

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus dem Institut für Anatomie II:
Experimentelle Morphologie
(Direktor: Prof. Dr. med. Udo Schumacher)

des Zentrums für Experimentelle Medizin

Untersuchung zur Expression der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren S1P4 und S1P5 in Karzinom- und Melanom-Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Wojciech Bialecki aus Poznań

Hamburg 2012

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am 29.10.2012.

**Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
Hamburg**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. U. Schumacher

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. I. Moll

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. H.-E. Laack

**Widmung:
meiner Familie**

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Fragestellung und Zielsetzung.....	6
1.2 Sphingosin-1-Phosphat.....	7
1.2.1 Sphingosinrezeptoren.....	9
1.2.2 S1P4-Rezeptor.....	9
1.2.3 S1P5-Rezeptor.....	10
1.2.4 Signaltransduktion / Tumorentwicklung.....	11
2. Material und Methoden	12
2.1. Material und Probengewinnung	12
2.1.1 Humane Tumorzelllinien.....	12
2.1.2 In vitro-Versuch mit humanen Zelllinien (in Nährlösung kultiviert).....	13
2.1.3 In vivo-Versuch mit Tumoren (formalinfixiert und paraffineingebettet).....	13
2.1.4 RNA-Isolation.....	14
2.1.4.1 RNA-Isolation aus Zelllinien.....	14
2.1.4.2 RNA-Isolation aus in Paraffin eingebetteten Tumoren.....	15
2.1.4.3 RNA-Isolation aus Mausblut.....	16
2.1.4.4 Konzentrationsbestimmungen der isolierten RNA.....	16
2.1.5 cDNA-Synthese mittels Reverser Transkription.....	17
2.1.5.1 cDNA-Synthese aus der RNA der Zelllinien.....	18
2.1.5.2 cDNA-Synthese aus der RNA der in Paraffin eingebetteten Tumoren.....	19
2.1.6 Primer (hACT, S1P4, S1P5).....	20
2.2. Methoden	22
2.2.1 PCR-Produkt-Herstellung.....	22
2.2.1.1 Semi nested-PCR am Thermocycler.....	22
2.2.1.2 Real-time PCR am LightCycler / relative Quantifizierung.....	23
2.3. PCR-Produktkontrolle mittels Gelelektrophorese.....	25
2.4. Sequenzierung.....	26

3. Ergebnisse	27
3.1 Standardkurven.....	27
3.2 Graphische Darstellungen der PCR-Ergebnisse.....	27
3.2.1 PCR-Ergebnisse der Zelllinien in 20 µl- und 100 µl-Kapillaren (Vergleich).....	27
3.3 S1P4.....	29
3.3.1 S1P4 LightCycler Ergebnisse aus 20 µl-Kapillaren der Zelllinien.....	29
3.3.2 S1P4 LightCycler Ergebnisse aus 100 µl-Kapillaren der Zelllinien / Tumoren..	30
3.4 S1P5.....	31
3.4.1 S1P5 LightCycler Ergebnisse aus 20 µl-Kapillaren der Zelllinien.....	31
3.4.2 S1P5 LightCycler Ergebnisse aus 100 µl-Kapillaren der Zelllinien / Tumoren..	32
3.5 Gelelektrophorese-Ergebnisse.....	32
4. Diskussion	37
5. Zusammenfassung	41
6. Abkürzungsverzeichnis	42
7. Literaturverzeichnis	44
8. Danksagung	51
9. Lebenslauf	52
10. Eidesstattliche Erklärung	53

1. Einleitung

1.1 Fragestellung und Zielsetzung

Die Bedeutung von Sphingosin-1-Phosphat (S1P) als Botenstoff bei vielen zellspezifischen biologischen Reaktionen und Signalkaskaden wurde erst in letzter Zeit erkannt. Es ist entscheidend bei der Anti-Apoptose, Zellproliferation, Angiogeneseförderung, Organisation des Zytoskelettes, der Regulation des zellulären Ca^{2+} -Haushaltes sowie der Zellmigration beteiligt (Goetzl et al., 2004; Spiegel und Milstien, 2002; 2003). S1P agiert bei dem „*signaling*“ als ein intrazellulärer *second messenger* (Meyer zu Heringsdorf, 2003) und dessen Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bewirkt die Änderung der zellulären Prozesse (Pyne und Pyne, 2002; Meyer zu Heringsdorf und Jacobs, 2007). Studien aus den letzten Jahren zeigten, dass S1P bei der Tumorentstehung, -progression und -differenzierung (Ishii et al., 2004; Yamashita et al., 2006; Kawamori et al., 2006) sowie bei der Entstehung von Tumorresistenz gegenüber von Chemotherapeutika (Akao et al., 2006) beteiligt ist.

Die Zielsetzung dieser vorliegenden Arbeit war es, das Expressionsmuster der Sphingosinphosphatrezeptoren S1P4 und S1P5 auf der RNA-Ebene bei Melanom sowie Mamma- und Kolonkarzinomen zu untersuchen. Dabei sollten in Anlehnung an Untersuchungen zu den Sphingosinphosphatrezeptoren S1P1-3 sowie der LPA-Rezeptoren das Expressionsverhalten bei metastasierenden und nichtmetastasierenden Tumoren mittels RT-PCR studiert werden und die Expressionsbedeutung bei der Tumormetastasierung analysiert werden. Weiterhin sollte ein Vergleich der Anpassung der Expression von Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren bei in einer Nährlösung kultivierten Tumorzellen (in vitro) mit in immunodefiziente SCID-Mäusen xenotransplantierten Tumorzellen (in vivo) erfolgen. Frühere Untersuchungen wurden nur in vitro durchgeführt (Arikawa et al., 2003; Dolezalova et al., 2003; Yamashita et al., 2006; Balthasar et al., 2006). So liegt es bei dieser Arbeit nahe auch die in vivo Expression zu untersuchen, die ein Expressionsverhalten von S1P-Rezeptoren in einem lebenden Organismus beschreibt. Hierbei stellte sich die Frage, ob sich die mRNA-Expression von S1P4 und S1P5 in in vivo und in vitro gewachsenen humanen Tumorzellen unterscheidet. Weiterhin stellte sich die Frage, ob diese Expression von S1P4 und S1P5 mRNA mit der Metastasierung assoziiert werden kann.

1.2 Sphingosin-1-Phosphat

Das Lysophospholipid Sphingosin-1-Phosphat kommt ubiquitär im menschlichen Organismus vor. Es besteht aus dem langkettigen Aminoalkohol Sphingosin. Die OH-Gruppe ist mit einer Phosphorsäure verestert.

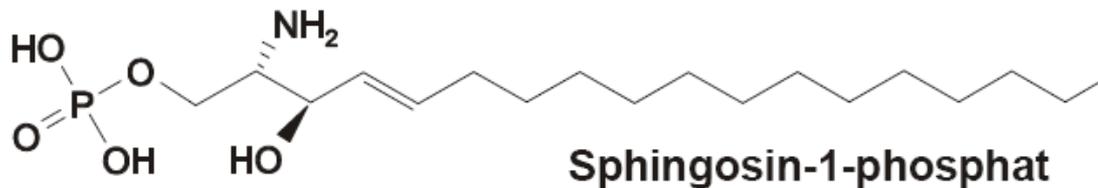


Abbildung 1: Sphingosin-1-Phosphat (nach Sanchez et al, 2003)

Die wichtige Rolle in der Signaltransduktion von S1P ist erst in den letzten Jahren erkannt worden. So ist S1P ein bedeutender Regulator vieler zellulärer Prozesse und ist entscheidend bei der Anti-Apoptose, Proliferation, Organisation des Zytoskelettes, Regulation des zellulären Ca^{2+} -Haushaltes sowie der Zellmigration beteiligt (Pyne und Pyne, 2000; Goetzl et al, 2004; Spiegel und Milstien, 2002; 2003). S1P fungiert als ein intrazellulärer *second messenger* (Meyer zu Heringsdorf, 2003; Payne et al. 2002) und wirkt durch Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Pyne und Pyne, 2002; Spiegel und Milstien, 2003). S1P kommt im Serum vorwiegend in an Albumin gebundener Form vor. Die Konzentration liegt bei bis zu 0,5 μM , wobei die Blutplasmakonzentration ungefähr die Hälfte misst (Yatomi et al., 1997). Ferner ist die Konzentration in lymphatischen und peripheren Geweben bedeutend geringer als im Blut. Die Bedeutung dieses Konzentrationsgradientes liegt in der Steuerung immunologischer Prozesse. Es sind hauptsächlich die aktivierten Thrombozyten, die S1P bilden und freisetzen (Yatomi et al., 1995). In geringeren Mengen wird S1P durch andere Zellen, wie z.B. durch Monozyten und Mastzellen, gebildet. Diese müssen von extrazellulären Faktoren wie Zytokinen oder Wachstumsfaktoren stimuliert werden und können so einen konstant bleibenden S1P-Blutspiegel gewährleisten (Yang et al., 1999).

S1P wird aus einem Ceramid gebildet. Dabei wird das Zwischenprodukt Sphingosin durch die Sphingosinkinase (SphK) phosphoryliert (Kohama et al., 1998). Grundsätzlich gibt es zwei Synthesewege von S1P. Entweder entsteht Sphingosin im Sphingolipidmetabolismus über eine de-novo Synthese des Ceramids aus Serin und Palmitoyl-CoA im endoplasmatischen Retikulum (Saba und Hla, 2004) oder durch Hydrolyse des Membranlipids Sphingomyelin mit Hilfe von Sphingomyelase (Spiegel und Merrill, 1996; Saba und Hla, 2004). Die Ceramidase katalysieren ferner die Umsetzung von Ceramid in Sphingosin. Weiter bildet die o. g. SphK durch eine Phosphorylierung das S1P. Von den SphK sind zur Zeit zwei Isoformen die SphK1 und SphK2 bekannt (Kohama et al., 1998). Der Abbau von S1P erfolgt durch eine Dephosphorylierung von S1P wieder zu Sphingosin. Dabei kann dieser Vorgang entweder durch die S1P-Phosphatasen oder Lipidphosphat-Phosphohydrolasen erfolgen (Pyne und Pyne, 2002; Mandala et al., 2000). Des Weiteren erfolgt der S1P-Abbau durch die S1P-Lyase, die eine irreversible und pyridoxalabhängige Spaltung der Bindung zwischen C2 und C3 katalysiert. Dabei entsteht Hexadecanal und Phosphoethanolamin (Oskouian und Saba, 2007). Die S1P-Lyase wird in nahezu allen Zellen und Geweben exprimiert. Eine Ausnahme bilden die Thrombozyten, die keine anderen S1P-abbauenden Enzyme besitzen. Dadurch akkumuliert sich S1P in den Thrombozyten und kann nach deren Aktivierung freigesetzt werden (Yatomi et al., 1995).

Der S1P-Haushalt ist streng reguliert und wird durch die Sphingosinkinase und die S1P-abbauenden Enzymen aufrechterhalten. Diese bestimmen das Verhältnis von Ceramid bzw. Sphingosin und S1P. Ein Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau von S1P befindet sich im gleichbleibenden Ruhezustand, wobei ein niedriger intrazellulärer Spiegel herrscht (Pyne und Pyne, 2000). Eine Variation dieser Verhältnisse ist entscheidend für die weitere Entwicklung einer Zelle. Eine höhere Konzentration von S1P als die von Ceramid und Sphingosin hat eine eher wachstumsfördernde sowie anti-apoptotische Wirkung. Im umgekehrten Falle hat das Ceramid eine eher wachstumshemmende und apoptosefördernde Wirkung (Cuvillier et al., 1996; Spiegel und Milstien, 2003). Aufgrund einer Aktivierung von SphK durch Überlebensfaktoren und Agonisten kann der S1P-Spiegel schnell und effizient ansteigen (Pitson et al., 2000), was das Zellwachstum stimuliert und die Apoptose inhibiert. So ist die SphK1 bei Tumoren hochreguliert und hat ein

onkogenes Potenzial (Edsall et al., 2001; Spiegel und Milstien, 2006; Kawamori et al., 2006). Weiter wurde in vielen menschlichen Tumoren ein erhöhter mRNA-Spiegel der SphK1 festgestellt (French et al., 2003).

1.2.1 S1P-Rezeptoren

Eine Vielzahl von Reaktionen und Signalwegen wird durch S1P vermittelt. Dies geschieht über membranständige und an heterotrimere G-Proteine gekoppelte Rezeptoren, wobei das S1P als Agonist fungiert. Die fünf spezifischen Zelloberflächenrezeptoren wurden ursprünglich als *endothelial differential gene* (EDG)-Rezeptoren-Familie bezeichnet (Goetzl und An, 1998; Pyne und Pyne, 2000; Hla, 2003). Der Name leitet sich von dem zuerst beschriebenen Familienmitglied dem EDG1-Rezeptor ab. Dieser wurde erstmals 1990 von den differenzierten Endothelzellen, wo er vermehrt in der Differenzierungsphase exprimiert wird, isoliert. Diese Endothelzellen differenzieren sich dann zu kapillarähnlichen Strukturen (Hla und Maciag, 1990). Die Familie der EDG-Rezeptoren besteht aus acht Rezeptorsubtypen. Die Rezeptoren EDG1, 3, 5, 6 und 8 fungieren als Rezeptoren für S1P. Der erste von ihnen wurde erst 1998 als ein S1P-Rezeptor identifiziert (Lee, 1998). Die Rezeptorsubtypen EDG2, 4 und 7 dienen der Lysophosphatidsäure (LPA) als Rezeptor (Chun et al., 2002). Nach der Empfehlung der „International Union Of Pharmacology“ (IUPHAR) werden die fünf S1P-spezifischen EDG-Rezeptoren als S1P1-5 bezeichnet. Sie sind strukturverwandt und werden spezifisch in unterschiedlichen Zellen und Geweben exprimiert.

