SLCO1B3 exprimieren. Daneben bestand in den meisten von uns untersuchten Zelllinien eine deutliche Überexpression von CT-OATP1B3.

Ob dies regelhaft für Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches gilt, ist mit dieser Arbeit jedoch nicht zu beantworten, da auch hier wiederum die Anzahl der untersuchten Proben zu klein war und nicht jede Tumorentität aus dem Kopf-Hals-Bereich vertreten war. Dies gilt es an einer größeren und differenzierten Probenanzahl nachzuvollziehen.

4.3 Testung der Chemosensibilität

Der verwendete 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazoliumbromid-Assay (MTT-Assay) ist ein einfacher und gut reproduzierbarer Test, um die Chemosensibilität in HNO-Tumorzellen festzustellen. Durch ihn ist es möglich, die in vivo Reaktion auf das verwendete Chemotherapeutikum abzuschätzen [48,60]. Um eine möglichst genaue Aussage treffen zu können, sollte der Test den therapeutischen Bereich, beziehungsweise die maximale Plasmakonzentration der Testsubstanz, mit enthalten. Auch wenn versucht wird, die Wachstumsbedingungen der Zellen möglichst denen in vivo anzupassen, so ist dies dennoch limitiert. So werden die Zellen fibroblastenfrei kultiviert, um eine Überwucherung und damit Interferenz zu vermeiden [1]. Dabei darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass das Tumormikromilieu und die Zell-Zell Interaktionen einen großen Einfluss auf das Zellverhalten haben [55]. Auch die Verwendung von Monolayern entspricht nicht der Situation in vivo. So bilden spheroidale Multilayerkulturen die natürliche Struktur besser dar. Diese spheroidalen Multilayer erzielen in Zytotoxizitätsassays in der Regel eine höhere Chemoresistenz als Monolayer [39]. Jedoch sind die Anforderungen und auch die Kosten bei Verwendung von Multilayerkulturen deutlich gesteigert. Andere und auch wir konnten mit unseren Ergebnissen zeigen, dass durch mit Monolayern durchgeführten MTT-Assay´s gute Näherungen erzielt werden können [50].

In dieser Arbeit wurden, ähnlich der Arbeit von Schuler et al. [50], Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches auf ihre Resistenz gegenüber den Chemotherapeutika Paclitaxel und Docetaxel untersucht. Diese wurden ausgewählt, da sie in den verschiedenen Chemotherapieregimen im Kopf-Hals-Bereich regelmäßig im klinischen Alltag zum Einsatz kommen [13,15,32]. Schuler et al. konnte bereits für verschiedene andere (Cisplatin, Carboplatin, Fluorouracil, Methotrexat, Bleomycin), im klinischen Alltag weit verbreitete, Zytostatika eine große Variabilität der Chemoresistenz zwischen den untersuchten Zelllinien und den verwendeten Substanzen feststellen [50]. Auch wir konnten zeigen, dass zwischen den von uns untersuchten Zelllinien eine große Variabilität der Chemosensibilität gegenüber den untersuchten Substanzen besteht. Leider ist ein

direkter Vergleich der vorliegenden Arbeit mit der von Schuler et al. nicht möglich, da unterschiedliche Zelllinien in den jeweiligen Studien verwendet wurden.

Als Ursachen der Resistenz gegenüber den verwendeten Mitosehemmstoffen sind verschiedene Ursachen beschrieben. So wird die Hochregulation der Expression des P-Glycoproteins, dem Produkt des Multi-Drug-Resistance-Gene 1 (MDR 1) als eine Ursache einer Taxanresistenze angesehen [12,65]. Ein weiterer Mechanismus ist die Hochregulation von B cell lymphoma 2 (Bcl 2), einem Protein, welches wichtig für die Inhibition von proapoptotischen Signalen ist. Seine Hochregulation spielt bei vielen Tumorerkrankungen in der Resistenzentwicklung gegenüber der Chemotherapie eine wichtige Rolle [14,38,45]. In HNO-Tumoren scheint Bcl 2 ebenfalls eine Rolle bei der Therapieresistenz zu haben [52].