1.2.2 S1P4 - Rezeptor

Die Bindungsaffinität des S1P4-Rezeptors zu S1P als Ligand ist hoch ($K_d = 13 - 63$ nM) (Ischi et al., 2004). Der Signalweg von S1P4 wird über G_i und $G_{12/13}$ vermittelt. Es bewirkt den intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg, die PLC (Phospholipase C) – Induktion und die Aktivierung des ERK/MAP (*extracellular signal regulated kinase / mitogen activated protein kinase*)-Weges (Van Brooklyn et al., 2000; Yamazaki et al., 2000) sowie die Aktivierung von der AC (Adenylatcyclase) (Anliker und Chun, 2004b). Die

S1P4–Rezeptoren werden in hämatopoetischen (Leukozyten) und lymphatischen (Thymus, Milz, Lymphknoten) Geweben (Anliker und Chun 2004a) sowie der Lunge (Gräler et al., 1998) exprimiert. Die Rezeptoren regulieren entscheidend viele immunologische Prozesse und wirken zytokinmodulierend. Diese kommen in durch S1P stimulierten T–Zellen vor. Dabei kommt es zur Reduzierung der INF γ -Synthese und zur verstärkten IL-10–Sekretion (Wang et al., 2005).

1.2.3 S1P5- Rezeptor

Der S1P5–Rezeptor wurde 1999 erstmals bei der Untersuchung eines Phäochromozytoms aus Ratten entdeckt (Glickman et al., 1999). Des Weiteren wurde es in Oligodendrozyten des Rattengehirns in größeren Mengen gefunden (Anliker und Chun 2004a). Die Bindungsaffinität des S1P5-Rezeptors zu S1P ist sehr hoch ($K_d = 2 \text{ nM}$) (Im et al., 2000). Der Signalweg von S1P5 wird über G_i und $G_{12/13}$ -vermittelt. Die S1P5-Rezeptoren werden überwiegend im Gehirn und der Milz jedoch auch in peripheren Geweben sowie in Leukozyten exprimiert (Im et al., 2000; Ishii et al., 2004). Die Serum-induzierte ERK–Aktivierung und die Akkumulation von cAMP werden durch S1P5 inhibiert. Damit wird die Zellproliferation auch inhibiert (Sanchez und Hla, 2004). Des Weiteren wird die AC gehemmt (Anliker und Chun, 2004b). Zurzeit ist jedoch nicht viel über die physiologische Bedeutung des S1P5-Rezeptors bekannt. Seine Stimulation durch S1P zeigt jedoch im Vergleich zu den vier anderen S1P-Rezeptorsubtypen gegensätzliche Effekte (Anliker und Chun 2004a). Es kommt zu einer Inhibierung des *mitogen activated proteinkinase* (MAP) - Signalweges und somit zu einer Hemmung des Zellwachstums (Malek et al., 2001).

1.2.4 Signaltransduktion / Tumorentwicklung

Die S1P-Rezeptoren sind an G-Proteine gekoppelt. Das G_i -Protein gehört der Pertussis-Toxin (PTX) – sensitiven Proteinfamilie an. Das $G_{12/13}$ – Protein gehört der PTX-insensitiven Proteinfamilie an. Diesen Rezeptoren sind unterschiedliche Signalkaskaden nachgeschaltet. Die S1P4- und S1P5-Rezeptoren sind an die G_i – und $G_{12/13}$ – Proteine gekoppelt (Pyne und Pyne, 2000). Die α -Untereinheit des G_i – Proteins leitet die Inhibition der Adenylatcyclase (AC) ein. Dies führt anschließend zu einer Senkung der intrazellulären cAMP-Konzentration sowie zu einer Hemmung der Proteinkinase A (PKA). Resultierend daraus kommt es zu gesteigerter Zellproliferation und -wachstum (Goodemote et al., 1995). Wiederum die $\beta\gamma$ -Untereinheit des G_i – Proteins leitet über das Ras-G-Protein die Aktivierung des *mitogen activated protein* Kinase (MAP) – Signalweges. Diese Kaskade stimuliert weiter die Transkriptionsfaktorenaktivität und ist dementsprechend auch für eine gesteigerte Zellproliferation und –wachstum sowie die Angiogenese verantwortlich (Spiegel und Merrill, 1996). Aus diesen Gründen besitzt das S1P ein onkogenes Potenzial. Außerdem besitzt das Ras-G-Protein durch die Stimulation der SphK auch ein onkogenes Potenzial (Xia et al., 2000). So wurde in Kolontumoren eine erhöhte SphK1-Expression festgestellt, was durch die Erhöhung der Cyclooxygenase COX2 - und der Prostaglandin E2 (PGE2) –Expression eine Tumorpheriferation unterstützt (Kawamori et al., 2006). S1P aktiviert den EGF (epidermalen Wachstumsfaktor) in Magenkrebszellen, wobei es zu einer Förderung des Tumors kommt (Yamashita et al., 2006). Dieses EGF wirkt ebenfalls in dem humanen Mammakarzinom MCF7 wachstumsfördernd sowie migratorisch durch die Sphk1-Aktivierung (Döll et al., 2005). In Prostataatumoren wurde eine erhöhte Aktivität der S1P-Signalkaskade festgestellt, wobei es auch zu einer reduzierten Wirkung von angewendeten Chemotherapeutika kam (Akao et al., 2006). In weiteren Arbeiten wurde gezeigt, dass S1P-Antikörper und SphK1-Inhibitoren die Angiogenese sowie den Tumorzellwachstum inhibieren und zusätzlich die Tumorzellenapoptose verstärken (Visentin et al., 2006; French et al., 2006).

2. Material und Methoden

2.1 Material und Probengewinnung

2.1.1 Humane Tumorzelllinien

Folgende Kolon-, Mammakarzinom- und Melanom- Zelllinien wurden zur Untersuchung verwendet:

Tabelle 1: Untersuchte Melanomzelllinien (nach Thies et al., 2007;2008)

Zelllinie	Tumoridentität	Herkunft	Anzahl der Tiere mit Metastasen
MV3	Malignes Melanom	Metastatischer Lymphknoten	8/10
LOX	Malignes Melanom	Metastatischer Lymphknoten	8/8
FEMX-I	Malignes Melanom	Metastatischer Lymphknoten	7/10
MeWo	Malignes Melanom	Metastatischer Lymphknoten	6/10

Tabelle 2: Untersuchte Kolon- und Mammakarzinomzelllinien (nach Schumacher und Adam, 1997)

Zelllinie	Tumoridentität	Herkunft	Anzahl der Tiere mit Metastasen
HT 29	Kolorektales Adenokarzinom	Primärtumor des Darms	9/9
HT 29 mdr	Kolonkarzinom		
SW 480	Kolonkarzinom		0/7
MCF 7	Mammakarzinom	Pleuraerguß	6/8
HBL 100	Mammakarzinom	Muttermilch	0/4

2.1.2 In vitro Versuch mit Zelllinien (in Nährlösung kultiviert)

Für den in vitro Versuch wurden die humanen Tumorzelllinien standardmäßig in einem RPMI 1640 Medium (mit L-Glutamin und 2g/l Glukose) in einem wasserdampf-gesättigten Inkubator bei 37°C und unter einer 5%igen CO₂-Atmosphäre kultiviert. Diesem Medium wurden zugesetzt: 10% fetales Kalbsserum (FCS; Invitrogen, Karlsruhe, Germany), 100 U/ml Penicillin und 10000 µg/ml Streptomycin. In der Phase der Subkonfluenz wurden die Zellen einmalig mit einer mit Phosphat gepufferten Kochsalzlösung (PBS; 50 mM Phosphat, 150 mM NaCl; pH 7.4) gewaschen. Die Passagierung der adhärenenten Kulturzellen wurde mittels Trypsinisierung durchgeführt. Nach dem Stoppen der Reaktion wurden die Zellen durch eine dreiminütige Zentrifugation (Hettich Zentrifugen, Universal 32 R, Tuttlingen, Deutschland) bei 1500 Upm als Pellet gesammelt. Danach erfolgte die Auflösung und die komplette RNA-Isolierung.

2.1.3 In vivo Versuch mit Tumoren (formalinfixiert und paraffineingebettet)

Für den in vivo Versuch wurden zuvor *severe combined immunodeficiency* (scid) Mäuse verwendet. Die scid Mäuse besitzen eine homozygote Mutation für das Prkdc (*protein kinase DNA activated catalytic polypeptide*) Gen (Bosma & Carroll, 1991). Hervorgehend aus dieser genetischen Mutation resultiert z.B. die Störung der zellulären DNA-Reparaturmechanismen. Dies führt dazu, dass die Entwicklung der T- und B-Lymphozyten im frühen Stadium stehen bleibt. Es kommt somit zu Immundefekten. Diese Tatsache wird wiederum für die Durchführung von Xenotransplantationsversuchen ausgenutzt.

Für den Vergleich der beiden Versuchsmodelle wurde entsprechend dem in vitro Versuch eine Auswahl an in scid Mäusen gewachsenen und in Paraffin eingebetteten Tumoren durchgeführt. Ursprünglich wurden den scid Mäusen lebensfähige, in 1 ml Kulturzellmedium aufgelöste, humane Tumorzelllinien (200 µl einer 5x10⁶ Zellen enthaltende Lösung) subkutan zwischen den Schultern injiziert. Die Tumoren wurden aus den tragenden Mäusen beim Erreichen der maximalen Größe (20% des

ursprünglichen Mausegewichtes) oder mit dem Beginnen der Ulzeration entnommen. Anknüpfend fand eine Metastasensuche statt. Die entnommenen Tumoren wurden zunächst gewogen, dann in Formalin fixiert sowie in Paraffin eingebettet.

2.1.4 RNA Isolation

Für die Durchführung der Isolation der RNA wurden für die RNA der in Nährlösung kultivierten Tumorzellen sowie der RNA aus den in Paraffin eingebetteten Tumorzellen zwei verschiedene RNA-Isolationskits der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) zur Anwendung benutzt. Beide Isolationskits funktionieren auf ähnlicher Basis. In beiden Verfahren werden zur Isolierung aus dem Zelllysat bzw. aus den Paraffinschnitten mehrere Wasch- und Eluationsvorgänge sowie Zentrifugationsschritte in speziellen Trenn- und Bindungssäulen mit unterschiedlichen Silica-Gelmembranen durchgeführt, wobei unterschiedliche Puffersysteme zur Anwendung gebracht werden. Die gesamte Isolationsprozedur wurde konstant bei Raumtemperatur vollzogen, wobei besonders auf eine schnelle Durchführung der Arbeitsschritte, ein hohes Maß an Sterilität sowie konstante Gewährleistung der RNase-Freiheit geachtet wurde. Sämtliche RNA wurde bei mindestens -20°C aufbewahrt und während der Weiterverarbeitung z.B. bei der Reversen Transkription auf Eis gestellt.

2.1.4.1 RNA-Isolation aus Zelllinien

Zur RNA-Isolierung aus den in Nährlösung kultivierten Tumorzelllinien wurde das „RNeasy Midi-Kit“ der Firma Qiagen herangezogen. Mittels dieses Kits kann ein zu bearbeitendes Ausgangsmaterial mit einer Minimalanzahl von 5×10^6 Zellen benutzt werden. Die im Midi-Kit mitgelieferten Säulen können limitierend maximal 1 mg RNA binden und müssen eine Mindestlänge von 200 Basen aufweisen, damit sie in der Säulenmembran zurückgehalten werden können. Folgend werden alle Ribonukleinsäuren von einer kleineren Länge als 200 Basen nicht erfasst und ausgewaschen. Dazu gehören rRNA, tRNA, 5sRNA. Durch diesen Vorgang kommt es zur erwünschten mRNA Anreicherung. Die gesammelten Tumorzellpellets wurden

mit 2 ml Lysispuffer aus dem RNeasy Midi Kit resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit einer Nadel (0,9 mm Durchmesser) durch fünffaches Durchziehen zerkleinert und homogenisiert. Weiter wurde zu der homogenisierten Suspension 2 ml 70%iger Ethanol beigemischt und in die mitgelieferten „RNeasy spin column“ überführt. Alle folgenden Wasch- und Zentrifugationsvorgänge wurden strikt nach den Anweisungen gemäß der Anleitung durchgeführt. Die Auswaschung der isolierten RNA aus der Säule erfolgte mittels mitgeliefertem RNase-freien Wasser. Die Eluation erfolgte zweimal.

2.1.4.2 RNA-Isolation aus in Paraffin eingebetteten Tumoren

Die Isolierung der RNA aus in Paraffin eingebetteten Tumoren erfolgte mittels dem „RNeasy FFPE (*formalin fixed, paraffin embedded*) Kit“ der Firma Qiagen. Dieses Kit ist dafür ausgelegt, ohne weitere Degradation den größten Teil der durch Formaldehyd verursachten Veränderungen an der RNA rückgängig zu machen. Zur RNA-Isolierung wurden 10 µm frisch geschnittene Paraffinschnitte eines eingebetteten Tumors benutzt. Der dazu verwendete Paraffinblock wurde in einen Mikrotom eingespannt und dessen Schneideklinge mit „RNase away“ (Molecular BioProducts, San Diego; CA, USA) gereinigt. Auch weitere für die Isolation benötigte Instrumentarien wurden stets mit der o. g. „RNase away“ gereinigt, um die mögliche Kontamination des Isolationsgutes zu vermindern. Es wurden je nach Größe des eingebetteten Tumors 8-10 Paraffinschnitte durchgeführt. Für die Herstellung der für die Untersuchung ausreichenden Menge an RNA, die ohne erhebliche Konzentrationsschwankungen versehen ist, wurden pro Tumor parallel drei Isolationsvorgänge durchgeführt. Anschließend wurde nach dem gesamten Isolationsvorgang die gewonnene RNA zusammengefügt und deren Konzentration bestimmt. Vor dem Setzen des ersten Paraffinschnittes wurde das überstehende oberflächige Paraffin mit einem „RNase away“ gesäubertem Skalpell entfernt und verworfen, was auch die mögliche Kontamination des Isolationsgutes vermindern sollte. Weiter wurden die acht folgenden Schnitte jeweils mit einer Pinzette in RNase freie 1,5 oder 2 ml Tubes befördert und verschlossen. Für das Auflösen des Paraffins wurde zunächst 1 ml Xylol-Ersatz zu den Schnitten pipettiert und anschließend 10 Sekunden gevortext. Anschließend wurden die Tubes bei höchster Geschwindigkeit

zentrifugiert (Hettich Zentrifugen, Universal 32 R, Tuttlingen, Deutschland), um den gesamten Xylol-Ersatz vom entstandenen Pellet abpipettieren zu können. Um den gesamten Rest des Xylol-Ersatzes zu extrahieren, wurde zu diesem Pellet dann 1 ml Ethanol (100%) hinzugeführt und zentrifugiert. Nach dem exakten Durchführen aller Schritte des Herstellerprotokolls wurde die in der Membran der Säule gebundene RNA mit dem mitgelieferten RNase freien Wasser eluiert. Diese Eluation erfolgte in zwei aufeinanderfolgenden Schritten. Dabei wurden jeweils 15 µl von dem Wasser pipettiert, ohne dabei die Membran zu berühren und eine Minute lang bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert. Dieses führte zu einer insgesamt höheren Ausbeute. Am Ende wurde das Isolationsgut aus den jeweils pro Paraffinblock parallel durchgeführten Chargen zusammengeführt und somit eine 90 µl große Lösung mit RNA erzielt.

2.1.4.3 RNA-Isolation aus Mausblut

Zur Isolation der RNA aus Mausblut wurde das „QIAmp RNA Blood Mini Kit“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) verwendet. Dazu wurden zwei Mäuse aus der hauseigenen Tierhaltung des UKEs sediert und deren Blut direkt aus dem Herzen oder retroorbital entnommen. Aus dem gewonnenen Blut wurde strikt nach den Angaben des Herstellers RNA extrahiert. Dabei wurde nach vorheriger Lyse der Erythrozyten RNA aus den Leukozyten isoliert.

2.1.4.4 Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA

Die Konzentration der isolierten RNA wurde mit der photospektrometrischen Methode bestimmt. Dabei wurde in der Photometerzelle (Quartz Photospectrometer Cell, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) des Photospectrometers („Smart Spec 2000™“, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) jeweils 100 µl Probelösung eingesetzt. Für einen sparsamen Umgang mit dem Probengut wurde die zu bestimmende Proben-Lösung mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt (10 µl RNA / 90 µl H₂O). Bevor die Konzentrationsbestimmung der RNA begonnen wurde, wurde der Photospectrometer mit reinem destilliertem Wasser geeicht.

Die anschließenden Messungen erfolgten bei Wellenlängen von 260 nm, 280 nm und 320 nm. Das Gerät nutzt die jeweilige Absorption des Lichtes und ermittelt einen Konzentrationswert in µg/ml. Diese müssen durch die zuvor vorgenommene Konzentrationsverdünnung um den Faktor 10 korrigiert werden um die Verdünnung auszugleichen.

2.1.5 cDNA-Synthese mittels reverser Transkription

Die Synthese der cDNA (complementary DNA) aus der RNA von kultivierten Zelllinien und in Paraffin eingebetteten Tumoren erfolgte mithilfe der Reversen Transkriptase. Dieses Enzym ist eine RNA abhängige DNA-Polymerase. Hier wurde aus der isolierten mRNA cDNA gewonnen. Diese wird als Produkt für die folgenden PCRs benutzt. Bei der Synthese wurde das „First Strand Transcriptor cDNA Synthesis Kit“ der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) verwendet. Die Reverse Transkriptase benötigt für das Starten ihrer Aktivität einen Primer. In dem Synthese-Kit sind zwei verschiedene Primer mitgeliefert: ein spezifisch bindender Primer der Anchored-oligo(dT)₁₈ Primer und der unspezifisch bindende Primer der Random Hexamer Primer. Letzterer besteht aus sechs zufällig zusammengesetzten Nukleotiden und bindet unspezifisch an der mRNA. Dabei wird eine gewissermaßen gleichmäßige Synthese aller RNA-Sequenzen erreicht. Jedoch wird der Poly-A-Schwanz hierbei nicht mitsynthetisiert. Mit diesem Primer lässt sich besonders die schon mittlerweile degradierte mRNA ausreichend synthetisieren. Deshalb wird dieser bei der RNA von eingebetteten Tumoren eingesetzt. Der spezifisch bindende Anchored-oligo(dT)₁₈ Primer wird bei der nichtdegradierten Zelllinien-RNA eingesetzt. Dieser bindet komplementär an den Poly-A-Schwanz der mRNA. Somit wird die komplette Synthese nichtdegradiertes mRNA ermöglicht. Mit dem Random Hexamer Primern erhält man jedoch nicht die vollständige cDNA sondern nur viele Fragmente. Vor der eigentlichen Synthese wurde zunächst ein cDNA-Verdau durchgeführt um mögliche sich in der RNA-Lösung befindende cDNA zu eliminieren.

2.1.5.1 cDNA - Synthese aus der RNA der Zelllinien

Für die cDNA-Synthese aus kultivierten Zelllinien wurde der spezifisch bindende Anchored-oligo(dT)₁₈ Primer des „First Strand Transcriptor cDNA Synthesis Kit“ der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) benutzt. Hierbei wurde besonders darauf geachtet, dass stets die gleiche Menge an RNA eingesetzt wurde. Die Menge betrug jeweils 1500 ng, sodass eine Ermittlung der einzusetzenden RNA Menge zuvor durchgeführt wurde. Die bei der Konzentrationsbestimmung angefallenen Mengewerte wurden durch 1500 dividiert, um die gewünschte RNA-Menge in µl zu ermitteln. Ferner wurde je nach Anzahl der Proben ein Mastermix für den cDNA-Verdau und danach ein weiterer Mastermix für die eigentliche Synthese hergestellt und laut der Bedienungsanleitung vorgegangen. Dabei wurde extrahierte RNA abhängig von der Konzentration mit Water, PCR grade auf die gewünschte Menge verdünnt. Für den cDNA-Verdau und die anschließende cDNA-Synthese wurde ein Thermocycler (Personal Cycler, Biometra, Göttingen, Deutschland) benutzt. Beim cDNA-Verdau erfolgte zunächst eine Inkubation des Gemisches für die Dauer von 30 Minuten bei 25°C im Thermocycler. Danach erfolgte die Inaktivierung der DNase für die Dauer von 5 Minuten bei 75°C.

Tabelle 3: Pipettierschema des cDNA-Verdau-Ansatzes für fünf Proben

cDNA-Puffer	5,0 µl
RNA	44 µl (verdünnte RNA)
Water, PCR-grade	
DNase (DNaseI, RNase-free)	1,0 µl

Für die eigentliche cDNA-Synthese wurde ein Mastermix erstellt, wobei pro Probe zunächst 10 µl von der verdauten RNA mit dem Primer vermischt wurden. Diese wurde im Thermocycler 10 Minuten lang bei 65°C denaturiert. Anschließend wurden die restlichen Agenzien hinzugefügt und im Thermocycler 30 Minuten bei 55°C inkubiert.

Tabelle 4: Pipetierschema des cDNA-Synthese-Ansatzes

RNA (verdaut)	10 µl
Anchored-oligo(dT) ₁₈ Primer	1,0 µl
Water, PCR grade	2,0 µl
Denaturierung im Thermocycler (10 min. bei 65°C)	
cDNA-Puffer	4,0 µl
Inhibitor	0,5 µl
dNTP`s	2,0 µl
Reverse Transcriptase bei pos. Probe	0,5 µl

2.1.5.2 cDNA-Synthese aus der RNA der in Paraffin eingebetteten Tumoren

Die cDNA-Synthese aus eingebetteten Tumoren benötigt wie oben beschrieben als einen unspezifisch bindenden Primer den Random Hexamer Primer des „First Strand Transcriptor cDNA Synthesis Kit“ der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland). Die durch die Fixierung der Tumoren degradierte (nekrotisierte) RNA ergibt bei der cDNA-Synthese eine geringere Ausbeute als die RNA der Zelllinien. Deshalb wurde jeweils die Höchstmenge (unverdünnt) der benötigten RNA bei der Synthese eingesetzt, um effizientere Ergebnisse bei der nachfolgenden real-time PCR zu erzielen. Die Vorgehensweise ist fast identisch wie bei der RNA aus Zelllinien.

Tabelle 5: Pipettierschema des cDNA-Verdau-Ansatzes

cDNA-Puffer	5,0 µl
RNA (unverdünnt)	44 µl
DNase (DNaseI, RNase-free)	1,0 µl

Tabelle 6: Pipettierschema des cDNA-Synthese-Ansatzes

RNA (verdaut)	10 µl
Random Hexamer Primer	2,0 µl
Water, PCR grade	1,0 µl
Denaturierung im Thermocycler (10 min. bei 65°C)	
cDNA-Puffer	4,0 µl
Inhibitor	0,5 µl
dNTP`s	2,0 µl
Reverse Transkriptase bei pos. Probe	0,5 µl

2.1.6 Primer (hACT, S1P4, S1P5)

Alle benutzten Primer sind mittels der Internetseite der Gendatenbank des National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) ausgesucht worden. Alle Primerpaare wurden von der Firma MWG-BIOTECH AG (Ebersberg, Deutschland) hergestellt. Bei der Selektion der Primer wurde ein besonderes Augenmerk darauf gelegt, dass diese auf mindestens zwei verschiedenen Exons liegen. Dadurch soll gewährleistet werden, dass es aufgrund der Produktlänge eine Verwechslung von amplifizierter cDNA mit einer versehentlich amplifizierten genomischen DNA nicht zustande kommt. Weiter wurde auf relativ dicht beieinander liegende Schmelzpunkte eines Primerpaares geachtet. Die Primer wurden in einer Konzentration von 100 pmol / µl eingesetzt.

Die 5`-3`-Primer wurden „Forward-Primer“ und die 3`-5`-Primer wurden als „Reverse-Primer“ genannt. Bei der „semi-nested PCR“ wurde zunächst durch den „Forward a-Primer“ ein längeres Amplifikat gebildet, woraus im zweiten Schritt durch den „Forward-Primer“ das benötigte Produkt gebildet wurde. In beiden Schritten wurde der „Reverse-Primer“ benutzt.

Tabelle 7: Primer des humanen Actin (laut MWG-BIOTECH AG)

hACT	Primersequenz	T _m (Schmelzpunkt)	Produktgröße (bp)
forward a	5`-AGA AAA TCT GGC ACC ACA CC-3`	57,3°C	190
Forward	5`-CCA ACC GCG AGA AGA TGA-3`	56,0°C	97
Reverse	5`-CCA GAG GCG TAC AGG GAT AG-3`	61,4°C	-

Tabelle 8: Primer des S1P4 (laut MWG-BIOTECH AG)

S1P4	Primersequenz	T _m (Schmelzpunkt)	Produktgröße (bp)
forward a	5`-AAA TGG GCT TCC CAT GGT CAC C-3`	62,1°C	220
Forward	5`-GAG AGC ACC CTG GTG TGG-3`	60,5°C	158
Reverse	5`-CAT GAT CGA ACT TCA ATG TTG C-3`	56,5°C	-

Tabelle 9: Primer des S1P5 (laut MWG-BIOTECH AG)

S1P5	Primersequenz	T _m (Schmelzpunkt)	Produktgröße (bp)
forward a	5`- ACT CTG GTA TCA GAA CCG-3`	53,7°C	219
Forward	5`-CCA CGA CTG TCT TCC CAA GT-3`	56,7°C	179
Reverse	5`-CAA GCA GAA CGT CAA TTC CA-3`	55,9°C	-

Die Primerpaare des humanen Actins und des Sphingosin-1-Phosphates wurden alle an Maus-cDNA getestet und gegenkontrolliert.