Auch die Hochregulation des von uns untersuchten Transportproteins OATP1B3, insbesondere in seiner Tumorvariante CT-OATP1B3, wird als mögliche Ursache für eine vermehrte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika diskutiert. So konnte beim Kolonkarzinom bereits gezeigt werden, dass eine Überexpression zu einer vermehrten Apoptoseresistenz gegenüber Oxaliplatin und Camptothecin führt [27].

4.4 Zusammenhang zwischen der Expression von SLCO1B3 und der Chemoresistenz

Wir konnten in dieser Arbeit erstmals zeigen, dass es einen Zusammenhang zwischen der Expression von CT-OATP1B3 und der Therapieresistenz gegenüber Taxanen in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches gibt. Die Ursachen dafür sind jedoch noch weitgehend unbekannt. Eine mögliche Erklärung dafür wurde bereits von Thakkar et al. geliefert, diese konnten zeigen, dass CT-OATP1B3 eine deutlich reduzierte Transportfunktion, im Gegensatz zu LT-OATP1B3 aufweist [59]. Dadurch ist die intrazelluläre Aufnahme von verschiedenen Stoffen, unter anderem auch Zytostatika, deutlich herabgesetzt. Dies könnte einen Schutzmechanismus darstellen. Dagegen spricht jedoch die überwiegend intrazelluläre Lage von CT-SLCO1B3, wie auch wir sie zeigen konnten.

Auch das Vorkommen in vielen unterschiedlichen Tumorarten spricht dafür [56], dass das Protein pro-tumorgen wirkt. So wäre neben seiner Transportfunktion auch noch eine antiapoptotische Wirkung denkbar. Als verwandtes Beispiel könnte man hier das bereits erwähnte P-Glycoprotein, codiert vom MDR 1 Gen, nennen. Von diesem konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es intrazellulär vorkommt und in verschiedenen Tumoren als antiapoptotisches Protein wirkt [47]. Dies gilt sogar in Abwesenheit seiner Adenosintriphosphat basierten Efflux-Funktion. Somit kann angenommen werden, das P-Glycoprotein eine, von seiner Transportfunktion unabhängige, antiapoptotische Funktion hat [58]. Übertragen auf unsere Ergebnisse, in Zusammenschau mit der bisherigen Literatur, könnte dies auch für OATP1B3 gelten. Welche genaue Funktion OATP1B3 dabei jedoch in den Zellen erfüllt ist bisher nicht bekannt und bedarf weiterer Forschungen.

4.5 HPV

Ein Punkt, der mit dieser Arbeit nicht beantwortet werden kann ist, ob die Infektion mit HPV einen Einfluss auf die Wirkung der Chemotherapie hat. So wird diskutiert, dass Patienten, in deren Tumoren sich HPV nachweisen lässt, eine bessere Prognose haben, als solche, ohne diesen Nachweis [2,42]. Da von den uns zur Verfügung stehenden Zelllinien jedoch ausschließlich die Linie UD-SSC 2 HPV positiv ist, können wir hierzu keine Aussage treffen.

5 Zusammenfassung

Organic-Anion-Transporting-Polypeptide (OATP), welche zur Familie der „Solute Carrier Organic Anion Transporter“ (SLCO) gehören, kommen beim Menschen in einer Vielzahl von Geweben vor. Ihre Funktion ist dabei hauptsächlich der Stofftransport über die Zellmembran. Diese Arbeit konzentriert sich dabei auf OATP1B3, einem transmembranärem Membranprotein, welches normalerweise in der Leber lokalisiert ist. OATP1B3 wird aber auch in verschiedenen Tumoren exprimiert. Gleichzeitig ist eine hohe Expression mit einem schlechteren „outcome“ verbunden. Ebenfalls konnte mittlerweile gezeigt werden, dass von OATP1B3 eine Tumorvariante (CT-OATP1B3) mit veränderter Aminosäurenstruktur existiert. Über die explizite Funktion dieses Proteins gibt es bisher jedoch nur wenige Erkenntnisse.