2.2 Methoden

2.2.1 PCR-Produkt-Herstellung

2.2.1.1 Semi nested-PCR am Thermocycler

Die Semi nested PCR (Polymerase Chain Reaction) wurde mit dünnwandigen PCR-Tubes am Thermocycler der Firma Biometra (Personal Cycler, Biometra, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Für die PCR wurde das „Taq PCR Core Kit 1000 Units“ der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) benutzt und entsprechend der Bedienungsanleitung vorgegangen. Für die Herstellung der Semi nested PCR-Produkte der jeweiligen Gene wurden die Vorwärts a-Primer (forw a) und die Rückwärts-Primer (rev) laut Tabellen 7 bis 9 verwendet, wobei ein von der Vorwärtsseite längeres Produkt (seminested) vervielfältigt wurde. Diese Produkte wurden für die anschließende Real-time PCR eingesetzt, wobei sie für die Standardkurvenerstellung und die jeweiligen PCR-Läufe benutzt wurden.

Für die Qualitätskontrolle und die Durchführung der späteren relativen Quantifizierung wurde als „Housekeeping-Gen“ (HKG, Referenzgen) das ubiquitär vorhandene und von jeder Zelle in jedem Zellzyklus gleichhoch homogen exprimierte menschliche β -Actin (hAct) eingesetzt. Dieses musste in einem jeden gelungenen PCR-Lauf amplifiziert worden sein.

Tabelle 10: Pipettierschema des Semi nested PCR-Ansatzes

Water, PCR grade	15,3 μ l
PCR-Puffer (10x)	2,0 μ l
dNTP`s	0,4 μ l
Forw. a Primer	0,1 μ l
Rev. Primer	0,1 μ l
Taq-Polymerase	0,1 μ l
Ad 18 μ l PCR-Ansatz wird 2 μ l cDNA pro Tube eingesetzt.	

Tabelle 11: Semi nested PCR-Programm (40 Zyklen pro Lauf)

1. Denaturierung	30 sec. / 94°C
2. Annealing	30 sec. / 52°C (hACT / S1P4 / S1P5)
3. Amplifikation	60 sec. / 72°C

2.2.1.2 Real - time PCR am LightCycler / relative Quantifizierung

Die Real-time PCR (RTQ-PCR / realtime-quantitative Polymerase-Chain-Reaction) erfolgte am LightCycler 2.0 Gerät (LightCycler 2.0 Instrument, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) in Glaskapillaren (LightCycler Capillaries, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland).

Die RT-PCR mit cDNA-Proben aus Zelllinien wurden in 20 µl- sowie 100 µl-Kapillaren als Reaktionsmischgefäße mit einem optimalen optischen sowie thermischen Oberflächen-Volumen-Verhältnis durchgeführt. Die RT-PCR der cDNA-Proben aus paraffineingebetteten Tumoren verlief stets in 100 µl-Kapillaren. Diese cDNA wurde jeweils 1:10 verdünnt eingesetzt. Zur PCR-Ansatzherstellung wurde das „LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit“ der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) verwendet. Dieser LC-Mix enthält die FastStart Taq DNA-Polymerase, MgCl₂ (Endkonzentration von 1mM), einen Nukleotidmix sowie SYBR Green I als unspezifischen Cyanin-Fluoreszenzfarbstoff. Diese FastStart Taq-Polymerase ist bei Raumtemperatur durch Bindungen an spezifische Aminosäuren funktionsunfähig und entwickelt ihre Arbeitsweise bei höheren Temperaturen, sodass das Reaktionsgemisch zunächst für 5-10 Minuten bei 95°C zur Polymeraseaktivierung inkubieren muss bevor die Reaktion startet. Dadurch werden Fehlelongationen während der Zubereitung nach Zugabe von Primern verhindert.

Für alle drei Primerpaare (hACT, S1P4, S1P5) wurde eine Annealingtemperatur von 62°C verwendet. Die Glaskapillaren wurden mittels einer Pipette der Firma Eppendorf (Eppendorf Research Plus, Hamburg, Deutschland) mit dem Reaktionsgemisch befüllt, verschlossen, zentrifugiert und in einem Karussell des LightCyclers platziert. Danach erfolgte die Amplifikation mit der Fluoreszenzbestimmung. Die Auswertung und die Ermittlung der

Reaktionsbedingungen der RTQ-PCR sowie die relative Quantifizierung der PCR-Produkt-Laufergebnisse wurden am angeschlossenen PC mittels der LightCycler Software 4.0 durchgeführt. Für die Berechnung der für die relative Quantifizierung benötigten Standardkurvenerstellung wurde für jedes eingesetzte Gen mittels der semi nested PCR eine Verdünnungsreihe von 10^{-3} bis 10^{-10} der angewendeten Proben hergestellt und eine PCR-Effizienz errechnet. Dabei wurden am Thermocycler etablierte Kalibratoren für das jeweilige Gen entsprechend verdünnt benutzt. Die Verdünnungsreihen wurden für jedes Primerpaar doppelt und unter optimalem PCR-Protokoll bestimmt.

Wegen der großen Sensibilität des LightCyclers auf Kontamination wurde dieser in einen separaten Raum platziert. Dadurch sollte die Kontaminationsgefahr der Reagenzien mit DNA/RNA-Templates minimiert werden. Zusätzlich wurden zur Kontaminationsabwendung die Arbeitsfläche und die Gebrauchsutensilien mit 70%igem Ethanol gründlich gereinigt.

Alle Primerpaare wurden auf die humane Spezifität getestet.

Tabelle 12: Pipettierschema des RT-PCR-Ansatzes

Bestandteile / Volumen	20 µl	50 µl
Vorwärts-Primer	0,4 µl	0,25 µl
Rückwärts-Primer	0,4 µl	0,25 µl
FastStart DNA Master SYBR Green I	4,0 µl	10,0 µl
Water, PCR grade	13,2 µl	28,0 µl
ad Master-Mix / Tube eingesetzte cDNA	2,0 µl	10,0 µl (1:10 verdünnt)

Tabelle 13: RT-PCR-Programm (50 Zyklen / Lauf)

Programm		20 µl	50 µl
Denaturierung		10 min / 95°C	10 min / 95°C
Amplifikation	Denaturierung	5 sec / 95°C	15 sec / 95°C
	Annealing	5 sec / 62°C	15 sec / 62°C
	Amplifikation	12 sec / 72°C	25 sec / 72°C
Schmelzkurve		Kontinuierlich von 65°C-95°C (0,1°C/s)	

2.3 PCR-Produktkontrolle mittels Gelelektrophorese

Die PCR-Produktkontrolle der am Thermocycler und LightCycler durchgeführten Läufe wurde mittels einer 3%igen Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Indikation hierfür bot sich nach jedem Thermocyclerlauf, nach dem Einsatz von mehrmals aufgetauten cDNA-Proben und zur Veranschaulichung der Etablierung eines PCR-Protokolls jeweils für einzelne Primerpaare (Thermocycler und LightCycler) sowie als Kontrolle bei verdächtig erscheinenden Schmelzkurvenanalysen (z.B. zu breite oder mehrere Peaks).

Die Gelherstellung erfolgte durch das Zusammenfügen von 1,5 g Seakem LE Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland) mit 50 ml vom einfach konzentrierten TBE-Puffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in einem Erlenmeyerkolben und deren zweiminütiger Erwärmung in einer Mikrowelle. Anschließend wurde unter dem Abzug nach dem Abkühlen bis ca. 60°C zur Anfärbung der doppelsträngigen DNA 2 µl Ethidiumbromid (Promega Catalys AG, Wallisellen, Schweiz) hinzupipettiert und vermischt.

In die Taschen (Slots) des Agarose-Gels, die durch einen Kamm vor dem Erhärten des Gels geschaffen wurden, wurden jeweils 15 µl eines Gemisches von 3 µl Loading-Buffer, 9 µl destilliertes Wasser und 3 µl PCR-Produkt hineinpipettiert. Zur Produktgrößenzuordnung wurde pro Reihe im Gel an erster Stelle ein 100 Basenpaar DNA-Marker (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) anstatt des PCR-Produktes eingesetzt. Folgend wurde das Gel bei einer Spannung von 120 V für ca. 40-50 Minuten in einem Trafogerät (Consort Electrophoresis Power Supply, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) laufen gelassen, wobei die DNA im Agarose-Gel nach ihrer Größe aufgeteilt wurde.

Anschließend an das Durchlaufen wurde das Gel bei einer Lichtwellenlänge von 302 nm im Bildgebungssystem (Universal Hood White Light Transilluminator, BioRad, Segrate, Italien) fotografiert. Die digitale Darstellung am PC erfolgte durch die Quantity One 1-D Software (BioRad).

2.4. Sequenzierung

Die Sequenzierung der PCR-Produkte wurde im Institut für Pathologie, Direktor Prof. Dr. med. G. Sauter, am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Das Ergebnis der erfolgten Sequenzierung ergab die Bestätigung der PCR-Produkte.

3. Ergebnisse

3.1. Standardkurven

Für jedes Gen wurde eine Standardkurve erstellt. Die Effizienz der verwendeten Primerpaare schwankte zwischen 1,881 bis 1,962.

3.2. Graphische Darstellungen der PCR-Ergebnisse

Die graphischen Darstellungen der S1P4- sowie S1P5-Rezeptoren werden ohne Einheiten dargestellt, da es sich wie oben erwähnt um Ergebnisse einer relativen Quantifizierung handelt. Die PCR-Ergebnisgraphiken der relativen Quantifizierung der jeweiligen Gene wurden mit der GraphPad-Software (GraphPad Software, Inc, San Diego, Kalifornien, USA) erstellt. Zur Graphikerstellung für ein jedes Gen wurden aus jeweils drei Chargen in Doppelbestimmung des zu untersuchenden Tumors (in vivo- und in vitro-Versuch) die entsprechenden RTQ-PCR-Ergebnisse benutzt. Der in vitro Versuch mit in Nährlösung kultivierten Zelllinien der Gene für S1P4- und S1P5-Rezeptoren erfolgte in jeweils 20 µl- und 100 µl-Glaskapillaren. Der in vivo Versuch mit in Paraffin eingebetteten Tumoren konnte für beide Gene nicht in 20 µl-Glaskapillaren etabliert werden und erfolgte nur in 100 µl-Glaskapillaren. Der Tumor LOX stand bei dieser Arbeit in Paraffin eingebettet nicht zur Verfügung.

3.2.1 PCR-Ergebnisse der Zelllinien in den 20 µl- und 100 µl-Kapillaren (Vergleich)

Die Expressionsergebnisse der beiden Rezeptorgene in den 20 µl- und 100 µl-Glaskapillaren bestätigen sich weitestgehend gegenseitig.

Bei dem Vergleich der beiden Glaskapillargrößenergebnisse mit dem S1P4-Rezeptorgen kommt es sowohl beim Mammakarzinom HBL100 als auch beim malignen Melanom FEMX-1 zu einer vergleichsweise höheren Expression der

Zelllinien. Die übrigen Zelllinien weisen im Vergleich zu den zwei oben genannten (HBL100 und FEMX-1) eine geringe oder keine Expression auf, wobei die an der Nachweisgrenze bestehenden Expressionen zwischen den beiden Glaskapillarengrößen minimal schwanken.

Ebenso fällt der Vergleich der beiden Glaskapillargrößenergebnisse mit dem S1P5-Rezeptorgen bestätigend aus. Bei diesem Gen ist eine Expression im Vergleich zu den übrigen Zelllinien in beiden Glaskapillarengrößen ausgeprägt. Lediglich zeigt sich ein Unterschied in den 20 µl-Glaskapillaren bei dem Kolonkarzinom HT29 mdr, wobei in den kleineren Glaskapillaren eine geringe Expression zu erkennen ist. Zusätzlich erweist die Tumorzelllinie des malignen Melanoms LOX eine Expression. Die übrigen Zelllinien weisen in beiden Glaskapillarengrößen keine nachweisbare Expression auf.

3.3. S1P4- Ergebnisse

3.3.1 S1P4 LightCycler Ergebnisse aus 20 µl-Kapillaren der Zelllinien

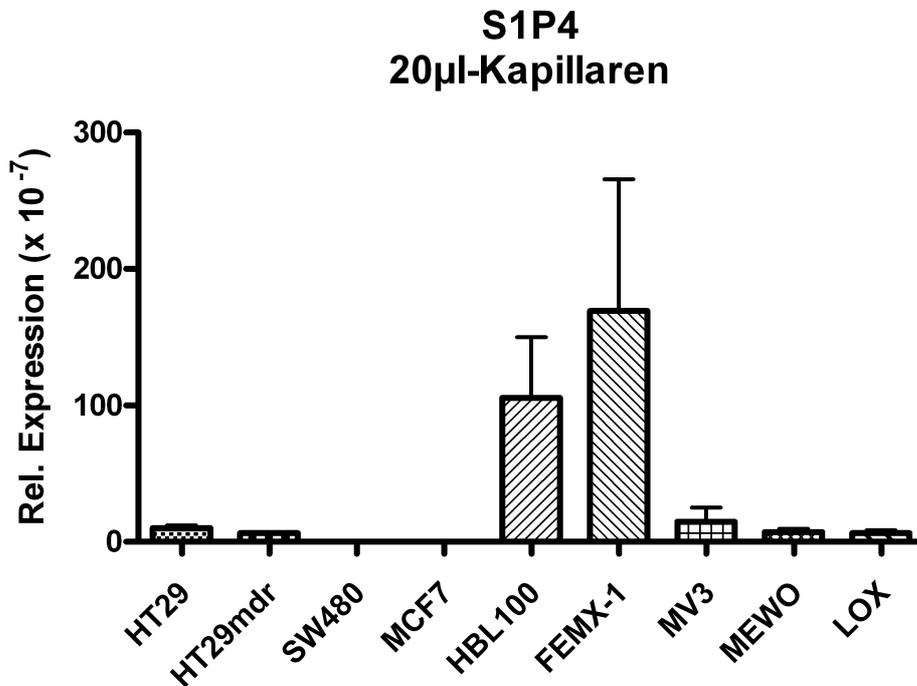


Abbildung 2: PCR-Ergebnisse der relativen Quantifizierung der kultivierten Zelllinien in 20 µl-Kapillaren von dem Rezeptorgen S1P4

Die Expression der S1P4-Rezeptoren bei den Zelllinien in den 20 µl-Glaskapillaren ist verschwindend gering. Lediglich bei den Mammakarzinomzelllinie HBL 100 sowie der malignen Melanomzelllinie FEMX-1 ist eine vergleichsweise höhere Expression ersichtlich. Jedoch ist bei diesen die Standardabweichung ebenso höher.

3.3.2 S1P4 LightCycler Ergebnisse aus 100 µl- Kapillaren der Zelllinien und Tumoren

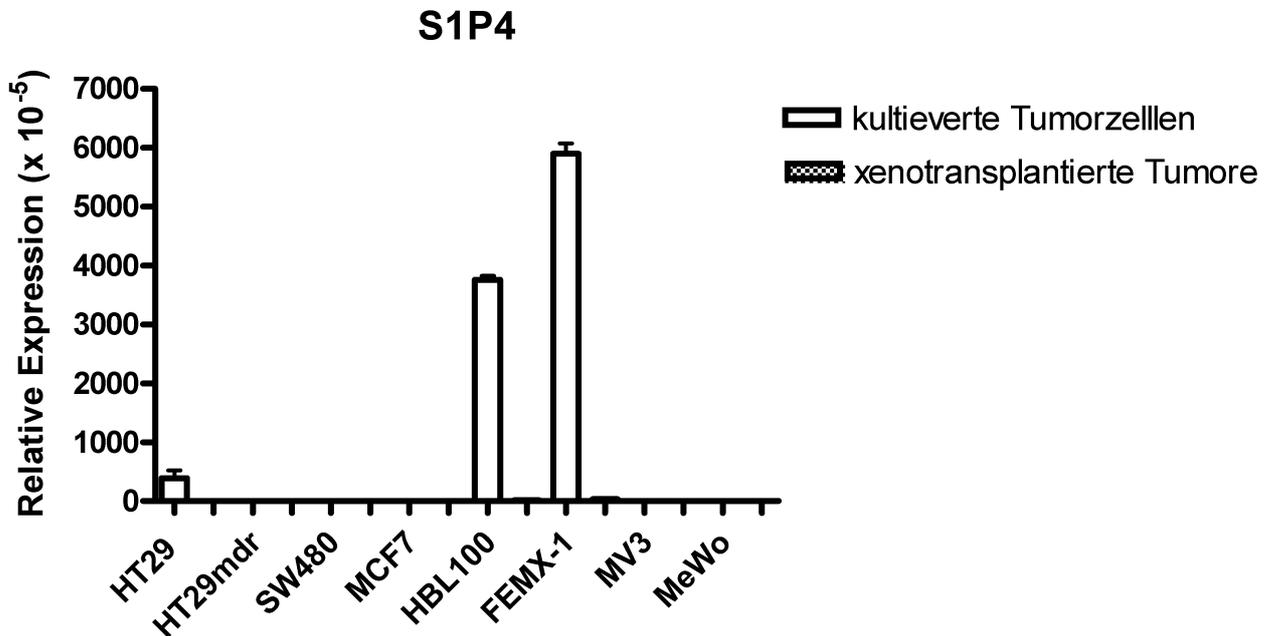


Abbildung 3: PCR-Ergebnisse der relativen Quantifizierung der kultivierten Zelllinien (weiße Balken) und der im Paraffin eingebetteten Tumoren (schraffierte Balken) in 100 µl-Kapillaren von dem Rezeptorgen S1P4.

Die Ergebnisse der Expression der S1P4-Rezeptoren der Zelllinien sowie Tumoren in den 100 µl-Kapillaren weisen ebenso überwiegend keine bzw. verschwindend geringe Expression auf. Die in vivo gewachsenen Tumoren zeigen keine Expression der Rezeptoren. Lediglich bei den Zelllinien des Mammakarzinoms HBL 100 und des malignen Melanoms FEMX-1 ist eine höhere Expression analog zu den 20 µl-Kapillaren zu beobachten, wenn diese in vitro gezüchtet worden waren. Die Kolonkarzinom-Zelllinie HT29 weist eine geringe mRNA Rezeptor-Expression auf.

3.4. S1P5-Ergebnisse

3.4.1 S1P5 LightCycler Ergebnisse aus 20 µl-Kapillaren der Zelllinien

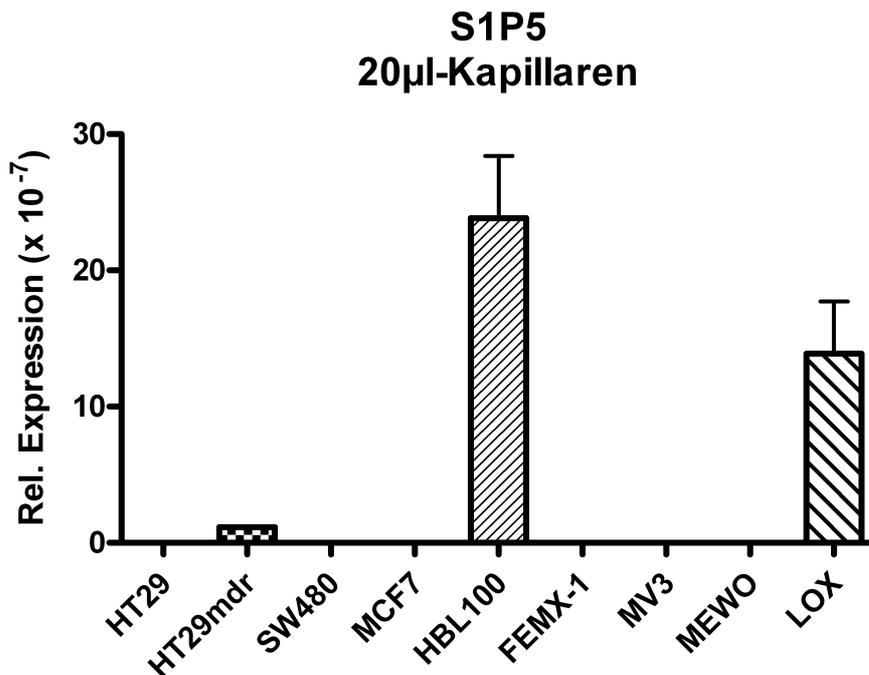


Abbildung 4: PCR-Ergebnisse der relativen Quantifizierung der kultivierten Zelllinien in 20 µl-Kapillaren von dem Rezeptorgen S1P5

Die Ergebnisse der S1P5-Rezeptorexpression der Zelllinien in den 20 µl-Glaskapillaren zeigen ebenfalls keine bzw. verschwindend geringe Expression auf. Die Zelllinien des Mammakarzinoms HBL 100 sowie des malignen Melanoms LOX weisen eine vergleichsweise höhere Expression auf. Ebenso wird die mRNA des S1P5-Rezeptors geringfügig bei der Kolonkarzinomzelllinie HT29 mdr exprimiert.

3.4.2 S1P5 LightCycler Ergebnisse aus 100 µl- Kapillaren der Zelllinien und Tumoren

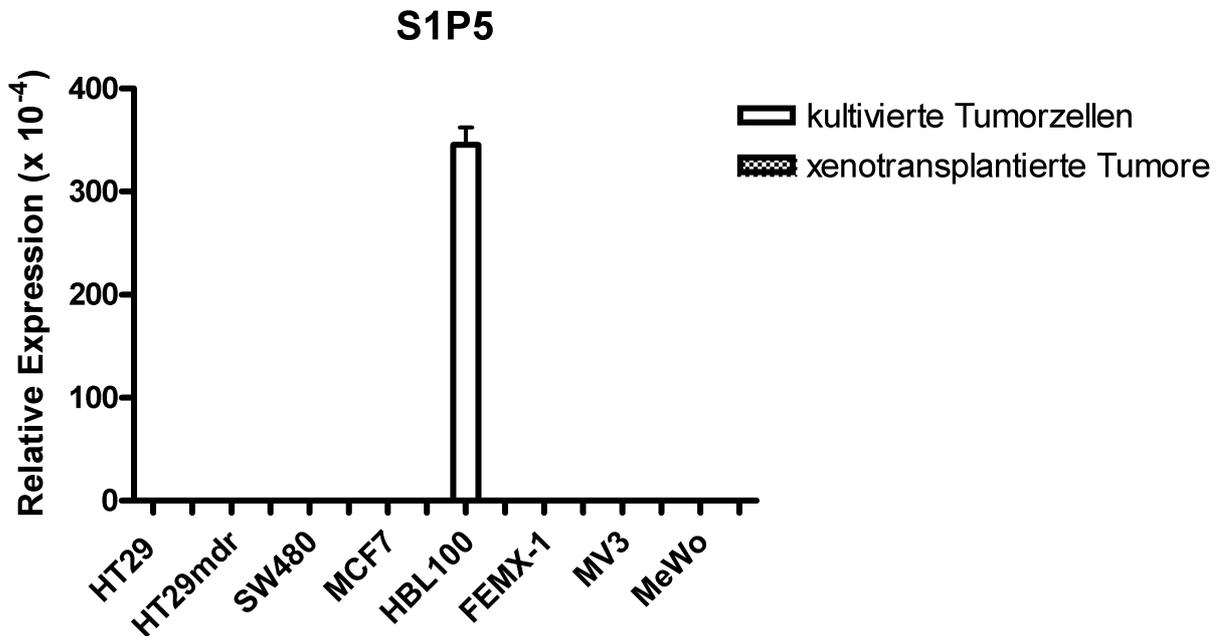


Abbildung 5: PCR-Ergebnisse der relativen Quantifizierung der kultivierten Zelllinien (weiße Balken) und der im Paraffin eingebetteten Tumoren (schraffierte Balken) in 100 µl-Kapillaren von dem Rezeptorgen S1P5

Eine Expression der S1P5-Rezeptoren in den 100 µl-Glaskapillaren kann weder bei Tumoren noch bei Zelllinien beobachtet werden. Eine Ausnahme bildet hier im in vitro Versuch die Mammakarzinom-Zelllinie HBL100, bei der eine gewisse Expression ersichtlich ist.

3.5. Gelelektrophorese-Ergebnisse

Folgend werden beispielweise zwei Gele von jeweils unterschiedlichem Gen gezeigt, die dem PCR-Produktnachweis dienen. In der jeweils ersten Gelspalte wird der 100-Bp-Marker dargestellt. Darauf folgende Gelspalten zeigen jeweils eine Positiv- und Negativ-Kontrolle und zusätzlich wird immer an letzter Stelle eine Wasserkontrolle aufgeführt. Die Indikation für eine Agarose-Gelherstellung war gegeben bei der Anwendung von mehrmals aufgetauten cDNA-Proben, bei der Etablierung eines

PCR-Programms der jeweils eingesetzten Primerpaare im Thermocycler und LightCycler sowie bei verdächtig erscheinenden Schmelzkurvenanalysen.