Mit dieser Arbeit wollten wir ergänzend klären, in wie weit Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches OATP1B3 exprimieren. In der dazu durchgeführten Immunfluoreszenzfärbung konnten wir zeigen, dass alle 11 von uns untersuchten Zelllinien OATP1B3 exprimieren. Da der von uns verwendete Antikörper jedoch nicht zwischen dem Leber-Typ von OATP1B3 (LT-OATP1B3) und CT-OATP1B3 unterscheiden kann, führten wir im Anschluss eine Real Time Polymerase Kettenreaktion (RT-PCT) durch. Dabei verwendeten wir zum einen ein konventionelles Primer-Paar, welches nicht zwischen den beiden Varianten von OATP1B3 unterscheiden kann, sowie, in Anlehnung an die Arbeit von Thakkar et al. ein Primer-Paar, welches speziell auf CT-OATP1B3 zugeschnitten ist. So konnten wir erstmals nachweisen, dass alle von uns untersuchten Zelllinien hauptsächlich CT-OATP1B3 exprimieren.

Da insbesondere für das Kolonkarzinom bereits nachgewiesen werden konnte, dass eine hohe Expression mit einer stärkeren Chemoresistenz zusammengeht, wollten wir den Nachweis auch für die von uns untersuchten Zelllinien erbringen. Daher führten wir mit den häufig im klinischen Alltag verwendeten Chemotherapeutika Docetaxel und Paclitael, aus der Gruppe der Taxane, einen Proliferationsassay durch. Dabei konnten wir zeigen, dass die von uns untersuchten Zelllinien sehr unterschiedlich auf die Testsubstanzen reagieren.

Anschließend führten wir, bei nicht normalverteilten Ergebnissen, noch eine Korrelationsanalyse nach Spearman durch. Fasst man dabei alle Zelllinien, auch die Kontrollen, welche gar kein OATP1B3 exprimieren, zusammen, so ergibt sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von OATP1B3 und der Vitalität der Zellen im Proliferationsassay. Betrachtet man jedoch nur die Tumorzellen, welche auch OATP1B3 exprimieren, so ändert sich das Ergebnis deutlich. Dann ergibt sich eine Spearman Korrelation von $r = 0.58$ und das Ergebnis ist signifikant mit $p \leq 0.05$. Dies bedeutet, dass Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches, welche CT-SLCO1B3 exprimieren, eine signifikant größere Resistenz gegenüber den untersuchten Chemotherapeutika haben.

Warum Tumorzellen und auch Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches OATP1B3 überexprimieren, bleibt weiterhin unklar. In der Diskussion ist eine deutlich reduzierte Transportfunktion von CT-OATP1B3 im Vergleich zu LT-OATP1B3. Dadurch ist die intrazelluläre Aufnahme von Zytostatika deutlich herabgesetzt. Dies könnte einen Schutzmechanismus darstellen. Die überwiegend intrazelluläre Lage von CT-OATP1B3 widerspricht dieser These jedoch.

Durch den Nachweis von CT-OATP1B3 in vielen unterschiedlichen Tumoren wird auch eine pro-tumorgen wirkende Proteinfunktion, unabhängig von der Transportfunktion, diskutiert. Als verwandtes Beispiel ist hier das P-Glycoprotein, codiert vom Multi Drug Resistance Gen 1, zu nennen. Von diesem konnte gezeigt werden, dass es ebenfalls intrazellulär vorkommt und in verschiedenen Tumoren als antiapoptotisches Protein wirkt, sogar in Abwesenheit seiner Adenosintriphosphat basierten Effluxfunktion. Ähnliches könnte auch für OATP1B3 gelten. Welche genaue Funktion OATP1B3 dabei jedoch in den Zellen erfüllt, ist bisher nicht bekannt.

Zusammenfassend konnten wir mit dieser Arbeit ergänzende Hinweise dazu liefern, dass Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches, vielleicht regelhaft, OATP1B3 exprimieren. Dabei scheinen sie überwiegend die CT-OATP1B3 Variante zu bilden. Diese scheint, zumindest deuten auch unsere Ergebnisse darauf hin, trotz ihrer intrazellulären Lage, einen Überlebensvorteil für die Zellen darzustellen. Die Ursachen hierfür bleiben jedoch weiter unklar und bedürfen der weiteren Forschung.