S1P4

A B C D E F G H I

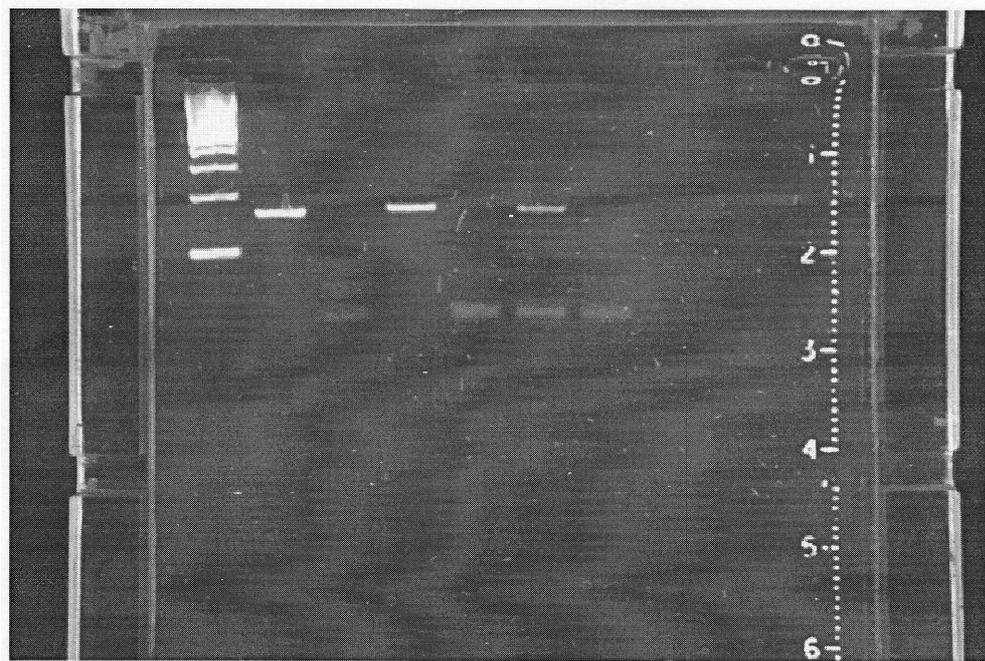


Abbildung 6: Gel zur PCR-Produktkontrolle des Gens S1P4

A= 100 Bp DNA-Marker

B= Mel 6 1:10 verdünnt, Positivkontrolle

C= Mel 6 1:10 verdünnt, Negativkontrolle

D= Mel 6 1:100 verdünnt, Positivkontrolle

E= Mel 6 1:100 verdünnt, Negativkontrolle

F= Mel 6 1:1000 verdünnt, Positivkontrolle

G= Mel 6 1:1000 verdünnt, Negativkontrolle

H= Wasserkontrolle

I= Wasserkontrolle

In der Abbildung 6 ist ein Gel zur PCR-Produktkontrolle dargestellt, das zugleich der PCR-Programmetablierung dient. In den Positivkontrollen des Probengutes sollten klare Banden in der Höhe der gewünschten Größenposition der PCR-Produkte zu erkennen sein, wobei die Gelspalten mit den Negativkontrollen sowie den Wasserkontrollen frei von Banden sein sollten. Hierbei wurden die Primer forw. a und rev. des S1P4-Gens bei der Mel 6 Zelllinie (Melanom mit Virusbefall, welches aus Sicherheitsgründen nicht weiter bei der relativen Quantifizierung benutzt wurde) eingesetzt. In der ersten Gelspalte ist der 100Bp DNA-Marker (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) zu sehen, welcher der Identifizierung der PCR-Produkte dient. Die weiteren Gelspalten (B – G) stellen jeweils eine Positiv- und Negativkontrolle des PCR-Produktes dar. Das eingesetzte Probengut wurde in den Gelspalten B - G jeweils im Verhältnis 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt eingesetzt. In den Gelspalten der Positivkontrollen (B, D, F) sind entsprechend der Verdünnung in der Intensität nachlassende Banden zu erkennen. Bei den Negativkontrollen (Gelspalten C, E, G) wurde im Vorfeld bei der cDNA-Synthese keine Reverse Transkriptase eingesetzt, sodass keine Banden der PCR-Produkte zu erwarten sind, da für die PCR keine Vorlagen für die Amplifizierung vorhanden waren. Die in den rechten Spalten entstandenen Doppelbanden könnten auf eine Entstehung von Primerdimeren aufgrund von mangelndem Templetangebot oder Verunreinigung sprechen. Die Wasserkontrollen in den Gelspalten H und I weisen keine Banden auf, was ein sauberes Arbeiten beim Erstellen des Mastermixes beweist. Bei der Wasserkontrolle wurde anstelle des Probengutes Wasser eingesetzt.

S1P5

A B C D E F G H I

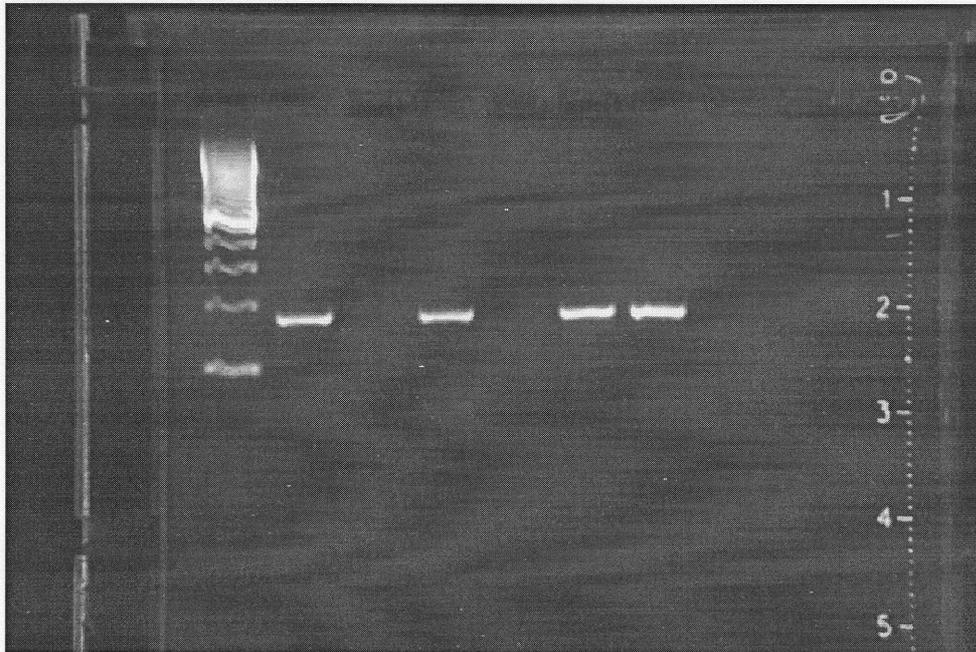


Abbildung 7: Gel zur PCR-Produktkontrolle des Gens S1P5

A= 100 Bp DNA-Marker

B= HBL 100 Positivkontrolle

C= HBL 100 Negativkontrolle

D= T47D Positivkontrolle

E= T47D Negativkontrolle

F= Kalibrator

G= Kalibrator

H= Wasserkontrolle

I= Wasserkontrolle

In der Abbildung 7 wird ein Gel gezeigt, das dem PCR-Produktnachweis dient. In der ersten Spalte des Gels ist der 100Bp DNA-Marker (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) zu sehen, der zur Identifizierung der PCR-Produkte dient. Die vier folgenden

Gelspalten (B – E) zeigen jeweils eine Positiv- und Negativkontrolle der Zelllinien des Mammakarzinoms HBL 100 und des Mammakarzinoms T47D (stand weiter nicht mehr für diese Arbeit zur Verfügung). Die beiden Positivkontrollen weisen saubere Banden in der für das gewünschte Produkt zu erwartenden Position auf dem Gel auf, wobei keine weiteren Banden erkennbar sind. Diese Tatsache deutet auf eine korrekt durchgelaufene PCR hin. Die erfolgte Sequenzierung im Institut für Pathologie, Direktor Prof. Dr. med. G. Sauter, am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf zeigte, dass es sich um gewünschte Produkte handelt. Die Spalten mit den Negativkontrollen weisen keine Banden auf, da hier im Vorfeld bei der cDNA-Synthese zu dem Probengut keine Reverse Transkriptase zugefügt wurde. Dadurch sollten erwartungsgemäß keine Banden im Gel erscheinen, da hier bei der PCR die benötigten Vorlagen zur Amplifizierung nicht zur Verfügung stehen. Anschließend wurden jeweils zwei Spalten (F und G) im Gel mit einem Kalibrator (10^{-4} verdünntes PCR-Produkt der Zelllinie HBL 100) sowie darauffolgende zwei Wasserkontrollen (H und I) dargestellt. In den Gelspalten der Kalibratoren ist jeweils eine deutliche Bande zu sehen, was den Positivkontrollen entspricht. Die Wasserkontrollen, bei denen anstatt des Probengutes Wasser eingesetzt wurde, sind als Spalten ohne PCR-Produkt zu erkennen, was ein sauberes Arbeiten beweist.

4. Diskussion

Die physiologische und pathophysiologische Bedeutung von Sphingosin-1-Phosphat und deren Rezeptoren wurde bis zur jüngsten Vergangenheit unterschätzt. Erst seit kurzer Zeit wurde die funktionelle Bedeutung, welche von diesen kleinen Lipidmolekülen ausgeht, erkannt und die Untersuchungen intensiviert. Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und die funktionell verwandte Lysophosphatidsäure (LPA) nehmen eine wichtige Rolle im Haushalt der Organismen ein. So ist Sphingosin-1-Phosphat an vielen Prozessen der normalen Physiologie beteiligt. Hierzu zählen die Organisation des Zytoskelettes, die Regulation des Ca^{2+} -Haushaltes, die Anti-Apoptose sowie die Proliferation (Pyne und Pyne, 2000; Meyer zu Heringsdorf and Jacobs, 2007; Rivera and Chun, 2008). Außerdem fungiert Sphingosin-1-Phosphat als ein „second-messenger“ (Meyer zu Heringsdorf, 2003). Neuerdings werden dem S1P neben diesen physiologischen Prozessen zunehmend auch pathophysiologische Rollen zugeschrieben wie eine Beteiligung an der Initiation sowie Progression von malignen Tumoren (Ischii et al., 2004; Mills and Moolenaar, 2003). Die durch Sphingosin-1-Phosphat mitverursachte Signaltransduktion kann eine stimulierende sowie hemmende Wirkung auf menschliche in Nährlösung kultivierte Tumorzelllinien (in vitro) aufweisen (Dolezalova et al., 2003; Balthasar et al., 2006; Yamashita et al., 2006). Diese und die meisten anderen Untersuchungen beim „signaling“ der Tumorprogression durch Sphingosin-1-Phosphat basieren auf solchen in vitro Modellen, wobei eine Auswirkung und Beeinflussung auf die Expression von Sphingosin-1-Phosphat und deren Rezeptoren durch einen komplex funktionierenden lebendigen Organismus nicht berücksichtigt wurde. Hierbei kann es zu einer Variation der Expressionsmuster kommen. Ein brauchbares in vivo Modell zur Untersuchung des metastatischen Verhaltens von Tumorzellen wird durch die Xenotransplantation von Tumorzellen in immunodefizienten SCID-Mäuse geboten (Mitchell and Schumacher, 1997; Valentiner et al., 2006). Die vorbenannten Studien zeigen, dass die Tumorzelllinien ihre Eigenschaften, wie z. B. die Lektinbindung, nach Xenotransplantation deutlich modifizieren (Schumacher et al., 1996). Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, einen solchen Vergleich zwischen einem in vitro (mit in Nährlösung kultivierten Zelllinien) und einem in vivo (mit in immunodefizienten SCID-Mäusen xenotransplantierten Tumorzellen) Modell zu schaffen und der Hypothese nachgehen, ob die Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren

bei kultivierten Zelllinien und xenotransplantierten Tumoren unterschiedlich exprimiert werden. Dabei sollte das Expressionsverhalten von Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren bei metastasierenden und nichtmetastasierenden Mamma- und Kolonkarzinoma sowie beim Melanom veranschaulicht werden.

Eine Aussage über das jeweilige Expressionsmuster von Proteinen – wie den Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren – einer Zelle während des Zeitpunktes der Zellpräparation wird durch mRNA (im Gegensatz zu der genomischen RNA) ermöglicht. Eine gewisse Menge an mRNA ist im Zytosol einer lebenden Zelle vorhanden, während ein entsprechendes Gen transkribiert wird. Diese mRNA gibt uns Aufschluss darüber, ob und welche Gene exprimiert werden. Die oben beschriebene relative Quantifizierung wurde mittels real-time PCR mit den entsprechenden Primern durchgeführt und ergab überwiegend, dass S1P4- und S1P5-Rezeptoren in den Tumorzellen nicht exprimiert wurden. Signifikant ist insbesondere der Unterschied zwischen den Expressionsmustern beim in vivo Modell und denen beim in vitro Modell. Beide Rezeptorarten werden bei den ausgewählten xenotransplantierten Tumoren nicht oder nur schwach, das heißt an der Nachweisgrenze schwankend, exprimiert. Bei den kultivierten Zelllinien kann eine minimale Expression beobachtet werden. S1P5 wird lediglich bei der Zelllinie des Mammakarzinoms HBL 100 in gewisser Form exprimiert. S1P4 wird ebenfalls nur geringfügig bei den Zelllinien des Mammakarzinoms HBL 100 sowie des malignen Melanoms FEMX-1 exprimiert. Jedoch tritt hier eine moderate Standardabweichung zur Erscheinung, was die Aussagekraft dieser Ergebnisse reduziert. Hierbei wird ein geringer Unterschied zwischen in vivo und in vitro Untersuchungsmodellen ersichtlich.

Zur Kontrolle des regelrechten Verlaufes der Ergebnisermittlung mittels der real-time PCR wurde bei jedem Lauf eine Positivkontrolle in Form von hActin durchgeführt. Dieses menschliche Aktin kommt ubiquitär im menschlichen Organismus vor. Es ist ein wichtiger Bestandteil des Zytoskelettes und wird konstitutiv von jeder eukaryontischer Zelle exprimiert. Durch die Tatsache, dass das hActin nicht im Mausgewebe exprimiert wird, eignet es sich ideal zur Positivkontrolle. Das xenotransplantierte Tumorprobengut kann Spuren von Mausgewebe beinhalten, welche zur Verfälschung der Ergebnisse führen könnten. Zur Vermeidung solcher

Probleme wurden Primer für hActin als Housekeeping-Gen eingesetzt, bei denen die menschliche Spezifität nachgewiesen wurde.

Es kann kein signifikanter Unterschied im Expressionsverhalten zwischen metastasierenden und nichtmetastasierenden Tumoren beobachtet werden. Eine Ausnahme bildet die nichtmetastasierende Mammakarzinomzelllinie HBL 100, welche beide Rezeptorenarten exprimiert. Die in SCID-Mäusen nichtmetastasierende HBL 100 Zelllinie, die einen Teil des Affenvirus SV 40 Genomes beinhaltet, kann nicht als eine normale Zelllinie betrachtet werden (Schumacher and Adam, 1997). Durch diese Tatsache kann das Ergebnis verfälscht werden, was aber keinen direkten Einfluss auf die Expression hat. Die Expression der S1P4- und S1P5-Rezeptoren wie bei den kultivierten Zelllinien werden bei xenotranplantierten Tumoren nicht gefunden. Die Ergebnisse der kultivierten Zelllinien in 20 µl- und 100 µl-Glaskapillaren bestätigen sich gegenseitig, allerdings konnte ein Vergleich bei dieser Arbeit nur als in vitro Versuch durchgeführt werden. Nichtsdestotrotz bekräftigt diese Tatsache die Ergebnisse und den Versuchsaufbau.

Der Produktnachweis erfolgte stets mittels eines Agarosegels, wobei die PCR-Produkte als Banden in Erscheinung traten. Im dem Fall, in dem nach der PCR keine Bandenbildung bei Sphingosin-1-Rezeptorprobenzustand kam, wohl aber eine saubere Bande bei hActin ersichtlich war, ist anzunehmen, dass die eingesetzte cDNA von geeigneter Qualität für einen Nachweis gewesen ist. Dies weist in solchen Fällen auf ein Ausbleiben der Rezeptorexpression in der jeweiligen Tumorentität hin. Ein korrekt verlaufender hActin-Lauf war ausschlaggebend über die Qualität der cDNA. Die Länge der PCR-Produkte wurde mittels eines im jeden Gel eingesetzten 100Bp DNA-Markers (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ermittelt. Dabei wurden die Markerbestandteile äquivalent der DNA-Länge und deren Lauflänge im Agarosegel verteilt. Dies ermöglichte eine vergleichende PCR-Produktlängenbestimmung. Zur Steigerung der Aussagekraft wurde jede Tumorentität in drei Chargen jeweils mit Doppelbestimmung untersucht. In dieser Arbeit entsprachen die dargestellten PCR-Produkte von hActin, S1P4 und S1P5 der erwarteten Länge. Diese Ergebnisse wurden probeweise durch eine erfolgte Sequenzierung verifiziert.

Schlussendlich zeigte diese Studie im gewissen Grade vorhandene Unterschiede zwischen dem Expressionsmuster der kultivierten Tumorzelllinien und Tumoren,

welche in immunodefizienten SCID-Mäusen xenotransplantiert wurden. So konnte in wenigen kultivierten Tumorzelllinien ein geringes Vorkommen an Rezeptorexpression nachgewiesen werden (S1P4 bei HBL 100 und FEMX-1 sowie HT 29 und S1P5 nur bei HBL 100). Dabei zeigten die xenotransplantierten Tumoren keine bzw. lediglich eine an der Nachweisgrenze schwankende Expression auf. Die Herunterregulierung der Expression zeigt, dass der Verbund eines dreidimensionalen Tumors, wie es das in vivo Modell darstellt, einen Einfluss auf die komplexe Funktionsweise der Tumorzellen einnimmt (Thies et al., 2007). Dies könnte darauf hindeuten, dass die Migrationsbereitschaft im Tumorverbund geringer sein dürfte, was bei folgenden Studiendurchführungen berücksichtigt werden sollte. Dieser Regulationsmechanismus in einem Organismus oder Zellverbund zeigt einen wahrscheinlichen, partiellen Einfluss auf die Sphingosin-1-Phosphat-Signalkaskade. Andererseits könnten andere Regulationsmechanismen in einzelnen Tumorzellen bestehen, die eine Formung eines dreidimensionalen Tumors fördern. Diese Bedeutung und Modellunterschiede werden in neueren Studien mehr berücksichtigt (Huwiler et al., 2011; French et al., 2010; Valentiner et al., 2006). Daraus folgend sollten Ergebnisse aus in vitro Studien (kultivierte Tumorzellen) nicht direkt mit Ergebnissen aus in vivo Studien (gewachsene Tumoren) gleichgesetzt werden.

Zusammenfassend konnten in dieser Studie keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Expressionsmusters zwischen metastasierenden und nichtmetastasierenden Tumoren festgestellt werden.

Ausblickend, um die gemachten Aussagen zu bekräftigen oder zu erweitern, sollten in folgenden Studien weitere Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren (S1P1-3) sowie die verwandten Lysophosphatidsäure-Rezeptoren (LPA) im Expressionsverhalten bei einer größeren Anzahl von metastasierenden und nichtmetastasierenden Tumorentitäten als in vitro - Modell und oder vor allem in vivo - Modell untersucht und verglichen werden.

5. Zusammenfassung

Sphingosin-1-Phosphat ist ein wichtiges Signalmolekül, das erst in den letzten Jahren intensiver untersucht wurde. Neuere Studien ergaben neben den physiologischen Funktionen auch pathophysiologische Eigenschaften, wie den Einfluss von S1P bei der Entstehung und Progression von Tumoren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren S1P4 und S1P5 in Karzinom und Melanom-Zellen untersucht. Dabei wurden zwei verschiedene Modelle betrachtet. Es sollten Ergebnisse aus in vitro (kultivierte Zelllinien) und in vivo (xenotransplantierte Tumoren) Untersuchungsmodellen vergleichend gegenübergestellt werden. Im in vivo Modell wurden die immunodefiziente SCID-Mäuse genutzt, deren Tumoren xenotransplantiert wurden. Vorarbeiten basierten überwiegend auf in vitro Modellen, deren Ergebnisse oft nicht auf in vivo Modelle übertragen werden konnten. Als Mittel der Wahl zum Nachweis der Expression der Sphingosin-1-Rezeptoren bot sich die real-time PCR an, wobei eine relative Quantifizierung durchgeführt wurde, um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können. Der PCR-Produkt-Nachweis erfolgte mittels eines Agarosegels.

Die Untersuchung zum Expressionsverhalten von S1P4 und S1P5 ergab keine signifikante Expression der zugehörigen Gene. S1P4 zeigte bei drei Tumorzelllinien (HBL 100, FEMX-1 und HT 29) eine geringe Expressionsrate. Wiederum S1P5 erwies nur bei der Zelllinie des Mammakarzinoms HBL 100 eine nennenswerte Expression. Auffallend ergab sich eine Herunterregulierung bzw. eine fehlende Expression von S1P4 und S1P5 in xenotransplantierten Tumoren im Vergleich zu den kultivierten Tumorzellen. So konnte kein Unterschied im Expressionsverhalten zwischen metastasierenden und nichtmetastasierenden Tumoren nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass die kultivierten Zelllinien ein abweichendes Expressionsverhalten zu den gewachsenen dreidimensionalen Tumoren aufweisen. Dieses zeigt, dass in weiteren Studien die Aufschlüsse aus Ergebnissen von reinen in vitro Untersuchungsmodellen nicht direkt auf in vivo gewachsene Tumoren übertragen werden können.

6. Abkürzungsverzeichnis

AC = Adenylatcyclase

Bp-Marker = Basenpaar-Marker

cAMP = cyclic adenosine monophosphate

Ca²⁺ = Calcium-Ionen

cDNA = complementary DNA

CoA = Coenzym A

COX2 = Cyclooxygenase-2

CO₂ = Kohlenstoffdioxid

dNTP`s = Desoxyribonukleosidtriphosphate

EGF = epidermalen Wachstumsfaktor

EDG = endothelial differential gene

ERK/MAP = extracellular signal regulated kinase / mitogen activated protein kinase

ERK = extracellular signal regulated kinase

FCS = fetal calf serum

FFPE = formalin fixed, paraffin embedded

G_i und G_{12/13}-Protein = Guaninnucleotid-bindendes Protein

hACT = humanes Actin

HKG = Housekeeping-Gen

IUPHAR = International Union Of Pharmacology

INF γ -Synthese = Gamma-Interferon-Synthese

IL-10 = Interleukin-10

LPA = Lysophosphatidsäure

LC-Mix = LightCycler-Mix

MAP = mitogen activated proteinkinase

MgCl₂ = Magnesiumdichlorid

mM = milliMol

mRNA = messenger ribonucleic acid

NaCl = Natriumchlorid

Nm = Newtonmeter

pmol / µl = picomol / mikroliter

PBS = phosphate buffered saline

PCR = Polymerase chain reaction

PLC = Phospholipase C

PTX = Pertussis-Toxin

PKA = Proteinkinase A

Prkdc = protein kinase DNA activated catalytic polypeptide

forw a = Vorwärts a-Primer

rev = Rückwärts-Primer

RNA = ribonucleic acid

RNase = Ribonuklease

RPMI 1640-Medium = Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium

RT-PCR = realtime-quantitative Polymerase-Chain-Reaction

rRNA = ribosomale Ribonukleinsäure

tRNA = transfer ribonucleic acid

RTQ-PCR = realtime-quantitative Polymerase-Chain-Reaction

RT-PCR = realtime-quantitative Polymerase-Chain-Reaction

S1P = Sphingosin-1-Phosphat

SphK1 = Sphingosinkinase 1

SphK2 = Sphingosinkinasen 2

SCID = severe combined immunodeficiency

SphK = Sphingosinkinasen

TBE-Puffer = Tris/Borate/EDTA- Puffer

Taq-Polymerase = Thermus aquaticus-Polymerase

Upm = Umdrehung pro Minute

7. Literaturverzeichnis

Akao, Y., Banno, Y., Nakagawa, Y., Hasegawa, N., Kim, T.J., Murate, T., Igarashi, Y., Nozawa, Y. (2006): High expression of sphingosine kinase 1 and S1P receptors in chemotherapy-resistant prostate cancer PC3 cells and their camptothecin-induced up-regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006, 1284-90

Anliker, B., Chun, J. (2004a): Lysophospholipid G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 2004 May 14; 279(20): 20555-8

Anliker, B., Chun, J. (2004b): Cell surface receptors in lysophospholipid signaling. *Semin Cell Dev Biol.* 15(5):457-65

Arikawa, K., Takuwa, N., Yamaguchi, H., Sugimoto, N., Kitayama, J., Nagawa, H., Takehara, K., Takuwa, Y. (2003): Ligand-dependent inhibition of B16 melanoma cell migration and invasion via endogenous S1P2 G protein-coupled receptor. Requirement of inhibition of cellular RAC activity. *J. Biol. Chem.* 278(35): 32841-51

Balthasar, S., Samulin, J., Ahlgren, H., Bergelin, N., Lundqvist, M., Toescu, E. C., Eggo, M. C., Tornquist, K. (2006): Sphingosine 1-phosphate receptor expression profile and regulation of migration in human thyroid cancer cells. *Biochem. J.* 398:547-556

Bosma, M. J., Carroll, A. M. (1991): The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu Rev. Immunol.* 9:323-50

Chun, J., Goetzl, E. J., Hla, T., Igarashi, Y., Lynch, K. R., Moolenaar, W., Pyne, S., Tigyi, G. (2002): International Union of pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol. Rev.* 54, 265-269

Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P. G., Coso, O. A., Gutkind, S., Spiegel, S. (1996): Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* 381, 800-803

Dolezalova, H., Shankar, G., Huang, M. C., Bikle, D. D., Goetzl, E. J. (2003): Biochemical regulation of breast cancer cell expression of S1P2 (Edg-5) and S1P3

(Edg-3) G protein-coupled receptors for sphingosine 1-phosphate. *J. Cell Biochem.* 88: 732-743

Döll, F., Pfeilschifter, J., Huwiler, A. (2006): The epidermal growth factor stimulates sphingosine kinase-1 expression and activity in the human mammary carcinoma cell line MCF7. *Biochim. Biophys. Acta.* 2005 Dec 30; 1738(1-3): 72-81

Edsall, L. C., Cuvillier, O., Twitty, S., Spiegel, S., Milstien, S. (2001): Sphingosine kinase expression regulates apoptosis and caspase activation in PC12 cells. *J. Neurochem.* 2001 Mar; 76(5): 1573-84.