6 Literaturverzeichnis

1. Abe R, Ueo H, Akiyoshi T: Evaluation of MTT assay in agarose for chemosensitivity testing of human cancers: comparison with MTT assay. Oncology, 51: 416-425 (1994)

2. Ahmadi N, Chan M, Huo Y R, Sritharan N, Chin R Y: Survival outcome of tonsillar squamous cell carcinoma (TSCC) in the context of human papillomavirus (HPV): A systematic review and meta-analysis. The surgeon : journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland, (2018)

3. Amanam I, Gupta R, Mita A, Scher K, Massarelli E: Perspectives in Head and Neck Medical Oncology. Cancer treatment and research, 174: 163-185 (2018)

4. Appendino G: The Story of Taxol. Nature and Politics in the Pursuit of an Anti-Cancer Drug By J. Goodman and V. Walsh (University of Manchester, UK). Cambridge University Press, Cambridge, UK. 2001. xii + 282 pp. 15; Journal of natural products, 65: 246-246 (2002)

5. Ban M J, Ji S H, Lee C K, Bae S B, Kim H J, Ahn T S, Lee M S, Baek M J, Jeong D: Solute carrier organic anion transporter family member 4A1 (SLCO4A1) as a prognosis marker of colorectal cancer. Journal of cancer research and clinical oncology, 143: 1437-1447 (2017)

6. Bernabeu E, Cagel M, Lagomarsino E, Moretton M, Chiappetta D A: Paclitaxel: What has been done and the challenges remain ahead. International journal of pharmaceutics, 526: 474-495 (2017)

7. Chew S C, Sandanaraj E, Singh O, Chen X, Tan E H, Lim W T, Lee E J, Chowbay B: Influence of SLCO1B3 haplotype-tag SNPs on docetaxel disposition in Chinese nasopharyngeal cancer patients. British journal of clinical pharmacology, 73: 606-618 (2012)

8. Chew S C, Singh O, Chen X, Ramasamy R D, Kulkarni T, Lee E J, Tan E H, Lim W T, Chowbay B: The effects of CYP3A4, CYP3A5, ABCB1, ABCC2, ABCG2 and SLCO1B3 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of docetaxel in nasopharyngeal carcinoma patients. Cancer chemotherapy and pharmacology, 67: 1471-1478 (2011)

9. Chun S E, Thakkar N, Oh Y, Park J E, Han S, Ryoo G, Hahn H, Maeng S H, Lim Y R, Han B W, Lee W: The N-terminal region of organic anion transporting polypeptide 1B3 (OATP1B3) plays an essential role in regulating its plasma membrane trafficking. Biochemical pharmacology, 131: 98-105 (2017)

10. de Morree E S, Bottcher R, van Soest R J, Aghai A, de Ridder C M, Gibson A A, Mathijssen R H, Burger H, Wiemer E A, Sparreboom A, de Wit R, van Weerden W M: Loss of SLCO1B3 drives taxane resistance in prostate cancer. British journal of cancer, 115: 674-681 (2016)

11. D'Souza G, Cullen K, Bowie J, Thorpe R, Fakhry C: Differences in oral sexual behaviors by gender, age, and race explain observed differences in prevalence of oral human papillomavirus infection. PloS one, 9: e86023 (2014)

12. Friedrich R E, Punke C, Reymann A: Expression of multi-drug resistance genes (mdr1, mrp1, bcrp) in primary oral squamous cell carcinoma. In vivo (Athens, Greece), 18: 133-147 (2004)

13. Frikha M, Auperin A, Tao Y, Elloumi F, Toumi N, Blanchard P, Lang P, Sun S, Racadot S, Thariat J, Alfonsi M, Tuchais C, Cornely A, Moussa A, Guigay J, Daoud J, Bourhis J, GORTEC: A randomized trial of induction docetaxel-cisplatin-5FU followed by concomitant cisplatin-RT versus concomitant cisplatin-RT in nasopharyngeal carcinoma (GORTEC 2006-02). Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology, 29: 731-736 (2018)

14. Gao G, Dou Q P: G(1) phase-dependent expression of bcl-2 mRNA and protein correlates with chemoresistance of human cancer cells. Molecular pharmacology, 58: 1001-1010 (2000)

15. Guidi A, Codeca C, Ferrari D: Chemotherapy and immunotherapy for recurrent and metastatic head and neck cancer: a systematic review. Medical oncology (Northwood, London, England), 35: 37-018-1096-5 (2018)

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

17. Hagenbuch B, Meier P J: The superfamily of organic anion transporting polypeptides. Biochimica et biophysica acta, 1609: 1-18 (2003)

18. Hagenbuch B, Stieger B: The SLCO (former SLC21) superfamily of transporters. Molecular aspects of medicine, 34: 396-412 (2013)

19. Hays A, Apte U, Hagenbuch B: Organic anion transporting polypeptides expressed in pancreatic cancer may serve as potential diagnostic markers and therapeutic targets for early stage adenocarcinomas. Pharmaceutical research, 30: 2260-2269 (2013)

20. Horwitz S B: Taxol (paclitaxel): mechanisms of action. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology, 5 Suppl 6: S3-6 (1994)

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

22. Hu B S, Xiong S M, Li G, Li J P: Downregulation of SLC5A8 inhibits hepatocellular carcinoma progression through regulation of Wnt/beta-catenin

signaling. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, 37: 13445-13453 (2016)

23. Klussmann J P, Gultekin E, Weissenborn S J, Wieland U, Dries V, Dienes H P, Eckel H E, Pfister H J, Fuchs P G: Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. The American journal of pathology, 162: 747-753 (2003)

24. Konig J: Uptake transporters of the human OATP family: molecular characteristics, substrates, their role in drug-drug interactions, and functional consequences of polymorphisms. Handbook of Experimental Pharmacology, (201):1-28. doi: 1-28 (2011)

25. Kunze A, Huwyler J, Camenisch G, Poller B: Prediction of organic anion-transporting polypeptide 1B1- and 1B3-mediated hepatic uptake of statins based on transporter protein expression and activity data. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, 42: 1514-1521 (2014)

26. Lee H H, Leake B F, Teft W, Tirona R G, Kim R B, Ho R H: Contribution of hepatic organic anion-transporting polypeptides to docetaxel uptake and clearance. Molecular cancer therapeutics, 14: 994-1003 (2015)

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

28. Lee Y C, Zugna D, Richiardi L, Merletti F, Marron M, Ahrens W, Pohlabeln H, Lagiou P, Trichopoulos D, Agudo A, Castellsague X, Betka J, Holcatova I, Kjaerheim K, Macfarlane G J, Macfarlane T V, Talamini R, Barzan L, Canova C, Simonato L, Conway D I, McKinney P A, Thomson P, Znaor A, Healy C M, McCartan B E, Boffetta P, Brennan P, Hashibe M: Smoking addiction and the risk of upper-aerodigestive-tract cancer in a multicenter case-control study. International journal of cancer, 133: 2688-2695 (2013)

29. Liebmann J E, Cook J A, Lipschultz C, Teague D, Fisher J, Mitchell J B: Cytotoxic studies of paclitaxel (Taxol) in human tumour cell lines. British journal of cancer, 68: 1104-1109 (1993)

30. Livak K J, Schmittgen T D: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods (San Diego, Calif.), 25: 402-408 (2001)

31. Lowe N M, Bernstein J M, Mais K, Garcez K, Lee L W, Sykes A, Thomson D J, Homer J J, West C M, Slevin N J: Taxane, platinum and 5-FU prior to chemoradiotherapy benefits patients with stage IV neck node-positive head and neck cancer and a good performance status. Journal of cancer research and clinical oncology, 144: 389-401 (2018)

32. Mody M D, Gill H S, Saba N F: The Evolving and Future Role of Taxanes in Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck: A Review. JAMA otolaryngology-- head & neck surgery, 142: 898-905 (2016)

33. Mross K, Hollander N, Hauns B, Schumacher M, Maier-Lenz H: The pharmacokinetics of a 1-h paclitaxel infusion. Cancer chemotherapy and pharmacology, 45: 463-470 (2000)

34. Murray M, Zhou F: Trafficking and other regulatory mechanisms for organic anion transporting polypeptides and organic anion transporters that modulate cellular drug and xenobiotic influx and that are dysregulated in disease. British journal of pharmacology, 174: 1908-1924 (2017)

35. Nagai M, Furihata T, Matsumoto S, Ishii S, Motohashi S, Yoshino I, Ugajin M, Miyajima A, Matsumoto S, Chiba K: Identification of a new organic anion transporting polypeptide 1B3 mRNA isoform primarily expressed in human cancerous tissues and cells. Biochemical and biophysical research communications, 418: 818-823 (2012)

36. Oberlies N H, Kroll D J: Camptothecin and taxol: historic achievements in natural products research. Journal of natural products, 67: 129-135 (2004)

37. Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N: Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. Science (New York, N.Y.), 288: 1053-1058 (2000)

38. Otake Y, Soundararajan S, Sengupta T K, Kio E A, Smith J C, Pineda-Roman M, Stuart R K, Spicer E K, Fernandes D J: Overexpression of nucleolin in chronic lymphocytic leukemia cells induces stabilization of bcl2 mRNA. Blood, 109: 3069-3075 (2007)

39. Padron J M, van der Wilt C L, Smid K, Smitskamp-Wilms E, Backus H H, Pizao P E, Giaccone G, Peters G J: The multilayered postconfluent cell culture as a model for drug screening. Critical reviews in oncology/hematology, 36: 141-157 (2000)

40. Paradiso.E, Marubini.E.: Interobserver reproducibility of immunohistochemical HER-2/neu evaluation in human breast cancer: the real-world experience. The International journal of biological markers, 19: 147-154 (2004)

41. Peck A R, Girondo M A, Liu C, Kovatich A J, Hooke J A, Shriver C D, Hu H, Mitchell E P, Freydin B, Hyslop T, Chervoneva I, Rui H: Validation of tumor protein marker quantification by two independent automated immunofluorescence image analysis platforms. Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc, 29: 1143-1154 (2016)

42. Peralta R, Garcia P, Valdivia A, Lopez A, Apresa T, Hernandez D M, Gallegos F, Alvarado-Cabrero I, Vargas-De-Leon C, Davila S, Romero P, Salcedo M: HPV Could be a Potential Factor of Survival in Laryngeal Cancer: a Preliminary Study in Mexican Patients. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP, 19: 1711-1716 (2018)

43. Peterson L A, Bellile E L, Wolf G T, Virani S, Shuman A G, Taylor J M G, Rozek L S, The University of Michigan Head and Neck Specialized Program of Research Excellence Program: Cigarette use, comorbidities, and prognosis in a prospective

head and neck squamous cell carcinoma population. Head & neck, 38: 1810-1820 (2016)

44. Pfaffl M W: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic acids research, 29: e45 (2001)

45. Reed J C: Bcl-2 family proteins: strategies for overcoming chemoresistance in cancer. Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.), 41: 501-532 (1997)

46. Rischin D, Young R J, Fisher R, Fox S B, Le Q T, Peters L J, Solomon B, Choi J, O'Sullivan B, Kenny L M, McArthur G A: Prognostic significance of p16INK4A and human papillomavirus in patients with oropharyngeal cancer treated on TROG 02.02 phase III trial. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 28: 4142-4148 (2010)

47. Rocco A, Compare D, Liguori E, Cianflone A, Pirozzi G, Tirino V, Bertoni A, Santoriello M, Garbi C, D'Armiento M, Staibano S, Nardone G: MDR1-P-glycoprotein behaves as an oncofetal protein that promotes cell survival in gastric cancer cells. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 92: 1407-1418 (2012)

48. Rousseau A, Marquet P, Debord J, Sabot C, Lachatre G: Adaptive control methods for the dose individualisation of anticancer agents. Clinical pharmacokinetics, 38: 315-353 (2000)

49. Santuray R T, Johnson D E, Grandis J R: New Therapies in Head and Neck Cancer. Trends in cancer, 4: 385-396 (2018)

50. Schuler P J, Trellakis S, Greve J, Bas M, Bergmann C, Bolke E, Lehnerdt G, Mattheis S, Albers A E, Brandau S, Lang S, Whiteside T L, Bier H, Hoffmann T K: In vitro chemosensitivity of head and neck cancer cell lines. European journal of medical research, 15: 337-344 (2010)

51. Schwab K S, Kristiansen G, Schild H H, Held S E A, Heine A, Brossart P: Successful Treatment of Refractory Squamous Cell Cancer of the Head and Neck with Nivolumab and Ipilimumab. Case reports in oncology, 11: 17-20 (2018)

52. Shi X, Dou Y, Zhou K, Huo J, Yang T, Qin T, Liu W, Wang S, Yang D, Chang L, Wang C: Targeting the Bcl-2 family and P-glycoprotein reverses paclitaxel resistance in human esophageal carcinoma cell line. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie, 90: 897-905 (2017)

53. Smith N F, Acharya M R, Desai N, Figg W D, Sparreboom A: Identification of OATP1B3 as a high-affinity hepatocellular transporter of paclitaxel. Cancer biology & therapy, 4: 815-818 (2005)

54. Stage T B, Bergmann T K, Kroetz D L: Clinical Pharmacokinetics of Paclitaxel Monotherapy: An Updated Literature Review. Clinical pharmacokinetics, 57: 7-19 (2018)

55. Strauss L, Bergmann C, Szczepanski M, Gooding W, Johnson J T, Whiteside T L: A unique subset of CD4+CD25highFoxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 13: 4345-4354 (2007)

56. Sun Y, Furihata T, Ishii S, Nagai M, Harada M, Shimozato O, Kamijo T, Motohashi S, Yoshino I, Kamiichi A, Kobayashi K, Chiba K: Unique expression features of cancer-type organic anion transporting polypeptide 1B3 mRNA expression in human colon and lung cancers. Clinical and translational medicine, 3: 37-014-0037-y. eCollection 2014 (2014)

57. Sun Y, Harada M, Shimozato O, Souda H, Takiguchi N, Nabeya Y, Kamijo T, Akita H, Anzai N, Chiba K, Furihata T: Cancer-type OATP1B3 mRNA has the potential to become a detection and prognostic biomarker for human colorectal cancer. Biomarkers in medicine, (2017)

58. Tainton K M, Smyth M J, Jackson J T, Tanner J E, Cerruti L, Jane S M, Darcy P K, Johnstone R W: Mutational analysis of P-glycoprotein: suppression of caspase activation in the absence of ATP-dependent drug efflux. Cell death and differentiation, 11: 1028-1037 (2004)

59. Thakkar N, Kim K, Jang E R, Han S, Kim K, Kim D, Merchant N, Lockhart A C, Lee W: A cancer-specific variant of the SLCO1B3 gene encodes a novel human organic anion transporting polypeptide 1B3 (OATP1B3) localized mainly in the cytoplasm of colon and pancreatic cancer cells. Molecular pharmaceutics, 10: 406-416 (2013)

60. van den Bongard H J, Mathot R A, Beijnen J H, Schellens J H: Pharmacokinetically guided administration of chemotherapeutic agents. Clinical pharmacokinetics, 39: 345-367 (2000)

61. Vasantha J, Kannan G, Goud T, Palani T, Vanitha R, Anitha R, Priya J: Pharmacokinetic evaluation of Paclitaxel in South Indian cancer patients: a prospective study. Journal of young pharmacists : JYP, 3: 322-328 (2011)

62. Yassine F, Salibi E, Gali-Muhtasib H: Overview of the Formulations and Analogs in the Taxanes' Story. Current medicinal chemistry, 23: 4540-4558 (2016)

63. Yu J, Zhang L: No PUMA, no death: implications for p53-dependent apoptosis. Cancer cell, 4: 248-249 (2003)

64. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (Hrsg). (Hrsg) Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Berlin, (2016)

65. Zhigang H, Qi Z, Jugao F, Xiaohong C, Wei Z, Hong W, Hu H, Na M, Zheng Y, Demin H: Reverse multidrug resistance in laryngeal cancer cells by knockdown MDR1 gene expression. Journal of otolaryngology - head & neck surgery = Le Journal d'oto-rhino-laryngologie et de chirurgie cervico-faciale, 38: 440-448 (2009)

66. Zolk O, Schnepf R, Muschler M, Fromm M F, Wendler O, Traxdorf M, Iro H, Zenk J: Transporter gene expression in human head and neck squamous cell carcinoma and associated epigenetic regulatory mechanisms. The American journal of pathology, 182: 234-243 (2013)

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Hoffmann möchte ich an dieser Stelle herzlich dafür danken, dass er mir diese Arbeit ermöglicht hat und mir dafür ein großartiges Team an die Seite gestellt hat.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Zolk, der jederzeit bei Fragen zur Verfügung stand und mich in seinem Labor mit dem Verfahren der PCR vertraut machte.

Der wahrscheinlich größte Dank geht an Frau Prof. Dr. Brunner, welche wie selbstverständlich einsprang, als meine bisherige Betreuerin krankheitsbedingt ausfiel. Sie stand mir mit viel Rat und Tat zur Seite, sowohl während meiner Arbeit im Labor, als auch danach während des Schreibprozesses. Ohne sie wäre die Arbeit nicht fertig geworden.

Daneben möchte ich noch allen anderen Mitarbeitern, den MTA´s und Doktoranden im Labor, für die vielen kleinen Momente der Zerstreuung und der kurzen Pausen während der langwierigen Arbeit an der Sterilbank danken. Es war schön mit euch zu arbeiten.

Der letzte Dank geht, wie sollte es anders sein, an meine Familie und Marcel, die mich immer unterstützten, wenn ich Hilfe brauchte und die das Wort „Doktorarbeit“ nun nie wieder hören möchten.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Geburtsdatum:	16. September 1988
Geburtsort:	Düsseldorf
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Studium:

Juli 2017	Erhalt der Approbation
Oktober 2010 – Mai 2017	Humanmedizin Universität Ulm 2. Staatsexamen Mai 2017 (Gesamtnote 1,66)
Mai 2016 – April 2017	Praktisches Jahr: - 1. Tertial: Universitätsklinikum Ulm, Abteilung Orthopädie - 2. Tertial: Sanakrankenhaus Düsseldorf Gerresheim, Abteilung Innere Medizin - 3. Tertial: Kantonsspital Winterthur, Abteilung für Chirurgie
Februar 2015 – Februar 2016	Promotionsprogramm experimentelle Medizin Universität Ulm

Berufserfahrung:

November 2017	Arbeitsbeginn Helios Klinikum GmbH Krefeld Abteilung für Orthopädie, Unfall- und Handchirurgie

Oktober 2014 – Februar 2015:	Wissenschaftliche Hilfskraft, Universitätsklinikum Ulm Im Skills Lab Chirurgie Klinik für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie
Oktober 2013 – Juli 2014:	Wissenschaftliche Hilfskraft, Universitätsklinikum Ulm Im Skills Lab Chirurgie Klinik für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie
Mai 2013 – Juli 2013:	Wissenschaftliche Hilfskraft, Universitätsklinikum Ulm Im Institut für Anatomie und Zellbiologie
Mai 2012 – Juli 2012:	WissenschaftlicheHilfskraft, Universitätsklinikum Ulm Institut für Molekulare und Zelluläre Anatomie
November 2009 - Dezember 2009:	Praktikum Kö Kreuz Immobilien GmbH, Düsseldorf
April 2009 – August 2009:	Mitarbeiter im Florence-Nightingale-Krankenhaus, Düsseldorf Abteilung Echokardiographie und Sonographie
Juli 2008 – März 2009:	Zivildienst im Florence-Nightingale-Krankenhaus, Düsseldorf Station der Unfallchirurgie

<u>Schulausbildung:</u>

August 1999 – Juni 2008:	Max-Planck-Gymnasium, Düsseldorf Abschluss: Abitur (Note: 1,8)

August 1994 – Juli 1999:	St. Bruno Grundschule, Düsseldorf
Auslandsaufenthalte:	Schüleraustausch: Polen (Dauer: 2 Wochen) Venezuela (Dauer: 4 Wochen)
Fremdsprachenkenntnisse:	
Englisch:	fließend in Wort und Schrift
Spanisch:	Grundkenntnisse
Latein:	Großes Latinum