French, K. J., Schrecengost, R. S., Lee, B. D., Zhuang, Y., Smith, S. N., Eberly, J. L., Yun, J. K., Smith, C. D. (2003): Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase. *Cancer Res.* 63(18): 5962-9.

French K. J., Upson, J. J., Keller, S. N., Zhuang Y., Yun, J. K., Smith, C. D. (2006): Antitumor activity of sphingosine kinase inhibitors. *J. Pharmacol Exp Ther.* 2006 Aug; 318(2): 596-603.

French, K. J., Zhuang, Y., Maines, L. W., Gao, P., Wang, W., Beljanski, V., Upson, J. J., Green, C. L., Keller, S. N., Smith, C. D. (2010): Pharmacology and antitumor activity of ABC294640, a selective inhibitor of sphingosine kinase-2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 333(1):129-39.

Glickman, M., Malek, R. L., Kwitek-Black, A. E., Jakob, H. E., Lee, N. H. (1999): Molecular cloning, tissue-specific expression and chromosomal localisation of a novel nerve growth factor-regulated g-protein-coupled receptor, nrg-1. *Mol Cell Neurosci* 59, 141-152

Goetzl, E. J., An, S. (1998): Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate. *FASEB J.* 12, 1589-1598

Goetzl, E. J., Wang, W., McGiffert, C., Huang, M. C., Gräler, M. H. (2004): Sphingosine-1-phosphate and its G-protein-coupled receptors constitute a multifunctional immunoregulatory system. *J. Cell. Biochem.* 92, 1104-1114

Goodemote, K. A., Mattie, M. E., Berger, A., Spiegel, S. (1995): Involvement of a pertussis toxin-sensitive G-protein in the mitogenic signaling pathways of sphingosine-1-phosphate. *J. Biol. Chem.* 270, 10272-10277

Gräler, M. H., Bernhardt, G., Lipp, M. (1998): EDG-6, a novel G-protein-coupled receptor related to receptors for bioactive lysophospholipids, is specifically expressed in lymphoid tissue. *Genomics* 53, 164-169

Hla, T. (2003): Signaling and biological actions of sphingosine 1-phosphate. *Pharmacol. Res* 47(5): 401-7.

Hla, T., Maciag, T. (1990): an abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 265, 9308-9313

Huwiler, A., Bourquin, F., Kotelevets, N., Pastukhov, O., Capitani, G., Grütter, M. G., Zangemeister-Wittke, U. (2011): A prokaryotic S1P lyase degrades extracellular S1P in vitro and in vivo: implication for treating hyperproliferative disorders. *PLoS One* 6(8):e22436

Im, D. S., Heise, C. E., Ancellin, N., O'Dowd, B. F., Shei, G. J., Heavens, R. P., Rigby, M. R., Hla, T., Mandala, S., Mc Allister, G., George, S. R., Lynch, K. R. (2000): Characterization of a novel sphingosine-1-phosphate receptor, EDG-8. *J. Biol. Chem.* 275, 14281-14286

Ischii, I, Fukushima, N., Ye, X., Chun, J. (2004): Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Ann. Rev. Biochem.* 73, 321-354

Kawamori, T., Osta, W., Johnson, K. R., Pettus, B., Bielawski, J., Tanaka, T., Wargovich, M. J., Reddy, B. S., Hannun, Y. A., Obeid, L. M., Zhou, D. (2006): Sphingosine kinase 1 is up-regulated in colon carcinogenesis. *FASEB J.* 20, 386-388

Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., Spiegel, S. (1998): Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 23722-23728

Lee, M. J., Van Brocklyn, J. R., Thangada, S., Liu, C. H., Hand, A. R., Menzeleev, R., Spiegel, S., Hla, T. (1998): Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G-protein-coupled receptor EDG-1. *Science N.Y* 279, 1552-1555

Malek, R. L., Toman, R. E., Edsall, L. C., Wong, S., Chiu, J., Letterle, C. A., Van Brocklyn, J. R., Milstien, S., Spiegel, S., Lee, N. H. (2001): Nrg-1 belongs to the endothelial differentiation gene family of G-protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptors. *J. Biol. Chem.* 276, 5692-5699

Mandala, S. M., Thornton, R., Galve-Roperh, I., Poulton, S., Peterson, C., Olivera, A., Bergstrom, J., Kurtz, M. B., Spiegel, S. (2000): Molecular cloning and characterization of a lipid phosphohydrolase that degrades sphingosine-1-phosphate and induces cell death. *PNAS* 97, 7859-7864

Meyer zu Heringsdorf, D., Liliom, K., Schaefer, M., Danneberg, K., Jaggar, J. H., Tigyi, G., Jakobs, K. H. (2003): Photolysis of intracellular caged sphingosine-1-phosphate causes Ca^{2+} mobilization independently of G-protein-coupled receptors. *FEBS Lett.* 554, 443-449

Meyer zu Heringsdorf, D., Jokobs, K. H. (2007): Lysophospholipids receptors: Signaling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism. *Biochem. Biophys. Acta* 1768, 923-940

Mills, G. B., Moolenaar, W. H. (2003): The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8: 582-591

Mitchell, B. S., Schumacher, U. (1997): Use of immunodeficient mice in metastasis research. *Br. J. Biomed. Sci* 54: 278-286.

Oskouian, B., Saba, J, (2007): Sphingosine-1-phosphate meatabolism and intestinal tumorigenesis: lipid signaling strikes again. *Cell Cycle* 6, 522-527

Payne, S. G., Milstien, S., Spiegel, S. (2002): Sphingosine-1-phosphate: dual messenger functions. *FEBS Lett.* 531, 54-57

Pitson, S. M., Moretti, P. A., Zebol, J. R., Xia, P., Gamble, J. R., Vadas, M. A., D'Andrea, R. J., Wattenberg, B. W. (2000): Expression of a catalytically inactive

sphingosine kinase mutant blocks agonist-induced sphingosine kinase activation. A dominant-negative sphingosine kinase. *J. Biol. Chem.* 2000 Oct 27; 275(43): 33945-50.

Pyne, S., Pyne, N. (2000): Sphingosine-1-phosphate signalling via the endothelial differentiation gene family of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* 88, 115-131

Pyne, S., Pyne, N. J. (2000): Sphingosine-1-phosphate signaling in mammalian cells. *Biochem. J.* 349, 385-402

Pyne, S., Pyne, N. J. (2002): Sphingosine-1-phosphate signaling and termination at lipid phosphate receptors. *Biochem. Biophys. Acta* 1582, 121-131

Rivera, R., Chun, J. (2008): Biological effects of lysophospholipids. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 160:25-46

Saba, J. D., Hla, T., (2004): Point-counterpoint of sphingosine-1-phosphate metabolism. *Circ. Res.* 94, 724-734

Sanchez, T., Estrada-Hernandez, T., Paik, J. H., Wu, M. T., Venkataraman, K., Brinkmann, V., Claffey, K., Hla, T. (2003): Phosphorylation and action of the immunomodulator FTY720 inhibits vascular endothelial cell growth factor-induced vascular permeability. *J Biol Chem.* 2003 Nov 21;278(47):47281-90

Sanchez, T., Hla, T. (2004): Structural and functional characteristics of S1P receptors. *J. Cell. Biochem.* 92, 913-922

Schumacher, U., Mohamed, M., Mitchell, B. S. (1996): Differential expression of carbohydrate residues in human breast and colon cancer cell lines grown in vitro and in vivo in SCID mice. *Cancer J* 9: 247-254

Schumacher, U., Adam, E. (1997): Lectin histochemical HPA-binding pattern of human breast and colon cancers is associated with metastases formation in severe combined immunodeficient mice. *Histochem J.* 1997 Sep;29(9):677-84.

Spiegel, S., Merrill, Jr., A. H. (1996): Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *FASEB J.* 10, 1388-1397

Spiegel, S., Milstien, S. (2002): Sphingosine-1-phosphate, a key cell signalling molecule. *J. Biol. Chem.* 277, 25851-25854

Spiegel, S., Milstien, S. (2003): Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nature Rev.* 4, 397-407

Spiegel, S., Milstien, S. (2006): Functions of the multifaceted family of sphingosine kinases and some close relatives. *J. Biol. Chem.* 282, 2125-2129

Thies, A., Mauer, S., Fodstad, O., Schumacher, U. (2007): Clinically proven markers of metastasis predict metastatic spread of human melanoma cells engrafted in scid mice. *Br J Cancer* 96:609-616.

Thies, A., Dautel, P., Meyer, A., Pfüller, U., Schumacher, U. (2008): Low-dose mistletoe lectin-I reduces melanoma growth and spread in a scid mouse xenograft model. *Br J Cancer.* 2008 Jan 15;98(1):106-12

Valentiner, U., Brooks, S. A., Schumacher, U. (2006): In vivo xenograft models of breast cancer metastasis. *Methods Mol. Med.* 120: 479-488.

Van Brocklyn, J. R., Gräler, M. H., Bernhardt, G., Hobson, J. P., Lipp, S., Spiegel, S. (2000). Sphingosine-1-phosphate is a ligand for the G-protein-coupled receptor EDG-6. *Blood* 95, 2624-2629

Visentin, B., Vekich, J. A., Sibbald, B. J., Cavalli, A. L., Moreno, K. M., Matteo, R. G., Garland, W. A., Lu, Y., Yu, S., Hall, H. S., Kundra, V., Mills, G. B., Sabbadini, R. A. (2006): Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages. *Cancer Cell.* 9(3):225-38

Wang, W., Gräler, M. H., Goetzl, E. J. (2005): Type 4 sphingosine-1-phosphate G-protein-coupled receptor (S1P4) transduces S1P effects on T cell proliferation and cytokine secretion without signalling migration. *FASEB J.* 19, 1731-1733

Xia, P., Gamble, J. R., Wang, L., Pitson, S. M., Moretti, P. A. B., Wattenberg, B. W., D'Andrea, R. J., Vadas, M. A. (2000): An oncogenic role of sphingosine kinase. *Curr. Biol.* 10, 1527-1530

Yang, L., Yatomi, Y., Miura, Y., Satoh, K., Ozaki, Y. (1999): Metabolism and functional effects of sphingolipids in blood cells. *Br. J. Haematol.* 107, 282-293

Yamashita, H., Kitayama, J., Shida, D., Yamaguchi, H., Mori, K., Osada, M., Aoki, S., Yatomi, Y., Takuwa, Y., Nagawa, H. (2006): Sphingosine 1-phosphate receptor expression profile in human gastric cancer cells: differential regulation on the migration and proliferation. *J. Surg. Res.*130(1):80-7

Yamazaki, Y., Kon, L., Sato, K., Tomura, H., Sato, M., Yoneya, T., Okazaki, H., Okajima, F., Ohta, H. (2000): EDG-6 as a putative sphingosine-1-phosphate receptor coupling to Ca²⁺ signalling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268, 583-589

Yatomi, Y., Ruan, F., Hakamori, S., Igarashi, Y. (1995): Sphingosine-1-phosphate: a platelet-activating sphingolipid released from agonist-stimulated human platelets. *Blood* 86, 193-202

Yatomi, Y., Igarashi, Y., Yang, L., Hisano, N., Qi, R., Asazuma, N., Satoh, Y., Ozaki, Y., Kume, S. (1997): Sphingosine-1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum. *J. Biochem.* 121, 969-973

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Allen danken, die mich bei der Realisierung dieser Arbeit unterstützt haben. Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Udo Schumacher für die Überlassung des Themas sowie der großzügigen Bereitschaft, mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen. Weiter danke ich allen wissenschaftlichen Mitarbeitern des Instituts der Anatomie II für die Unterstützung der Planung und Durchführung dieser Arbeit besonders Herrn Dr. rer. nat. Reinhard Müller.

Einen besonderen Dank möchte ich schlussendlich an meine wichtigsten Unterstützer richten, ohne diese ich nicht genug Kraft hätte, diese Arbeit durchführen zu können, meiner Ehefrau Inga, meinen Eltern Danuta und Piotr, meiner Schwester Agnieszka sowie besonders meinem Freund Mathias Krüger, der mich durch die ganze Zeit unterstützend begleitet hat.

9. Lebenslauf

Name : Wojciech Bialecki

Geburtsdatum und -ort : 28.04.1980 in Poznań (PL)

Familienstand : verheiratet

10. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: