

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus dem Institut für Anatomie und
experimentelle Morphologie
des Zentrums für Experimentelle Medizin

Direktor: Prof. Dr. med. Udo Schumacher

Untersuchung zur Expression der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren S1P₁ bis S1P₅ in kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen

Dissertation

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

vorgelegt von:

Jessica Allendorf, geb. Leptien
aus Neumünster

Hamburg 2011

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 28.02.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. S. Klutmann

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. K. Pantel

Für Toby

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
1 Fragestellung und Zielsetzung	1
2 Einleitung	2
2.1 Das Bronchialkarzinom.....	2
2.1.1 Das kleinzellige Bronchialkarzinom	3
2.2 Metastasenbildung.....	5
2.3 Sphingosin-1-Phosphat.....	7
2.4 Spingosin-1-Phosphat-Rezeptoren	10
2.4.1 Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 1	12
2.4.2 Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 2.....	13
2.4.3 Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 3	13
2.4.4 Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 4.....	14
2.4.5 Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 5.....	14
2.5 Zusammenfassung und Ausblick	15
3 Material und Methoden	16
3.1 Material- und Probengewinnung	16
3.1.1 Zelllinien	16
3.1.2 Tumore	16
3.1.3 RNA-Isolation	16
3.1.3.1 RNA Isolation aus den Zelllinien.....	17
3.1.3.2 RNA-Isolation aus den in Paraffin eingebetteten Tumoren.....	17
3.1.3.3 Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA	18
3.1.4 cDNA-Synthese mittels Reverser Transkription.....	19
3.1.4.1 cDNA-Synthese aus der RNA (Kulturzellen)	19
3.1.4.2 cDNA-Synthese aus der RNA (Tumorzellen).....	20
3.1.4.3 Primer	20
3.2 Methoden.....	22
3.2.1 Real-Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	22
3.2.1.1 LightCycler Instrument	22
3.2.1.2 Detektion der PCR-Produkte.....	22
3.2.1.3 Schmelzkurvenanalyse	23

3.2.2	PCR-Produktkontrolle mittels Gelelektrophorese.....	23
3.2.3	Sequenzierung zur PCR-Produktkontrolle.....	24
3.2.4	Quantifizierung mit Hilfe der Real-Time-PCR.....	24
3.2.4.1	Standardkurvenerstellung.....	25
3.2.4.2	Normalisierung mittels Kalibrator	26
3.2.4.3	Optimierungsverfahren bei der Real-Time-PCR.....	27
3.2.4.4	Reaktionsgemische.....	27
3.2.4.5	PCR-Protokolle am LightCycler	28
3.2.5	Auswertung	28
4	Ergebnisse	29
4.1	S1P ₁ Expression	29
4.2	S1P ₂ Expression	30
4.3	S1P ₃ Expression	30
4.4	S1P ₄ Expression	31
4.5	S1P ₅ Expression	32
4.6	Ergebnis der Gelelektrophorese	33
5	Diskussion	35
5.1	Regulationsmechanismen von S1P ₁ in SCLC.....	37
5.2	Regulationsmechanismen von S1P ₂ in SCLC.....	38
5.3	Regulationsmechanismen von S1P ₃ in SCLC.....	40
5.4	Regulationsmechanismen von S1P ₄ in SCLC.....	41
5.5	Regulationsmechanismen von S1P ₅ in SCLC.....	42
5.6	Andere einflussnehmende Elemente auf S1P-Rezeptoren	43
6	Zusammenfassung.....	47
7	Literaturverzeichnis.....	48
8	Danksagung	54
9	Eidesstattliche Versicherung.....	55

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatcyclase
al.	alii
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
Cer-Synthase	Ceramid-Synthase
CK-BB	Creatinin-Kinase (Typ BB = Gehirntyp)
Cp	crossing points
Dihydro-S1P	Dihydrosphingosin 1-Phosphat
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDG	endothelien differentiation genes
EDG1	endothelien differentiation genes 1-Rezeptor (=S1P ₁)
EDG3	endothelien differentiation genes 3-Rezeptor (=S1P ₃)
EDG5	endothelien differentiation genes 5-Rezeptor (=S1P ₂)
EDG6	endothelien differentiation genes 6-Rezeptor (=S1P ₄)
EDG8	endothelien differentiation genes 8-Rezeptor (=S1P ₅)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
ERK1	extracellular signal regulated kinases 1
ERK2	extracellular signal regulated kinases 2
FFPE	formalin fixed, paraffin embedded
G	Gravitationskonstante
g	Gramm
GDP	Guaninnucleotid-di-Phosphat
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
GTP	Guaninnucleotid-tri-Phosphat
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
JNK	Jun amino-terminal-Kinase

Abkürzungsverzeichnis

K	Konstante
k	kurz (entspricht hier forward Primer)
K _D	Dissoziationskonstante
l	lang (entspricht hier forward a-Primer)
L-dopa	L-3,4-dihydroxyphenylalanine
LPA	lysophosphatidic acid
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase (MAP-Kinase)
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
MM	Molekularmarker
mRNA	messenger ribonucleic acid
ng	Nanogramm
NGF	nerve growth factor
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
N _R	Anzahl Referenz Gen
NSCLC	non small cell lung cancer
NSE	Neuronenspezifische Enolase
N _T	Anzahl Target Gen
Palmitoyl-CoA	Palmitoyl-Coenzym A
PCR	polymerase chain reaction
PDGH	platelet derived growth factor
Phyto-S1P	Phytosphingosin-1-Phosphat
PI3	Phosphoinositid-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PLC	Phospholipase C
pmol	Pikomol
pmol/mg	Pikomol pro Milligramm
RA	retinoid acid
RNA	ribonucleic acid
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1P ₁	Sphingosin-1-Phosphat ₁ -Rezeptor

Abkürzungsverzeichnis

S1P ₂	Sphingosin-1-Phosphat ₂ -Rezeptor
S1P ₃	Sphingosin-1-Phosphat ₃ -Rezeptor
S1P ₄	Sphingosin-1-Phosphat ₄ -Rezeptor
S1P ₅	Sphingosin-1-Phosphat ₅ -Rezeptor
SCID	severe combined immunodeficiency
SCLC	small cell lung cancer
SK	Sphingosinkinase
SPHK1	Sphingosinkinase 1
SPHK2	Sphingosinkinase 2
SPPase	Sphingosinphosphatase
sRNA	soluble ribonucleic acid
TBE	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan(TRIS)-Borat-EDTA-Puffer
T _M	temperature of melting
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor alpha
tRNA	transfer ribonucleic acid
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
µmol/l	Mikromol pro Liter
V	Volt
VEGF	vascular endothelial growth factor

1 Fragestellung und Zielsetzung

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) ist ein bioaktives Lysophospholipid, das über Lysophosphatsäuren homöostatisch reguliert wird. Es beeinflusst viele zelluläre Vorgänge wie Proliferation, Migration, Apoptose und wachstumsabhängige Prozesse.

S1P bindet an fünf verschiedene G-Proteine, die zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören. Die Bindung von S1P an seine Rezeptoren aktiviert in der Zelle verschiedene Transkriptionsfaktoren und beeinflusst darüber hinaus Stoffwechselfvorgänge in der Zelle (Mitra et al. 2007). Eine besondere Rolle spielt das S1P als Ligand für den S1P₁-Rezeptor bei den T-Lymphozyten, da über dessen Signal die Ausschleusung von reifen T-Lymphozyten aus dem Thymus erfolgt, so dass diese in den Blutstrom gelangen (Allende et al. 2004). Eine ähnliche Ein- und Auswanderung aus dem Blutstrom wie die Lymphozyten durchlaufen metastasierende Tumorzellen. Zur Auswanderung von Lymphozyten aus dem Blutstrom sind zudem E- und P-Selektin notwendig (Welsch 2006). Um zu untersuchen, ob in Analogie zu den Lymphozyten bei der Auswanderung aus dem Thymus auch bei der Auswanderung von Tumorzellen aus dem Primärtumor in den Blutstrom hinein ähnliche Mechanismen vorliegen, sind die S1P-Rezeptoren beim kleinzelligen Bronchialkarzinom untersucht worden. Dieser Tumor ist ausgewählt worden, weil er besonders früh und ausgedehnt metastasiert. Zudem sind Xenograftspontanmetastasenmodelle etabliert, die unterschiedlich stark metastasieren.

Die Untersuchung in der vorliegenden Arbeit umfasst fünf Zelllinien des kleinzelligen Bronchialkarzinoms (OH1, OH3, H69, H82 und SW2) in Bezug auf die Expression von S1P₁₋₅. Mit Hilfe der relativen Quantifizierung einer Real-Time-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) erfolgt die Untersuchung am LightCycler.

Die Untersuchung ist an kleinzelligen Bronchialkarzinom-Zelllinien und den daraus in der immundefizienten Maus (SCID-Maus) gewachsenen Primärtumoren untersucht worden, deren Metastasierungsverhalten in der immundefizienten Maus bekannt ist (Mitchell u. Schumacher 1997). Des Weiteren sollte geklärt werden, ob es Veränderungen im Expressionsprofil dieser Rezeptoren im Vergleich der Zelllinien zum resultierenden Primärtumor in der Maus gibt.

Es ist offen, ob eine Korrelation zwischen der Expression dieser Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren und der Tumorprogression und Metastasierung besteht. Durch die vorliegende Arbeit soll ein besseres Verständnis für die Signal- und Aktionsprofile der S1P-Rezeptoren in Bezug auf das kleinzellige Bronchialkarzinom erreicht werden.

2 Einleitung

2.1 Das Bronchialkarzinom

Der Begriff Karzinom bezeichnet bösartige Tumore, die im Epithelgewebe ihren Ursprung nehmen (Horn 2009). Sie entstehen durch die Entartung körpereigener Zellen aufgrund einer Störung bei der normalen Regulierung der Proliferation. Bei bösartigen Tumoren kommt es zu einer Zerstörung und Infiltration in das gesunde Gewebe und Bildung von Metastasen in verschiedenen Organen. Als Grund dieser Entartung sind Mutationen von Genen bzw. Proteinen zu nennen, die für die Wachstumsfaktoren und für die Signaltransduktion der Wachstumsfaktoren zuständig sind.

Die Entartung und Entstehung eines Tumors bedeutet nicht, dass sich automatisch Metastasen bilden. Hierfür sind spezielle Mechanismen notwendig, um diese Zellwanderung (Metastase = Wanderung) einzuleiten (s. 2.2). Es werden dafür Enzyme wie z.B. Prokollagenase IV benötigt, die die Adhäsion von Tumorzellen an zelluläre und extrazelluläre Matrixbestandteile des umgebenden Gewebes fördern und so die Proteolyse von Zellbarrieren unterstützen. Einige Tumore hemmen die Expression von Cadherinen, die für die Interaktion von Zell-Zell-Kontakten zuständig sind. Durch diese Hemmung oder die Proteolyse von Zellbarrieren wird die Einleitung der Tumorzellfortbewegung unterstützt und die Proliferation der Metastasierung im Zielorgan ermöglicht (Löffler et al. 2007, Böcker et al. 2008).

Am Bronchialkarzinom sind 2005 in Deutschland 45000 Menschen erkrankt und in derselben Zeit sind 40600 Patienten an Lungenkrebs verstorben. Bei Männern ist das Bronchialkarzinom die häufigste Krebstodesursache, bei den Frauen ist der Anteil mit zurzeit 10% Krebstodesursache ansteigend. Der Altersdurchschnitt liegt zwischen 70 bis 85 Jahren. Der Hauptrisikofaktor für die Erkrankung an Lungenkrebs ist zu 85-90% der Tabakkonsum (Deppermann 2011).

Das Bronchialkarzinom wird nach folgenden histologischen Gruppen unterschieden mit der in Prozent angegebenen Häufigkeitsverteilung (Aebert et al. 2008):

- Plattenepithelkarzinom (30-40%)
- Adenokarzinom (30-40%)
- Kleinzelliges Karzinom (20-30%, zuletzt sinkend)
- Großzelliges Karzinom und großzelliges neuroendokrines Karzinom (10%)
- Adenosquamöses Karzinom (4%)
- Sarkomatoides Karzinom (0,3-1,3%)
- Mukoepidermoides Karzinom und Adenoidzystisches Karzinom (<1%)

Im klinischen Alltag findet die Unterscheidung bisweilen in nicht-kleinzellige Karzinome (NSCLC = non small cell lung cancer) und in kleinzellige Karzinome (SCLC = small cell lung cancer) statt (Starke 2006).

In dieser Arbeit werden Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren (s. 2.3) des kleinzelligen Bronchialkarzinoms untersucht.

2.1.1 Das kleinzellige Bronchialkarzinom

Das kleinzellige Bronchialkarzinom (SCLC) ist ein Subtyp des Bronchialkarzinoms. Insgesamt wird die Anzahl der Neuerkrankungen als sinkend beschrieben. 1993 hatte das kleinzellige Bronchialkarzinom in den USA einen Anteil von 25% der Neuerkrankungen an Lungenkrebs. Neueste Studien beschreiben den Anteil des kleinzelligen Bronchialkarzinoms von 13 % unter den Lungenkrebserkrankungen. Auch hier wird als Hauptursache der Tabakkonsum benannt, die sinkenden Zahlen sind durch Änderung der Rauchergewohnheiten und durch Änderung der Zigaretten (Filter) zu erklären. Mit rund 30000 Neuerkrankungen/ Jahr in den USA ist das kleinzellige Bronchialkarzinom trotzdem nicht zu vernachlässigen, da es in den Kliniken als sehr schwierig zu therapieren gilt (Ganti et al. 2010).

Histologisch werden kleine Tumorzellen mit spärlichem Zytoplasma, unscharfen Zellgrenzen, feingranulärem Kernchromatin und weitgehendem Fehlen von Nukleolen beschrieben. Die Kerne sind rund, oval oder spindelförmig. Nekrosen werden typischerweise als ausgedehnt beschrieben und die Mitoserate ist sehr hoch (Aebert et al. 2008, Ganti et al. 2010).

Die Epithelzellen sind neuroektodermalen Ursprungs, wodurch sich verschiedene Eigenschaften von Nervenzellen erklären lassen (Onganer et al 2005).

Das kleinzellige Bronchialkarzinom zeichnet sich durch ein schnelles Wachstum und einer frühen Metastasierung aus, die in den meisten Fällen vor der Diagnostik schon besteht.

Dadurch besteht die Therapie meistens nur in palliativen Maßnahmen (Chirurgie, Chemotherapie, Bestrahlung) (Muguruma et al. 2005, Onganer et al. 2005). Trotz eines zunächst guten Ansprechens auf Chemotherapeutika (Watkins et al. 2003) erfolgt die Metastasierung früh über den hämorrhagischen Weg, so dass 90 % der Fälle zum Tode führen (Yano et al. 1996). Die 5-Jahresüberlebensrate liegt für das kleinzellige Bronchialkarzinom nur bei 5-7% (Worden u. Kalemkerian 2000, Murray u. Turrisi 2006), die mittlere Überlebenszeit nach der Diagnosestellung beträgt 8-13 Monate unter therapeutischen Maßnahmen (Pollock u. Garon 2010, Cooper u. Spiro 2006). Daher gilt das kleinzellige Bronchialkarzinom als äußerst aggressiv (Watkins et al. 2003).

Die Zielregionen der Metastasen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms sind hauptsächlich die Knochen, die Leber und das Gehirn. Neben der klinischen Manifestation des Haupttumors in der Lunge mit Lymphknotenbeteiligung im Mediastinum und Metastasierung können andere Symptome bzw. auch Erkrankungen mit dem kleinzelligen Bronchialkarzinom in Verbindung gebracht werden. Sehr häufig liegen eine ungünstige ADH-Sekretion, das Cushing-Syndrom, subakute zerebrale Degeneration und das Lambert-Eaton-Rooke-Syndrom vor (Worden u. Kalemkerian 2000).

Die klinische Einteilung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms erfolgt selten nach der TNM-Klassifikation, sondern wird in „limited“ versus „extensive disease“ klassifiziert. Diese Klassifikation wird unterschiedlich definiert. In dieser Arbeit wird sie nach der Veteran's Administration Lung Cancer Study Group definiert (Murray u. Turrisi 2006):

Das Stadium „limited disease“ ist definiert als Tumorlokalisation, beschränkt auf einen Hemithorax mit regionaler supraclaviculärer Lymphknotenbeteiligung und Mediastinum-beteiligung bezogen auf die betroffene Körperhälfte (Micke et al. 2002). In diesem Stadium können durch eine initiale Chemotherapie und anschließende Bestrahlung die besten therapeutischen Ergebnisse für die SCLC-Behandlung für ein längeres Überleben verzeichnet werden (Murray u. Turrisi 2006).

Das Stadium „extensive disease“ beschreibt alle Tumorlokalisationen, die über das „limited disease“ Stadium hinaus geht (Micke et al. 2002). Rund 60-70% der Patienten befinden sich bei Diagnosestellung durch die frühe Metastasierung im „extensive disease“ Stadium, wodurch nur noch eine palliative Therapie erfolgen kann (Murray u. Turrisi 2006).

Eine weitere Einteilung geht aus den experimentellen Studien hervor, in denen der „klassische“ vom „varianten“ Zelllinien-Typus unterschieden wird. Es gibt 50 verschiedene Zelllinien des kleinzelligen Bronchialkarzinoms, von denen 35 zum

„klassischen Typ“ und 15 zum „varianten Typ“ gehören. Diese Einteilung bezieht sich auf biochemische Eigenschaften kultivierter Zelllinien. Für diese Bezeichnungen ist die Expression von vier Biomarkern (L-Dopa Decarboxylase, bombisin-like Immunoreaktivität, Neuronenspezifische Enolase und CK-BB) untersucht worden. Die „klassischen“ Zelllinien exprimieren für alle vier Marker erhöhte Level. Bei den „varianten“ Zelllinien werden nur erhöhte Level für die Neuronenspezifische Enolase (NSE) und für CK-BB exprimiert, es lässt sich aber keine Immunaktivität für L-Dopa Decarboxylase und bombisin-like nachweisen (s. 2.1.1) (Gazdar 1985).

Die Anwesenheit von NSE und CK-BB lässt die Unterscheidung von „klassischen“ und „varianten“ Zelllinien zum Nicht-kleinzelligen Karzinom zu, das diese nicht aufweist (Carney et al. 1985).

Unbehandelt ist die Prognose für SCLC sehr schlecht. Die mittlere Überlebenszeit unbehandelt für den SCLC „limited disease“ ist drei Monate, für das Stadium der „extensive disease“ beträgt diese nur 2 Monate (Murray u. Turrisi 2006).

2.2 Metastasenbildung

Vor der Metastasenbildung findet die Invasion der Tumorzellen aus dem Primärtumor in das umliegende Gewebe statt. Die Invasion lässt sich in drei Hauptschritte unterteilen:

- *Die Auflösung von Zell-Zell-Kontakten:* Die Auflösung erfolgt durch Verminderung oder Verlust von Haftstrukturen, z.B. Verlust/Verringerung der Expression von Cadherinen. Auch Wachstumsfaktoren, die die Cadherine phosphorylieren, können zur Auflösung von Zellkontakten führen.
- *Die enzymatische Degradation und Umbau extrazellulärer Gewebematrix:* Die Degradation beschreibt die temporäre und reversible Auflösung von extrazellulärer Matrix (z.B. Basalmembran). Hierbei sind degradierende Enzyme von entscheidender Bedeutung, wie z.B. Metalloproteinasen, Serinproteasen, Cysteinproteasen, Heparanasen, Hyaluronidasen und Proteoglykanasen. Diese degradierenden Enzyme können vom Tumor und von körpereigenen Zellen durch Inhibitoren gehemmt werden. Bei einer Regulationsstörung dieser Hemmung findet Tumorwachstum statt.
- *Die aktive Bewegung (Lokomotion) der Tumorzellen:* Mit Hilfe des Aktinfilamentsystem erfolgt eine Bewegung in die enzymatisch eröffneten Geweberäume. Dabei heften sich membranständige, extrazelluläre Tumormatrix-

Rezeptoren (Integrine und Hyaluronsäurerezeptoren) an die Komponenten der Basalmembran und des Stromas (Kollagene, Laminin, Fibronectin oder Vitronectin). Durch die Anheftung erfolgt gleichzeitig eine Signalgebung an die Zelle, wodurch weitere degradierende Enzyme produziert werden.

Die Metastasierung (Verschleppung) der Tumorzellen erfolgt im Anschluss der Invasion auf verschiedenen Wegen: lymphogen, hämatogen oder kavitär. Die ablaufenden Vorgänge verlaufen über eine Kaskade in mehreren Schritten. Dabei kommt es zu verschiedenen Interaktion mit dem immunologischen und spezifischen Tumorabwehrsystem des Organismus.

In der Metastasierungskaskade (vgl. Abb. 1) können folgende Schritte unterschieden werden:

- Eindringen in die Metastasierungswege (*Intravasation*) über die Lymphwege, über das Blut oder über Körperhöhlen.
- *Verschleppung* der Tumorzellen über die Lymphe, das Blut oder Körperflüssigkeiten.
- Austritt aus den Metastasierungswegen (*Extravasation*) erfolgt über verschiedene Mechanismen des Körpers, z.B. über Thrombusbildung (Tumorzellembolus) um die Tumorzellen herum. Eigentlich als Schutzmechanismus des Körpers gedacht, dient der Thrombus der Anheftung der Tumorzellen an die Gefäßwand des Zielorgans.

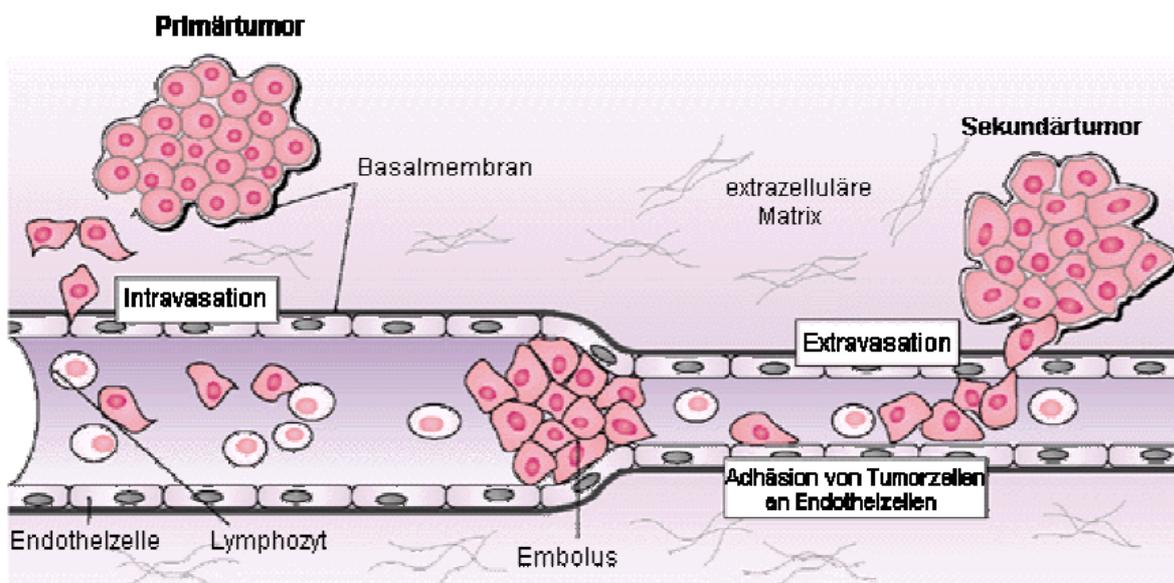


Abbildung 1: Metastasierungskaskade: Darstellung der Metastasenbildung durch Intravasation, Verschleppung und Extravasation von Tumorzellen (Ziegelschmid 2003).

Die Metastasierungswege des kleinzelligen Bronchialkarzinoms erfolgen hämatogen (Yano et al. 1996). Die hämatogene Metastasierung erfolgt über die Invasion in Kapillaren und kleinen Venen. Es folgt eine hämatogene Verschleppung, Anheftung im Kapillarbett des nachfolgenden Organs und eine Emigration aus den Gefäßen. Je nach weiterleitendem Gefäßsystem werden der Cava-Typ, der Pfortader-Typ, der Lungenvenentyp und der vertebral-venöse Typ unterschieden. Das kleinzellige Bronchialkarzinom gehört zum Lungenvenentyp, da der Primärtumor in der Lunge sitzt und über die Lungenvenen in den linken Ventrikel und von dort in den Organismus weitergeleitet wird.

Die Metastasierung erfolgt meistens in spezielle Zielorgane, die nicht allein über die Wege der Tumorzellen erklärt werden können. Dabei spielen Membranrezeptoren eine besondere Rolle, die an spezifische Oberflächen mit den dazugehörigen Liganden binden (Böcker et al. 2008).

2.3 Sphingosin-1-Phosphat

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) ist ein bioaktives Lysophospholipid (s. Abb. 2; Ishii et al. 2004), das über Lysophosphatsäuren homöostatisch reguliert wird und pleiotrop biologische Prozesse im Organismus steuert. Physiologische Prozesse bezogen auf das Herz-Kreislaufsystem, Nervensystem, Geschlechtsorgane und Immunsystem werden ebenso wie pathologische Prozesse wie Krebs, Immunerkrankungen und Allergien durch das S1P beeinflusst (Mitra et al. 2007).

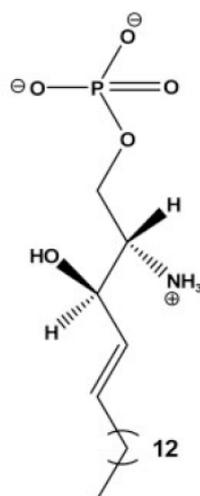


Abbildung 2: Chemische Darstellung eines S1P-Moleküls (Ishii et al. 2004)

Das S1P wurde 1884 von dem Naturforscher Johann L.W. Thudichum als Bestandteil der weißen und grauen Hirnmasse beschrieben. Thudichum gab diesem neuen Molekül das Präfix „Sphingo“ nach der Sphinx aus der griechischen Mythologie, da er es zu keiner ihm bekannten Stoffklasse zuordnen konnte (Thudichum 1884).

Die Konzentration von S1P im Serum liegt bei 0,5-0,8 μM und in gebundener Form an Albumin oder Lipoproteinen vor. Im Plasma liegt die Konzentration mit 0,2-0,5 μM geringer vor (Taha et al. 2004, Ishii et al. 2004). Andere Autoren beschreiben die Konzentrationen etwas höher: im Serum 0,4-1,1 $\mu\text{mol/l}$, im Plasma 0,1-0,6 $\mu\text{mol/l}$ und die Konzentration im Gewebe liegt zwischen 0,5-75 pmol/mg (Oskeritzian et al. 2007).

S1P hat verschiedene Aufgaben im Organismus. Hauptsächlich zu nennen sind regulatorische Aufgaben, zu denen anti-Apoptose und Apoptose, Proliferation, Organisation des Zytoskelettes, Regulation des zellulären Calcium-Haushaltes und die Zellmigration gehören. Diese können in intrazelluläre und extrazelluläre Aufgaben unterschieden werden. Bei den intrazellulären Aufgaben dient S1P als second messenger und übernimmt bestimmte Zellfunktionen, wie z.B. Aktivierung von Wachstum und Hemmung von Apoptose. Im Rahmen der extrazellulären Aufgaben dient S1P als Ligand für extrazelluläre Rezeptoren (s. 1.4) (Pyne u. Pyne 2000, Spiegel u. Milstien 2002, 2003, Zhao et al. 2007).

Die Biosynthese des S1P erfolgt aus Ceramiden hauptsächlich in Mastzellen, Thrombozyten und Monozyten. Die Ceramide können auf zwei Wege synthetisiert werden: Zum einen werden sie über die de-novo-Synthese im endoplasmatischen Retikulum (Spiegel u. Milstien 2003) aus Serine und Palmitoyl-CoA gebildet, zum anderen über bereits bestehendes Sphingomyelin. Das Sphingomyelin ist ein Sphingolipid, welches wiederum aus Palmitoyl-CoA und Serine gebildet wird (Pyne u. Pyne 2000). Das Sphingomyelin wird durch die Sphingomyelin-Phosphodiesterase unter Abspaltung eines Phosphocholinrestes zu einem Ceramid. Durch die Ceramidase wird es zum Sphingosin hydrolysiert, welches durch die Sphingosinkinase und Verbrauch eines ATP-Moleküls zu S1P wird (s. Abb. 2). Es gibt zwei verschiedene Sphingosinkinasen: Typ 1 (SPHK1) und Typ 2 (SPHK2) (Alvarez et al. 2007, Spiegel u. Milstien 2002). SPHK1 hemmt z.B. die durch Stress aktivierte Proteinkinase Jun amino-terminal-Kinase (JNK), wodurch eine Apoptose der Zelle verhindert wird (Spiegel u. Milstien 2003).

Der Abbau des S1P erfolgt entweder irreversibel über die S1P-Lyase, woraus Palmitaldehyde und Phosphoethanolamine entstehen. Das S1P kann zum anderen reversibel (Spiegel u. Milstien 2003) durch die S1P-Phosphatase in Sphingosin

dephosphoryliert werden (Pyne u. Pyne 2000). Die Homöostase von S1P erfolgt demnach über die Sphingosinkinase und die S1P-Lyase bzw. -Phosphatase. Hauptsächlich sind Ceramide, Sphingosine und S1P für das Zellwachstum und die Hemmung der Apoptose verantwortlich (s. Abb.3.).

S1P stimuliert Zellproliferation, Angiogenese und das Überleben der Zelle, wobei Sphingosin und Ceramide die Zellproliferation hemmen und die Apoptose fördern (s. Abb.3) (Kawamori 2009):

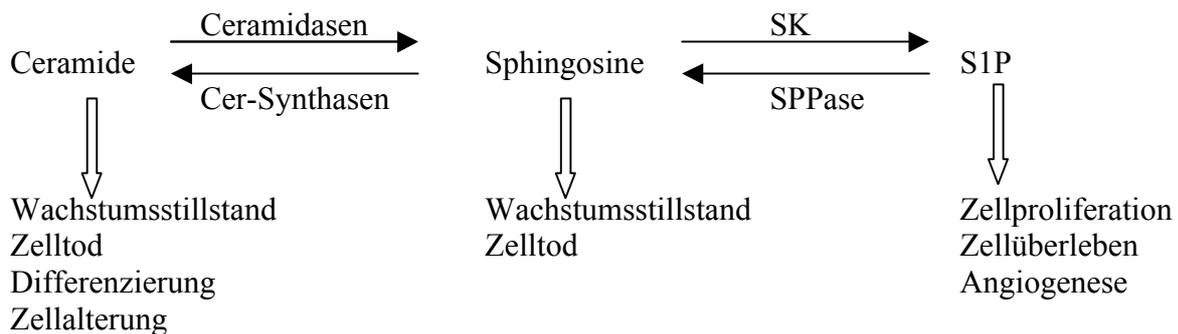


Abbildung 3: Auf- und Abbau von S1P und deren Auswirkung auf die Zelle: Ausgangsprodukt für die S1P-Synthese sind die Ceramide, die durch verschiedene Enzyme über das Zwischenprodukt Sphingosin zu S1P umgewandelt werden. Dabei hat jedes Zwischenprodukt wiederum eine bestimmte Funktion für die Zelle. SK=Sphingosinkinase; SPPase=Sphingosinphosphatase; Cer-Synthase=Ceramid-Synthase (Taha et al. 2006).

Dabei wirkt das S1P sowohl autokrin als auch parakrin auf die Zelle und ihre Umgebung (Alvarez et al. 2007).

Wachstumsstimulatoren (PDGF, EGF, VEGF, NGF) und andere Faktoren (wie z.B. Vitamin D3; TNF-alpha, proinflammatorisches Zytokin etc.) aktivieren die Sphingosinkinase, wodurch mehr S1P produziert wird und gleichzeitig der Ceramidspiegel sinkt (Maceyka et al. 2002, Spiegel u. Milstien 2002). Dieses Zusammenspiel wird auf zellulärer Ebene als Ceramid-Sphingosin-Rheostat beschrieben (Spiegel 1999). Kritischer Faktor dieses Rheostats ist die Sphingosinkinase Typ 1, die nicht nur die anti-apoptotischen und die pro-Wachstums-Faktoren produziert, sondern auch die pro-apoptotischen Faktoren reduziert (Mittra et al. 2007). Es ist bewiesen, dass die Sphingosinkinase Typ 1 vermehrt in Tumorzellen vorkommt und dass es teilweise auch zu einer Überexpression von Sphingosinkinase Typ 1 kommt. Daher wird die Sphingosinkinase Typ 1 auch als Onkogen diskutiert (Kawamori et al. 2009).

Außerdem zu erwähnen sind Dihydrosphingosin- und Phytosphingosin-1-Phosphat. Sie dienen als spezifische Liganden neben S1P für S1P₄.

Das Dihydro-S1P ist ein Intermediat des Sphingosinstoffwechsels. Es besitzt außer einer 4,5-Doppelbindung dieselbe Struktur wie S1P (Spiegel u. Milstien 2003).

Ein weiterer Abkömmling ist das Phyto-S1P, das durch Phosphorylierung des Phytosphingosins entsteht. Es ist eine Komponente der Zellmembran und es bestehen strukturelle Ähnlichkeiten zu S1P (Lynch u. Macdonald 2008).

2.4 Spingosin-1-Phosphat-Rezeptoren

Wie bereits unter Punkt 2.2 beschrieben, stellt das S1P einen Liganden für einen Rezeptor dar. Insgesamt gibt es fünf Rezeptoren, die Sphingosin-1-Phosphat₁₋₅-Rezeptoren, früher auch unter EDG (endothelial differentiation genes)-Rezeptoren (1, 5, 3, 6, 8) bekannt (Ishii et al. 2004).

Die S1P-Rezeptoren gehören zu der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (G-Protein=Guaninnucleotid-bindendes Protein). G-Proteine sind heptahelicale Membranrezeptoren mit sieben Transmembrandomänen. Sie bestehen aus 350-800 Aminosäuren. G-Proteine dienen als molekulare Schalter bei der Signaltransduktion (Löffler et al. 2007). Sie regulieren viele zelluläre Funktionen: Zellproliferation und Zellüberleben, Zellmigration und Chemotaxis, Auf- und Abbau des Zytoskelettes, Zell-zu-Zellkontakte und Zelladhäsion; Regulation des Calcium-Haushaltes und Calcium-abhängige Funktionen (s. 2.3 u. Abb.4) (Meyer zu Heringdorf u. Jakobs 2007)

G-Proteine liegen in unterschiedlichen Aktivierungsformen vor, einer aktiven und einer inaktiven Form, die sich nur an dem jeweils gebundenen Guaninnucleotid unterscheiden. Für die Überführung von einem inaktiven (GDP=Guaninnucleotid-di-Phosphat) in einen aktiven Zustand (GTP=Guaninnucleotid-tri-Phosphat) wird die GTPase benötigt. Sie wird durch Bindung eines Liganden am aktiven Zentrum des Rezeptors aktiviert, wodurch GDP durch GTP ausgetauscht wird. Die Ligandenbindung kann extrazellulär, transmembranär oder an intrazellulären Domänen erfolgen.

Drei Gruppen von G-Proteinen werden unterschieden: große heterotrimere G-Proteine mit alpha-, beta- und gamma-Untereinheiten, kleine G-Proteine und andere G-Proteine. Zu den heterotrimeren G-Proteinen gehören die G_i-Proteine, die die Adenylatcyclase (AC) hemmen, die G_o- und G_q-Proteine, die die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) auslösen und die G_{12/13}-Proteine, die die Aktivierung der Rho-Kinase auslösen.

Zu den kleinen G-Proteinen gehören die Ras-Proteine, die Wachstum, Differenzierung und Genexpression hervorrufen und die Rho- und Rac-Proteine, die für die Organisation des Zytoskelettes und die Genexpression zuständig sind.

Wird GDP gegen GTP ausgetauscht, erfolgt eine Konformationsänderung des G-Proteins und es werden verschiedene Enzyme aktiviert.

Diese sind zum einen die Adenylatcyclase, die als sekundären Botenstoff das cAMP aktiviert, welches über die Aktivierung der Proteinkinase A direkt Einfluss auf verschiedene Proteine des Stoffwechsels der Zelle ausübt (z.B. Glukosemolekülfreisetzung) (s. Abb. 4).

Ein weiteres ist die Phospholipase C, die eine wichtige Rolle für die Freisetzung von Calcium in der Zelle übernimmt (s. Abb. 4).

Die Aktivierung der Rho-Kinase hat als weiteren Effekt Einwirkungen auf das Zytoskelett der Zelle.

Der Ras-Weg erfolgt weiter über die Mitogen-aktivierte Protein-Kinase (MAP-Kinase), die dann im Zellkern weitere Gene aktiviert. Die MAP-Kinase wird in zwei Gruppen aufgeteilt, die extracellular signal regulated kinases 1 und 2 (ERK1 und ERK2), wobei die ERK1 und ERK 2 zu den Kinasen gehören, die wachstumsfördernde Prozesse aktivieren (s. Abb.4). Viele Tumore haben eine Mutation im Ras-Protein, welches zu einer dauerhaften Aktivierung und Zellstimulation führen kann (Löffler et al. 2007, Horn 2009).

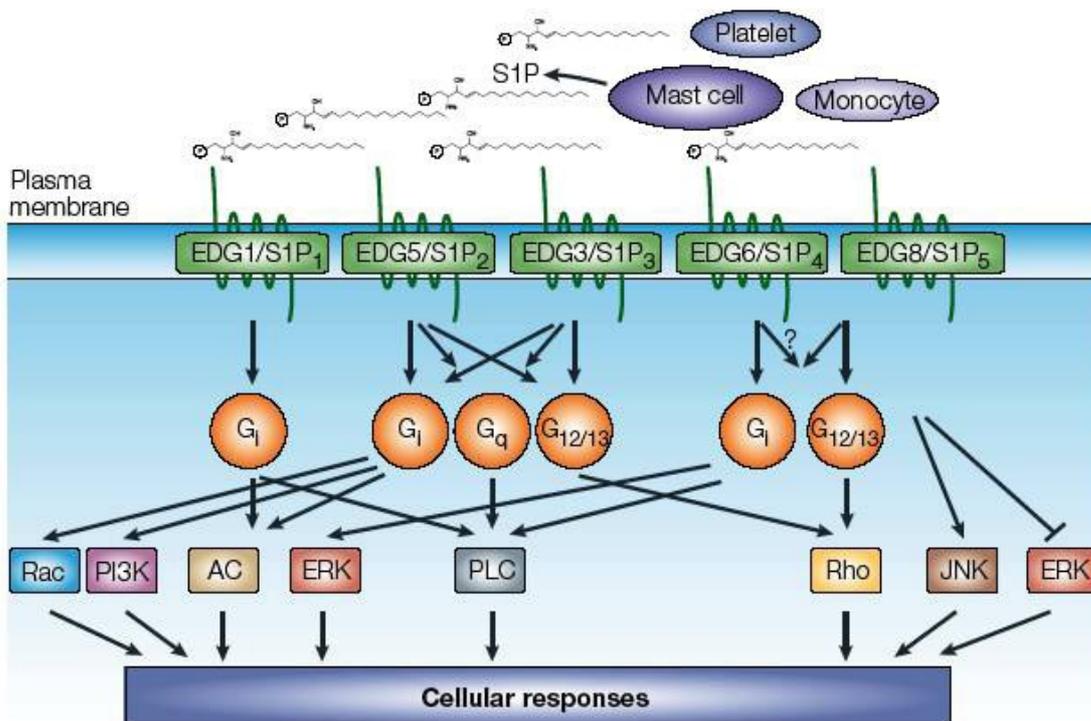


Abbildung 4: Mögliche Signalwege der 5 G-Protein gekoppelten Rezeptoren:

Das S1P im Serum, welches in Mastzellen, Monozyten und Blutplättchen gebildet wird, bindet an spezifische Rezeptoren der S1P-Rezeptorfamilie. Über die G-Protein-Rezeptoren werden dann hemmende oder aktivierende Signalwege in der Zelle aktiviert. Wie nachfolgend bei den Erklärungen der Rezeptoren (s. 2.3.1-2.3.5) sind es spezifische G-Proteine, die den Signalweg in der Zelle aktivieren (z.B. EDG1/S1P₁ aktiviert über das G_{i/o}-Protein, EDG3/S1P₃ aktiviert über G_{i/o}, G_q und G_{12/13}). Über die Aktivierung der spezifischen G-Proteine wird dann über weitere spezifische Proteine und Enzyme der Signalweg (z.B. über ERK) vermittelt bis hin zur zellulären Antwort (über ERK werden wachstumsfördernde Prozesse eingeleitet) (Spiegel 2003).

2.4.1 Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 1

Der Sphingosin-1-Phosphat₁-Rezeptor (S1P₁ = EDG-1) ist als erster S1P-Rezeptor entdeckt worden. Er ist überall im Organismus vorhanden, einschließlich Milz, Gehirn, Herz, Lunge, Fettgewebe, Leber, Niere, Skelettmuskulatur, Thymus und T-Lymphozyten (Pyne u. Pyne 2000, Allende et al. 2004). Dabei ist S1P₁ einzig, da der Signalweg nur über das G_{i/o}-Protein verläuft mit einer hohen Bindungsaffinität zu S1P von K_D=8 nM (Pyne u. Pyne 2000). Dieses Protein reguliert viele zelluläre Funktionen, wie die Aktivierung und Proliferation von ERK, Aktivierung und Fortbestehen der Proteinkinase B (PKB) und Aktivierung von Rac und Migration, Aktivierung der MAP-Kinase und Phospholipase C und Hemmung der Adenylatcyclase. Des Weiteren wird der Calcium-Haushalt positiv hinsichtlich der Calcium-Stimulation beeinflusst. Diese Funktionen führen zu einer Aktivierung der Zelle hinsichtlich Migration, sie stimuliert die Angiogenese und die

Steuerung der Lymphozyten (Meyer zu Heringdorf u. Jakobs 2007, Ishii et al. 2004, Allende et al. 2004).

2.4.2 Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 2

Der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 2 ($S1P_2 = \text{EDG-5}$) ist wiederum überall im Organismus vorhanden. Der Signalweg wird über verschiedene G-Proteine ($G_{i/o}$ -, G_q - und $G_{12/13}$ -Protein) vermittelt mit einer hohen Bindungsaffinität ($K_D = 20\text{-}27 \text{ nM}$) zu S1P (Pyne u. Pyne 2000). Bei der Bindung werden die Phospholipase C, die MAP-Kinase und die Adenylatcyclase aktiviert, die Calcium-Konzentration steigt an und die EKR wird stimuliert. Des Weiteren wird Rac inaktiviert und Rho aktiviert, was zu einer Stresssituation der Zelle führt und wodurch die Migration vieler Zellen (z.B. auch Melanomzellen) gehemmt wird (Arikawa 2003). Die Zellproliferation, die anti-Apoptose und der Zellzyklus werden gefördert. Die Differenzierung von glatter Muskulatur wird gesteigert und es besteht ein Mitwirken an der Gefäßneuentwicklung (Meyer zu Heringdorf u. Jakobs 2007, Ishii et al. 2004).

2.4.3 Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 3

Ähnlich zu $S1P_2$ ist der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 3 ($S1P_3 = \text{EDG-3}$) überall im Organismus vorhanden. Hier wird der Signalweg über $G_{i/o}$ -, G_q - und $G_{12/13}$ -Protein vermittelt. Die Bindungsaffinität zu S1P ist hoch ($K_D = 20\text{-}27 \text{ nM}$) (Pyne u. Pyne 2000). $S1P_3$ ähnelt entwicklungsbedingt dem $S1P_1$, die intrazellulären Signale sind allerdings dem $S1P_2$ -Rezeptor ähnlicher, bis auf die Aktivierung von Rac (Ishii et al. 2004). Bei der Bindung wird die Phospholipase C und MAP-Kinase aktiviert. Die Adenylatcyclase kann aktiviert oder inaktiviert werden. Die Calcium-Konzentration steigt an und die ERK wird stimuliert. Des Weiteren werden Rho und Rac aktiviert. $S1P_3$ gekoppelte Proteine können zu einer Stickstoffmonoxid-abhängigen Vasodilatation führen und sie können den Kalium-Zustrom angleichen, so dass es zu einer Verlangsamung des Herzschlages kommen kann. Sie haben einen großen Effekt bei der Angiogenese (Meyer zu Heringdorf u. Jakobs 2007, Ishii et al. 2004).

2.4.4 Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 4

Der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 4 (S1P₄ = EDG-6) befindet sich an Leukozyten und T-Zellen (Wang et al. 2005, Allende et al. 2004) und kommt außerdem im lymphatischen Gewebe, in der Milz, im Thymus und in der Lunge vor (Graeler et al. 1998). Der Rezeptor hat zum Liganden S1P eine geringere Affinität ($K_D = 13-63$ nM). Zu phyto-S1P und dihydro-S1P hingegen hat er eine 50fach erhöhte Affinität. Der Signalweg wird über G_{i/o}- und G_{12/13}-Proteine vermittelt. Der Rezeptor bewirkt so eine Aktivierung von Phospholipase C, MAP-Kinase, Adenylatcyclase, Rho und eine Anhebung des ERK sowie des intrazellulären Calcium-Spiegels. S1P₄ hat keinen Einfluss auf Zellmigration und Chemotaxis, es hemmt das Zellwachstum und die Sekretion von entzündungsfördernden Zytokinen in T-Zellen (Meyer zu Heringdorf u. Jakobs 2007). So wird in den Zellen die Neustrukturierung und die Zellbeweglichkeit gefördert (Ishii et al. 2004).

2.4.5 Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 5

Der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 5 (S1P₅ = EDG-8) kann an Zellen des Gehirns und der Milz sowie im speziellen an natürlichen Killerzellen (Takabe et al. 2008), an Oligodendrozyten und Hautzellen (z.B. auch in der Mukosa der Speiseröhre (Hu et al. 2010)) nachgewiesen werden. Der Signalweg von S1P₅ wird über G_{i/o}- und G_{12/13}-Proteine vermittelt. Die Bindungsaffinität zum Liganden S1P ist mit $K_D = 2-10$ nM relativ hoch (Im et al. 2000; Ishii et al. 2004), wobei die Anwesenheit von S1P hemmend auf den Rezeptor wirkt (Hu 2010).

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass S1P₅ in Abhängigkeit des aktivierten G-Proteins über die jeweilige Signalkaskade unterschiedliche intrinsische Effekte auf die Zelle haben kann (Hu et al. 2010). Zum einen erfolgt über das G_{12/13}-Protein und dessen Inaktivierung von Rho die Hemmung der Migration. Zum anderen erfolgt eine Stimulation der Zellmigration durch S1P₅ über das G_{i/o}-Protein durch Rac. Diese Vorgänge sollen auch ohne Ligandenstimulation ausgelöst werden können (Hu et al. 2010).

Durch Aktivierung von S1P₅ wird die Adenylatcyclase gehemmt. Dies hat einen negativen Einfluss auf die ERK und des Zellwachstum. S1P₅ fördert die Calcium-Mobilisation. Im Gegensatz zu den anderen S1P-Rezeptoren hemmt S1P₅ die MAP-Kinase-Aktivierung und die Zellproliferation (Ishii et al. 2004). Es hat zudem Einfluss auf die Oligodendrozyten, wobei festgestellt worden ist, dass der Einfluss abhängig vom Differenzierungsgrad der Zelle ist (Meyer zu Heringdorf u. Jakobs 2007).

2.5 Zusammenfassung und Ausblick

Das bioaktive Lysophospholipid S1P ist für viele Mechanismen im menschlichen Körper verantwortlich. Es reguliert essentielle Funktionen, die den Kreislauf der einzelnen Zellen beeinflussen. So ist bereits speziell die Rolle des S1P mit dem S1P₁-Rezeptor bei der Ausschleusung der T-Lymphozyten erwähnt worden.

Bei bösartigen Tumoren geschieht ähnlich zu der Ausschleusung der T-Lymphozyten ebenfalls eine Zellausschleusung bei der Metastasierung. Die genauen Mechanismen der Metastasierung sind bezogen auf das untersuchte kleinzellige Bronchialkarzinom nicht geklärt.

Das kleinzellige Bronchialkarzinom ist eines der aggressivsten Krebsformen, die auftreten können. Dies wird vor allem durch die frühe Metastasierung und der zeitlich bedingten späten Manifestierung der Erkrankung bestimmt. Daher ist es von besonderem Interesse die genauen Metastasierungs Vorgänge bei dieser Krebsart zu erkennen und mit neuen Therapieansätzen eine gezieltere Therapie zu ermöglichen.

Wie bei den T-Lymphozyten wird vermutet, dass S1P mit seinen Rezeptoren dort eine entscheidende Rolle spielen könnte. Die unterschiedlichen Regulationsmechanismen im Bezug auf Wachstum und Differenzierung der Zelle durch S1P und sein Regulationskreislauf sind eingehend beschrieben worden.

Fraglich bleibt, inwieweit der Tumor diese Regulationsmechanismen für sich gebraucht, verändert und nutzt.

Kann durch ein erhöhtes Aufkommen bestimmter Rezeptoren oder ein bestimmtes Zusammenspiel von Rezeptoren eine Spezifität für das kleinzellige Bronchialkarzinom erkannt werden?

Das Ziel dieser Arbeit ist, Zusammenhänge aufzuzeigen, die eventuell später für neue Therapieansätze eine Grundlage bereiten könnten.

3 Material und Methoden

3.1 Material- und Probengewinnung

3.1.1 Zelllinien

In dieser Arbeit sind die Zelllinien OH1, OH3, H69, H82 und SW2 verwendet worden:

- a) OH1, kleinzelliges Bronchialkarzinom gewonnen aus einem Pleuraerguss mit klassischem Phänotyp (Gazdar et al. 1980, Mabry et al. 1988),
- b) OH3, kleinzelliges Bronchialkarzinom gewonnen aus einem Pleuraerguss mit klassischem Phänotyp (Griffin u. Baylin 1985, Mabry et al. 1988),
- c) H69, kleinzelliges Bronchialkarzinom gewonnen aus einem Pleuraerguss mit klassischem Phänotyp (Derbyshire et al. 1992, Carney et al. 1985),
- d) H82, kleinzelliges Bronchialkarzinom gewonnen aus einem Pleuraerguss mit variantem Phänotyp (Carney et al 1985, Mabry et al. 1988),
- e) SW2, kleinzelliges Bronchialkarzinom gewonnen aus einer Knochenmarks-metastase mit variantem Phänotyp (Zimmermann et al. 1997).

3.1.2 Tumore

Die Tumorgewinnung erfolgt durch die Injizierung der Zelllinien in SCID-Mäuse (severe combined immunodeficiency) und der anschließenden Entnahme der Tumore. Der Tumor wird entnommen, wenn das Tier 120 % des Gewichts zu Versuchsbeginn erreicht hat oder der Tumor die Haut ulzeriert hat. Anschließend wird der Tumor in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet.

Die eingebetteten Tumore dienen dem Vergleich der in vivo und der in vitro Ergebnisse.

3.1.3 RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation aus den in der Zellkultur gewachsenen Zelllinien ist das Isolations-Kit „RNeasy Midi Kit“ (Firma Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet worden. Für die RNA-Isolation aus den Tumoren wird das Isolations-Kit „RNeasy FFPE Kit“ (Firma Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet.

In mehreren Wasch- und Zentrifugationsschritten mit verschiedenen Puffern in verschiedenen Trenn- und Bindungssäulen mit unterschiedlicher Silicat-Gelmembran ist aus dem Zelllysat bzw. aus den Paraffinschnitten RNA isoliert worden.

Hierbei ist bei Raumtemperatur gearbeitet und auf Sterilität und RNase-Freiheit geachtet worden.

3.1.3.1 RNA Isolation aus den Zelllinien

Die RNA-Isolation aus den Zelllinien erfolgt mit dem „RNeasy Midi Kit“. Hierbei kann Ausgangsmaterial mit einer Minimalanzahl von 5×10^6 Zellen verwendet werden. Die Säulen des RNeasy Midi Kit können 1 mg RNA binden, die eine Mindestlänge von 200 Basen haben muss, um an der Membran gebunden zu werden. Kleinere Fragmente (< 200 Basen) wie von rRNA, tRNA, 5sRNA werden ausgewaschen und es verbleibt fast ausschließlich mRNA.

Da die verwendeten Zellen schätzungsweise nicht mehr als 1 mg RNA enthalten, ist dieses Isolations-Kit ausgewählt worden.

Zunächst werden die Zellen bei $3000 \times G$ abzentrifugiert und der Überstand aspiriert. Die weitere Aufbereitung erfolgt nach den Herstellerangaben.

Zur Auswaschung der RNA aus den Säulen wird 150-250 μl RNase freies Wasser benutzt (je nach zu erwartender RNA-Menge).

Um die Ausbeute an RNA zu erhöhen, ist zweimalig eluiert worden: zunächst mit 250 μl und folgend mit 100 μl RNase freiem Wasser. So wird eine RNA-Konzentration von 297,89 ng/ μl bis 2687,74 ng/ μl erzielt.

3.1.3.2 RNA-Isolation aus den in Paraffin eingebetteten Tumoren

Die RNA-Isolation aus den in Paraffin eingebetteten Tumoren erfolgt mit dem RNeasy FFPE (formalin fixed, paraffin embedded) Kit. Dieses Kit bewirkt, dass die meisten Veränderungen an der RNA durch das Formaldehyd ohne weitere Degradation behoben werden können. Bereits fragmentierte Teile der RNA werden bei diesem Testverfahren nicht mehr berücksichtigt, da die Längen der RNA Voraussetzung für die Tests sind.

Die in Paraffin eingebetteten Tumore werden in 10 μm dicke Paraffinschnitte geschnitten. Um eine ausreichende Menge an RNA zu erhalten, sind pro Tumor drei einzelne Isolationsvorgänge parallel vollzogen worden, um dreifach gewonnene RNA im Nachhinein wieder zusammenzufügen. Insgesamt sind demnach aus 3×8 Schnitten à 10 μm die RNA gewonnen worden.

Beim Schneiden ist folgendes Vorgehen gewählt worden: Das überstehendes Paraffin ist mit einem Skalpell entfernt worden, das zuvor mit RNase away (Molecular BioProducts,

San Diego; CA, USA) gesäubert worden ist. Der Paraffinblock ist anschließend in ein Mikrotom eingespannt worden. Die Schneidklinge ist ebenfalls zuvor mit RNase away gereinigt worden.

Die ersten 8-10 Schnitte werden stets verworfen, um eine mögliche Kontamination zu vermindern. Die folgenden acht Schnitte sind mit einer ebenfalls gereinigten Pinzette in RNase-freie 2 oder 1,5 ml Tubes platziert und sofort verschlossen worden.

Anschließend wird 1 ml Xylol-Ersatz auf die Schnitte pipettiert und für 10 sek. gevortext, um das Paraffin zu lösen. Es erfolgt eine Zentrifugieren bei höchster Geschwindigkeit für zwei Minuten, damit das Xylol vom entstandenen Pellet abpipettiert werden kann. Die Arbeitsschritte und die weiteren Zentrifugationsschritte erfolgen bei 20-25°C.

Im Weiteren wird nun 1 ml 100%-Ethanol hinzugegeben und zentrifugiert, damit das verbliebene Xylol extrahiert werden kann. Im Folgenden ist gemäß dem Herstellerprotokoll weiter verfahren worden.

Zur Elution der in der Membran der Säule gebundenen RNA wird das im Kit beigefügte RNase freie Wasser genutzt. Dies erfolgt in zwei Schritten, d. h. zweimal 15 µl möglichst direkt auf die Membran ohne Berührung pipettieren und bei Höchstgeschwindigkeit je eine Minute zentrifugieren.

Nun können die drei Lösungen zusammengeführt werden, so dass die Ausbeute der RNA auf ca. 90 µl angehoben werden kann.

3.1.3.3 Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA

Die Konzentration der isolierten RNA wird mittels Photospectrometer (Smart Spec 2000 TM, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) bestimmt. Hierfür werden ca. 100 µl Lösung verwendet. Die Lösung wird auf 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt (90 µl H₂O und 10 µl RNA-Lösung).

Vor der Bestimmung ist das Photospectrometer mit destilliertem Wasser geeicht worden. Die Ergebnisse werden mit der Wellenlänge 260 nm, 280 nm, 320 nm bestimmt. Das Gerät gibt die Konzentrationen in µg/ml an. Die Konzentration wird über die Absorption des Lichtes gemessen. Aufgrund der anfänglich beschriebenen Konzentrationsverdünnung muss das Ergebnis noch mit dem Faktor 10 multipliziert werden.

3.1.4 cDNA-Synthese mittels Reverser Transkription

Für die spätere PCR wird DNA als Produkt benötigt. Daher ist es wichtig, dass die RNA in copy DNA (cDNA) mit Hilfe der reversen Transkriptase umgeschrieben wird.

3.1.4.1 cDNA-Synthese aus der RNA (Kulturzellen)

Bevor die cDNA-Synthese startet, muss ein cDNA-Verdau vorgenommen werden, um cDNA zu eliminieren, die sich vor der Synthese in der RNA-Lösung befindet.

Für die cDNA-Synthese der isolierten RNA wird das „First Strand Transcriptor cDNA Synthesis Kit“ (Firma Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) verwendet. Bei den Zellen aus der Kultur ist es wichtig stets die gleiche Menge an RNA einzusetzen, nämlich 1500 ng. Um die benötigte Menge an RNA zu ermitteln, muss also mittels Konzentrationsbestimmung (s. 3.1.3.3) die ermittelte RNA in ng/μl durch 1500 dividiert werden, um die einzelnen Mengen in μl zu erhalten.

Als Primer werden Anchored-oligo(dt)18-Primer verwendet. Diese Primer binden spezifisch an RNA mit einem Poly-A-Schwanz und können die cDNA in voller Länge synthetisieren.

Je nach Anzahl der Proben wird ein Mastermix hergestellt.

Tabelle 1: Erster Ansatz zum cDNA-Verdau

cDNA-Puffer	5,0 μl
RNA	40 μl
PCR water grade	4,0 μl
DNase (DNaseI, RNase-free)	1,0 μl
ad	50 μl = 5x10 μl (pro 10 μl sollen 1,5 μg RNA vorhanden sein)
Im Thermocycler (Personal Cycler, Biometra, Göttingen, Deutschland) 20 min. bei 25°C, dann 10 min. bei 75°C.	

Tabelle 2: Zweiter Ansatz zum cDNA-Verdau

RNA	10 µl
Oligo-dt-Primer	1,0 µl
PCR water grade	2,0 µl
Dies im Thermocycler 10 min. bei 65°C, dann wird folgendes hinzugefügt:	
Puffer	4,0 µl
Inhibitor	0,5 µl
dNTP's	2,0 µl
Reverse Transkriptase (außer bei negativ Kontrollen)	0,5 µl
Im Thermocycler 30 min. bei 55°C.	

3.1.4.2 cDNA-Synthese aus der RNA (Tumorzellen)

Die isolierte RNA der Tumorzellen liegt degradiert vor als bei den Zellkulturen, da durch die Aufbereitungsmethoden (Fixierung) Nekrosen im Tumor entstehen können und die Ausbeute der cDNA somit nicht so hoch ist.

Daher wird stets die Höchstmenge an RNA eingesetzt. Diese erbringt bessere Ergebnisse bei der späteren Real-Time-PCR als der konzentrationsabhängige Einsatz der RNA.

Die Spezifität wird über den PCR-Primer gegeben, mit dem es gelingt, kleinste vorhandene RNA-Mengen in cDNA umzuschreiben. So gelingt es, über der Nachweisgrenze für die spätere Real-Time-PCR zu bleiben.

Die Vorgehensweise ist mit der bei der cDNA-Gewinnung aus den Zellkulturen fast identisch. Laut Hersteller muss das RNA-Primer-Gemisch jedoch 10 min. bei 25 °C Raumtemperatur stehen, bevor es 10 min. bei 75°C im Thermocycler inkubiert werden kann (s. Tbl.1). Das weitere Verfahren verläuft wie in Tbl. 2 beschrieben wird.

3.1.4.3 Primer

Die verwendeten Primer sind auf der Gendatenbank „Nucleotide“ der Internetseite des National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) ausgesucht worden. Bei der Auswahl ist darauf geachtet worden, dass sie auf mindestens zwei verschiedenen Exons liegen, um versehentlich amplifizierte DNA von amplifizierter cDNA

anhand der Produktlänge unterscheiden zu können. Ein weiteres Kriterium sind dicht beieinander liegende Schmelzpunkte eines Primerpaares.

Die 5'-3'-Primer werden „Vorwärts-Primer“ und die 3'-5'-Primer „Rückwärts-Primer“ genannt.

Bei der zusätzlich durchgeführten seminested-PCR wird der „Vorwärts-Primer“ durch den „Vorwärts-a-Primer“ ausgetauscht, während der „Rückwärts-Primer“ der gleiche bleibt.

Die Primer sind bei MWG Biotech, Ebersberg hergestellt und in einer Konzentration von 100 pmol/μl eingesetzt worden. Die Primersequenz, Produktgröße und der Schmelzpunkt (T_m) ist in der nachfolgenden Tabelle (Tbl. 3) aufgeführt.

Tabelle 3: Primereigenschaften

Primername	Primersequenz	Produktgröße (Basenpaare=bp)	T_m (Schmelzpunkt in °C)
S1P ₁ forw a	cct ctt gtg ccc tta aaa gc	171	57,3
S1P ₁ forw b	att act tta act ggt agg gaa cg	151	57,1
S1P ₁ rev	aag aca tct ctc ggt tta att gc		57,1
S1P ₂ forw a	caa tgt acc tgt ttc tgg gc	225	57,3
S1P ₂ forw b	ggc ctt cgt agc caa tac ct	173	59,4
S1P ₂ rev	tgc cat aca gct tga cct tg		57,3
S1P ₃ forw a	cct tta act cta cta ggg agc	193	57,9
S1P ₃ forw b	gcc acc att tcc act agg ag	168	59,4
S1P ₃ rev	gca tat tgg tgc aca ttg gt		55,3
S1P ₄ forw a	aaa tgg gct tcc cat ggt cac c	220	62,1
S1P ₄ forw b	gag agc acc ctg gtg tgg	158	60,5
S1P ₄ rev	cat gat cga act tca atg ttg c		56,5
S1P ₅ forw a	act ctg gta tca gaa ccg	219	53,7
S1P ₅ forw b	cca cga ctg tct tcc caa gt	179	59,4
S1P ₅ rev	caa gca gaa cgt caa ttc ca		55,3

3.2 Methoden

3.2.1 Real-Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Die Durchführung des Versuches erfolgt mittels der Real-Time-PCR. Bei der Real-Time-PCR erfolgt nach jedem Zyklus eine Prüfung, ob weitere Zyklen durchlaufen werden können (Real-Time). Somit können äußere Einflüsse minimiert werden. Die Durchführung erfolgt am LightCycler Instrument (LightCycler 2.0 Instrument, Roche Diagnostik, Mannheim, Deutschland).

3.2.1.1 LightCycler Instrument

Das LightCycler Instrument ist ein Thermocycler kombiniert mit einer Fluorimetroptik, das in der Lage ist, Fluoreszenzen verschiedener Wellenlängen zu bestimmen.

Die Reaktionsgemische (Mastermix+cDNA, s. 3.2.4.5) werden in Glaskapillaren pipettiert, die ein Volumen von 20 bzw. 100 µl fassen können. Es sind sowohl für die Zellkulturen als auch für die Tumorzellen 100 µl Kapillaren verwendet worden.

Das Reaktionsvolumen wird in die Kapillare pipettiert, direkt danach verschlossen und mittels Zentrifugation in die Spitze der Kapillare zentrifugiert. Dort erfolgt dann die Fluoreszenzbestimmung.

Die Reaktionsgefäße werden außerhalb des LightCyclers in ein Karussell platziert, welches dann in den LightCycler eingesetzt wird.

Der LightCycler ist an einem PC angeschlossen und mittels der „LightCycler Software 4.0“ (Fa. Roche) werden die Daten, die während der PCR erfasst werden, je nach Lauf analysiert (Roche Applied Science: The LightCycler System).

3.2.1.2 Detektion der PCR-Produkte

Zur Detektion der PCR-Produkte wird Sybr Green I als markierender Farbstoff verwendet. Der Farbstoff reagiert mit Doppelstrang-DNA. Diese Reaktion führt zu einer Steigerung seiner eigenen Fluoreszenz, die im LightCycler bei einer Wellenlänge von 530 nm bestimmt wird.

Die Bestimmung erfolgt nach jeder Elongationsphase der PCR, da in dieser Phase die meiste Menge an Doppelstrang-DNA vorliegt, bevor sie im nächsten Zyklus wieder denaturiert wird.

3.2.1.3 Schmelzkurvenanalyse

Die Schmelzkurve (T_m) eines PCR-Produktes wird vom LightCycler nach jedem PCR-Zyklus bestimmt. Das PCR-Produkt wird durch die Bindung des Sybr-Green-I-Farbstoffs mittels der Fluoreszenz erkannt. Der Farbstoff bindet nur an Doppelstrang-DNA, so dass ausschließlich das neue Produkt erkannt wird.

Graphisch dargestellt ergibt die Fluoreszenz, gegen die Temperatur in Grad Celsius aufgetragen, eine absteigende Schmelzkurve. Im LightCycler-Programm wird die erste Ableitung dargestellt und es entsteht eine Parabel mit einem Scheitelpunkt (s. Abb. 5). Der Scheitelpunkt ist spezifisch für die entsprechende Schmelztemperatur eines Amplifikates. Unerwünschte Nebenprodukte (z.B. Primerdimere) verbreitern die Schmelzkurve oder es entstehen mehrere Scheitelpunkte (Roche Applied Science 2005).

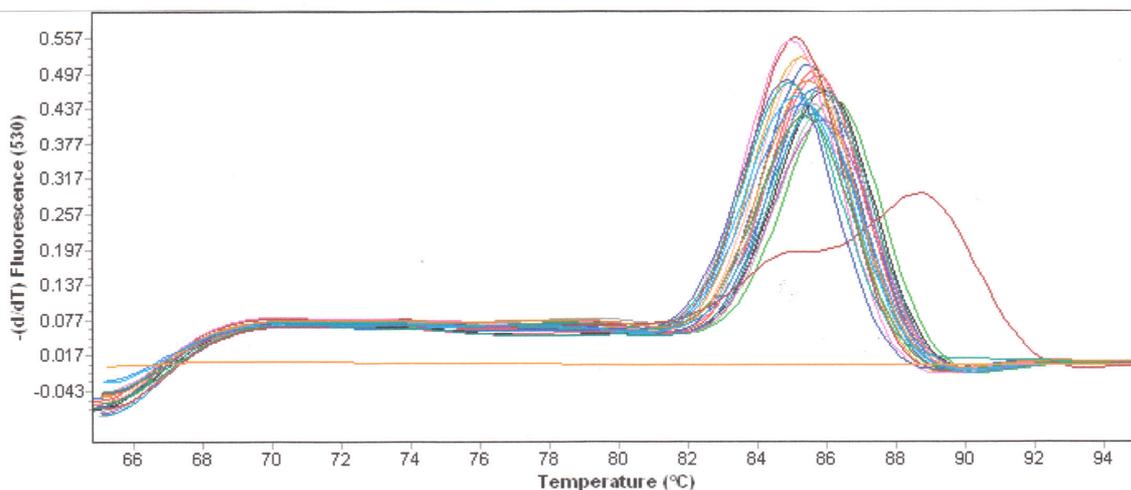


Abbildung 5: Beispiel einer Schmelzkurve (Aktinlauf): Der Scheitelpunkt der Schmelzkurve ist spezifisch für das gewünschte Produkt der PCR (eigenes Produkt).

3.2.2 PCR-Produktkontrolle mittels Gelelektrophorese

Die PCR-Produktkontrolle ist mittels 3%iger Agarose-Gelelektrophorese vorgenommen worden. Eine Produktkontrolle ist indiziert bei Arbeiten am Thermocycler, nach Etablierung eines PCR-Produktes für jedes Primerpaar (Thermocycler und LightCycler) sowie bei Unsicherheiten in der Schmelzkurvenanalyse am LightCycler (z.B. bei Verbreiterung der Schmelzkurve).

Hierzu werden 1,5 g Seakem LE Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland) mit 50 ml TBE-Puffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in der Mikrowelle erwärmt. Nach Abkühlung und vor der Erhärtung wird 2,5 µl Ethidiumbromid (Promega Wallisellen,

Deutschland) zur Anfärbung des doppelsträngigen PCR-Produktes zugegeben und gut vermengt.

Es ist pro Kammer 5 µl PCR-Produkt, 3 µl Loading-Buffer sowie 4 µl destilliertes Wasser eingesetzt worden. Die erste und die letzte Kammer werden mit einem DNA-Ladder von 25 bp – 500 bp (Basenpaare) befüllt (DNA-Leiter, Hyper-Ladder V, Bionline, Taunton, MA, USA). Der DNA-Ladder dient der Produktgrößenzuordnung. Anschließend wird das Gel für 40-60 Minuten an einer Spannung von 140 V bei 400 A angeschlossen (Consort Electrophoresis Power Supply, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), so dass die DNA nach ihrer Produktgröße aufgetrennt werden kann.

Im Gel-Bildgebungssystem (Universal Hood White Light Transilluminator, BioRad, Segrate, Italien) wird das Gel unter Licht (302 nm) fotografiert und mit der Quantity One 1-D Software (BioRad) am Computer dargestellt (s. 3.6).

3.2.3 Sequenzierung zur PCR-Produktkontrolle

Die Sequenzierung ist im Institut für Pathologie, Prof. Dr. med. G. Sauter, am Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf erfolgt. Die PCR-Produkte sind durch die Sequenzierung bestätigt worden.

3.2.4 Quantifizierung mit Hilfe der Real-Time-PCR

Die Quantifizierung bedeutet, dass mit Hilfe der PCR die Menge, in diesem Fall von spezifischer DNA, festgestellt wird. In dieser Arbeit wird die relative Quantifizierung verwendet. Dabei wird das Verhältnis zu einem anderen bestimmten Gen über das Expressionslevel eines zu untersuchenden Gens und dessen Veränderungen analysiert. Dementsprechend sind die entstandenen Werte Verhältnisaussagen über die zu untersuchende mRNA Expression im Vergleich zu einem so genannten Housekeeping- bzw. Referenzgen. Das in dieser Arbeit verwendete Referenzgen ist das β -Aktin.

Das Referenzgen kann zudem als Positivkontrolle verwendet werden, da es ein hohes Expressionslevel aufweist.

3.2.4.1 Standardkurvenerstellung

Die benötigten PCR-Produkte zur Standardkurvenherstellung werden, für die spätere Berechnung der relativen Quantifizierung, mittels einer seminestet-PCR erstellt. Durch die Standardkurve wird die nicht immer gleichbleibende Effizienz zwischen Referenz- und Target-Gen korrigiert bzw. ausgeglichen.

Im Sinne einer seminestet-PCR wird am Thermocycler durch einen ausgetauschten Vorwärts-Primer in einen Vorwärts-a-Primer ein längeres DNA-Stück als das zu amplifizierende Target-Gen „massenproduziert“.

Mit diesem Überangebot, an für die Primer passende DNA, wird nun eine Verdünnungsreihe (10^{-1} bis 10^{-11}) mit den Vorwärts- und Rückwärts-Primern im LightCycler erstellt. Jede Verdünnungsreihe ist doppelt bestimmt worden und jede PCR läuft jeweils unter den für die eingesetzten Primer optimalen PCR-Protokollen.

Anhand der Verdünnungskoeffizienten und der Cp-Werte ermittelt die LightCycler Software die jeweilige PCR-Effizienz für ein Primerpaar (die Zyklusdifferenz sollte zwischen jeder Verdünnungsstufe $\Delta C_p=3$ betragen).

Die ermittelte Effizienz wird bei jeder relativen Quantifizierung miteinbezogen und ist so Effizienz korrigierend.

Die seminestet-PCR ist an dem Thermocycler in dünnwandigen PCR-Tubes durchgeführt worden. Die Reagenzien stammen aus dem „Taq PCR Core Kit 1000 Units“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) und sind entsprechend der Herstellerangaben wie folgt pipettiert worden:

Tabelle 4: Mastermix für die Standardkurvenerstellung

PCR-Puffer ; enthält 15 mM MgCl ₂	2,0 ul
Vorwärts-a-Primer	0,1 ul
Rückwärts-Primer	0,1 ul
dNTP's (10 mM)	0,4 ul
Taq Polymerase	0,1 ul
PCR-grade H ₂ O	15,3 ul
ad	18,0 ul
+eingesetzte cDNA	2,0 ul

Die PCR's liefen unter folgendem Programm ab (pro Zyklus, insgesamt 40 Zyklen):

Tabelle 5: PCR-Temperaturen für Standardkurvenerstellung

Denaturierung	30 sek. bei 94°C
Primer-Annealing	30 sek. bei 52-55°C (je nach Primer)
Amplifikation	60 sek. bei 72°C

Die Standardkurven sind bereits bei vorherigen Arbeiten durch die Mitarbeiter im Labor etabliert worden.

3.2.4.2 Normalisierung mittels Kalibrator

Für einen konstanten Eichpunkt ist bei jeder PCR ein Kalibrator mitgelaufen. Dieser Kalibrator resultiert aus einer der Verdünnungsreihen der seminestet-PCR entnommenen Positivkontrolle des zu amplifizierenden Gens. Die Wahl fällt auf die Probe des Kalibrators, bei der der Cp-Wert der zu untersuchenden Zellprobe entspricht, d.h. ca. 10-20 Cp. Das entspricht den Verdünnungsstufen 10^{-7} oder 10^{-8} .

Zudem muss beachtet werden, dass die PCR-Effizienzen verschieden sind. Dies ist bedingt durch Unterschiede in der Detektion des Referenz- und des Target-Gens.

$$N_{\text{Target}} \neq N_{\text{Referenz}} \longrightarrow N_{\text{Target}} / N_{\text{Referenz}} \neq 1$$

(aber konstant für alle Proben und Kalibrator)

Wird nun jedes Verhältnis von Referenz- und Target-Gen der Proben durch das des Kalibrators von Referenz- und Target-Gen dividiert, erhält man ein normalisiertes Verhältnis (Normalized Ratio).

$$\text{Normalized Ratio} = \frac{N_{\text{T(Probe)}}}{N_{\text{R(Probe)}}} = \frac{K_{\text{(Probe)}}}{K_{\text{(Kalibrator)}}} = 1 \text{ (weil } K_{\text{(Probe)}} = K_{\text{(Kalibrator)}})$$

$N_{\text{T}}/N_{\text{R}}$ = Anzahl Referenz-Gen und Target-Gen am Schwellen Cp-Wert

$$K_{\text{(Probe)}} / K_{\text{(Kalibrator)}} = \text{Konstanten}$$

Die Voraussetzung für diese Annahmen ist, dass die PCR-Effizienzen zwischen allen Proben der Referenz und des Targets gleich bleiben.

3.2.4.3 Optimierungsverfahren bei der Real-Time-PCR

Für jedes Primerpaar ist am LightCycler ein PCR-Programm etabliert worden, unter dem keine Nebenprodukte entstanden sind und unter dem die PCR am besten reproduzierbar ist. Als weitere Optimierungsmaßnahme steht das LightCycler Instrument in einem separaten Raum, um die Kontamination der Reagenzien mit DNA-Templates zu vermeiden und somit die Entstehung von Nebenprodukten abzuwenden. Die Gebrauchsinstrumente und die Arbeitsflächen sind zuvor mit 70%igem Ethanol gereinigt worden, ebenfalls um eine Kontamination zu vermeiden.

In dem Fall in dem Nebenprodukte entstanden sind, die aus Primerdimeren bestehen, ist die Primermenge halbiert bzw. geviertelt worden.

3.2.4.4 Reaktionsgemische

Alle PCR-Reaktionen laufen in den 100 µl Kapillaren ab, wobei die cDNA der Zelllinien und die cDNA der Tumore 1:10 verdünnt eingesetzt worden sind (s. Tabelle 6).

Zur Herstellung des PCR-Reaktionsgemisches ist der „LightCycler FastStart DNA Master Sybr Green I“-Kit (Firma Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) verwendet worden. Es wird zunächst ein Mastermix aus Primern, Wasser (PCR grade) und dem „FastStart DNA Master Sybr Green I“ hergestellt, um Pipettierfehler zu vermeiden:

Tabelle 6: Mastermix für PCR S1P₁-S1P₅

	<u>50 ul Ansatz</u>
Vorwärts-Primer	1,0 ul
Rückwärts-Primer	1,0 ul
FastStart DNA Master Sybr Green I	10 ul
H ₂ O PCR-Grade	28 ul
MasterMix Volumen	40 ul
+ eingesetzte cDNA	10 ul (1:10 verdünnt)

Das MasterMix-Volumen ist in die Glaskapillare eingesetzt worden, wonach die einzusetzende cDNA dazu pipettiert worden ist. Anschließend sind die Kapillaren, wie unter 3.2.2.1 beschrieben, im LightCycler platziert worden. Zu jedem Lauf ist am Ende eine Negativkontrolle hinzugefügt worden. Das heißt, statt der cDNA ist PCR-grade H₂O eingesetzt worden.

Als interne Kontrolle sind jede Probe, Kalibrator und Negativkontrolle als Doppelbestimmung gelaufen.

3.2.4.5 PCR-Protokolle am LightCycler

Alle LightCycler PCR-Läufe beginnen mit einer 10-minütigen Denaturierungsphase bei 95°C zur Aktivierung der Taq-Polymerase. Folgende Temperaturen und Zyklen sind für alle Primerpaare sowohl für die Kulturzellen als auch für die Tumorzellen verwendet worden. Es sind jeweils 50 Zyklen gelaufen.

Tabelle 7: LightCycler PCR-Protokoll

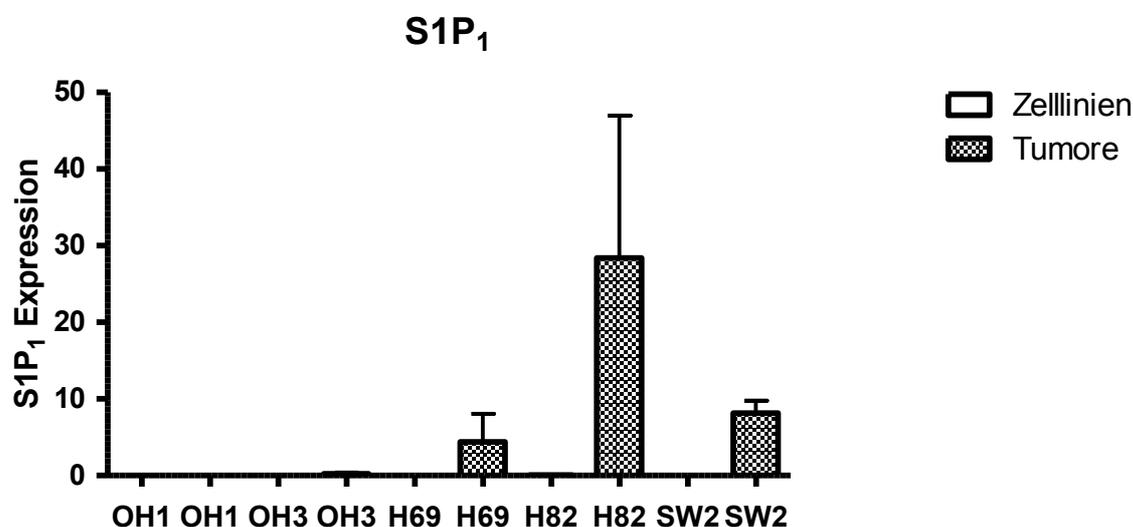
Polymerase Aktivierung	10 min. bei 95°C
Zyklus	15 sek. bei 95°C Denaturation
	15 sek. bei 62°C Primer Annealing
	25 sek. bei 72°C Amplifikation

3.2.5 Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse aus dem LightCycler erfolgte mit dem Programm Graph Pad Prism, Version 5 (Inc., San Diego, CA, USA). Da in dieser Arbeit die relative Quantifizierung angewendet worden ist, werden keine Einheiten dargestellt (s. 3.2.4).

4 Ergebnisse

4.1 S1P₁ Expression



Kleinzelliges Bronchialkarzinom

Abbildung 6: S1P₁ Expression von SCLC: Es findet sich keine Expression für die in der Kultur gezüchteten Zelllinien. Für die Primärtumore findet eine Expression für H69, H82 und SW2 statt.

Für die Zelllinien OH1, OH3, H69, H82 und SW2 ist die Expression $<0,1$ gewesen, daher werden keine Balken für die Standardabweichung für alle Zelllinien angezeigt.

Für die Tumore sind folgende Ergebnisse erzielt worden: Für OH1 liegt keine Expression vor. Für OH3 liegen die Werte bei $<0,1$ bis $0,6$ ($n = 3$; Mittelwert = $0,2$, Standardabweichung = $0,2$). Die Expression für H69 ist von $0,7$ bis $8,1$ ($n = 2$; Mittelwert = $4,4$, Standardabweichung = $3,7$). Für H82 zeigen sich die Werte von $1,9$ bis $81,7$ ($n = 4$; Mittelwert = $28,4$, Standardabweichung = $32,2$). Die Ergebnisse für SW2 liegen im Bereich von $4,3$ bis $12,2$ ($n = 4$; Mittelwert = $8,2$; Standardabweichung = $2,8$).

4.2 S1P₂ Expression

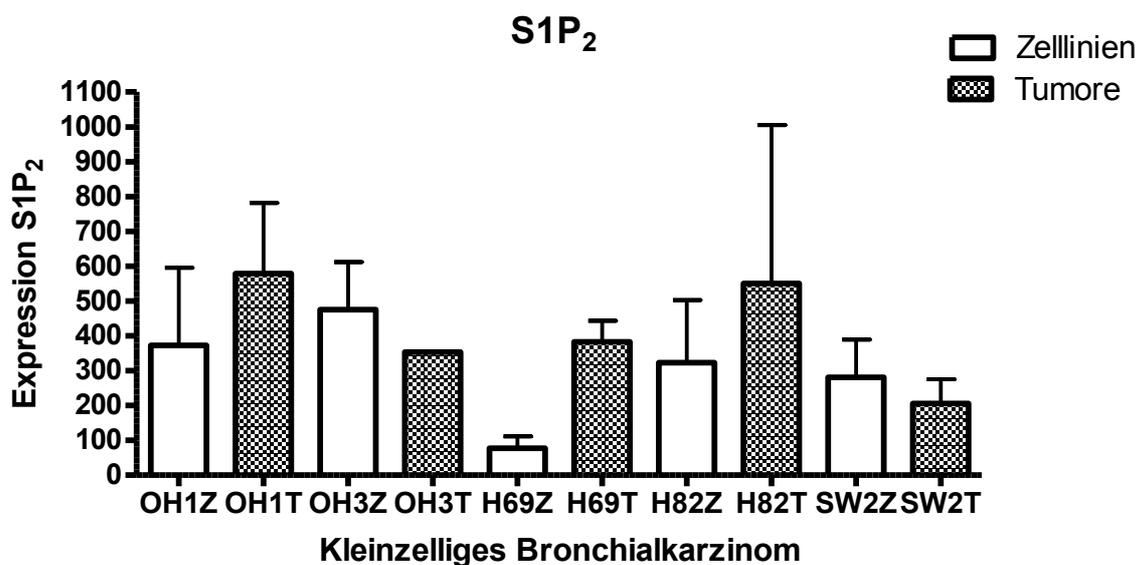


Abbildung 7: S1P₂ Expression von SCLC: Es kann eine Expression für alle Zelllinien in der Kultur als auch im Primärtumor verzeichnet werden.

Die Werte für die Zelllinien für die Expression von S1P₂ sind wie folgt: Für OH1 liegen die Werte zwischen 14,1 bis 780 (n = 3; Mittelwert = 373, Standardabweichung = 314,5); OH3 zeigt Werte zwischen 277 und 738 (n = 3; Mittelwert = 475; Standardabweichung = 193,7). Für H69 liegen die Werte zwischen 24,1 bis 140 (n = 3; Mittelwert = 77,1; Standardabweichung = 47,8). Die Resultate für H82 sind zwischen 16,2 bis 636 (n = 3; Mittelwert = 323,4; Standardabweichung = 253). Die Werte für SW2 liegen zwischen 121 bis 488 (n = 3; Mittelwert = 280,7; Standardabweichung = 153,6).

Für die Expression von S1P₂ bei den Tumoren sind folgende Ergebnisse erzielt worden: Für OH1 liegen die Werte von 377 bis 781 (n = 2; Mittelwert = 579; Standardabweichung = 202). Für OH3 ist das Resultat mit der Messung 353 (n = 1). H69 zeigt eine Expression bei 242 bis 523 (n = 4; Mittelwert = 382,5; Standardabweichung = 104). Die Ergebnisse für H82 liegen im Bereich von 85 bis 1460 (n = 3; Mittelwert = 550,7; Standardabweichung = 643). Für SW2 sind die Ergebnisse von 136 bis 275 (n = 2; Mittelwert = 205,5; Standardabweichung = 69,5).

4.3 S1P₃ Expression

S1P₃ ist hier graphisch nicht dargestellt, da in den Versuchen keine S1P₃-Expression in den Kulturzellen oder Primärtumoren nachgewiesen werden konnte.

4.4 S1P₄ Expression

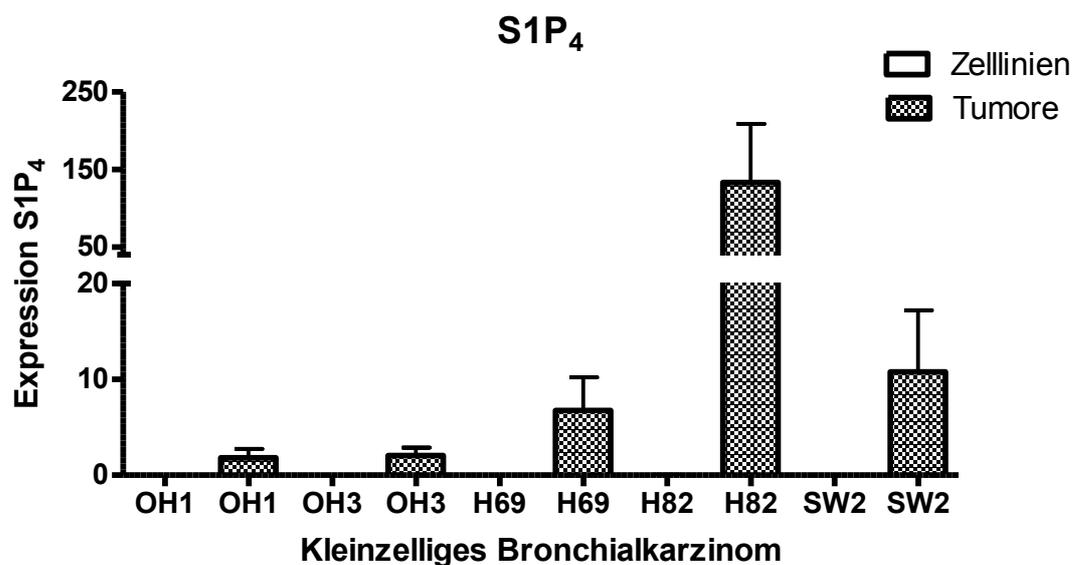


Abbildung 8: S1P₄ Expression von SCLC: Für S1P₄ findet keine Expression in den Kulturzellen statt. In den Primärtumoren lassen sich unterschiedliche Expressionen verzeichnen.

Die Resultate für die Expression für S1P₄ bei den Zelllinien sind alle <0,1 und werden daher graphisch nicht dargestellt.

Die Ergebnisse für die Tumore sind wie folgt: Die Werte für OH1 liegen von 0,1 bis 3,3 (n = 3; Mittelwert = 1,8; Standardabweichung = 1,3). Für OH3 resultieren die Ergebnisse in einem Bereich von 0,5 bis 3,3 (n = 3; Mittelwert = 2,1; Standardabweichung = 1,2). H69 zeigt einen Bereich der Expression von 1,5 bis 20,1 an (n = 5; Mittelwert = 6,8; 6,9). Die Werte für H82 liegen von 2,18 bis 332 (n = 4; Mittelwert = 133,4; Standardabweichung = 131,2). Die Resultate für SW2 sind bei 3,1 bis 30,1 (n = 4; Mittelwert = 10,8; Standardabweichung = 11,2).

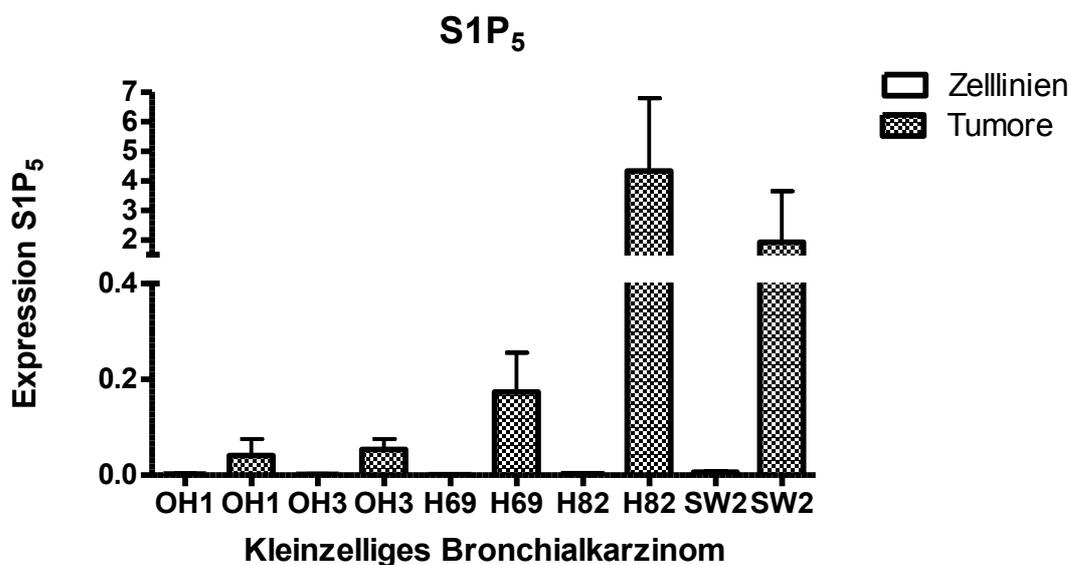
4.5 S1P₅ Expression

Abbildung 9: S1P₅ Expression von SCLC: Es lässt sich eine unterschiedliche Expression für die Primärtumore erkennen. Für die Zelllinien in Kultur ist eine Expression kleiner eins zu verzeichnen.

Für die Zelllinien OH1, OH3, H69, H82 und SW2 ist die Expression $< 0,1$ gewesen.

Für die Tumore sind folgende Ergebnisse erzielt worden: Für OH1 liegen die Ergebnisse bei $< 0,1$ bis $0,11$ ($n = 3$; Mittelwert = $0,04$; Standardabweichung = $0,05$). Für OH3 sind die Werte bei $< 0,1$ bis $0,11$ ($n = 5$; Mittelwert = $0,1$; Standardabweichung = $0,04$). Die Expression für H69 verzeichnet Resultate von $< 0,1$ bis $0,5$ ($n = 5$; Mittelwert = $0,2$; Standardabweichung = $0,2$). Für H82 zeigen sich die Werte bei $< 0,1$ bis $12,6$ ($n = 5$; Mittelwert = $4,3$; Standardabweichung = $4,9$). Die Ergebnisse für SW2 sind im Bereich von $0,1$ bis $7,1$ ($n = 4$; Mittelwert = $1,9$; Standardabweichung = 3).

4.6 Ergebnis der Gelelektrophorese

Im Nachfolgenden werden die Agarosegele gezeigt, die zur PCR-Produktkontrolle angefertigt worden sind. Es sind zwei Gele zur Bestätigung der Primer angefertigt worden, da im ersten Gel (Abb. 10) zwei Primer nicht sichtbar gewesen sind. In einem zweiten Gel (Abb. 11) sind diese dann bestätigt worden.

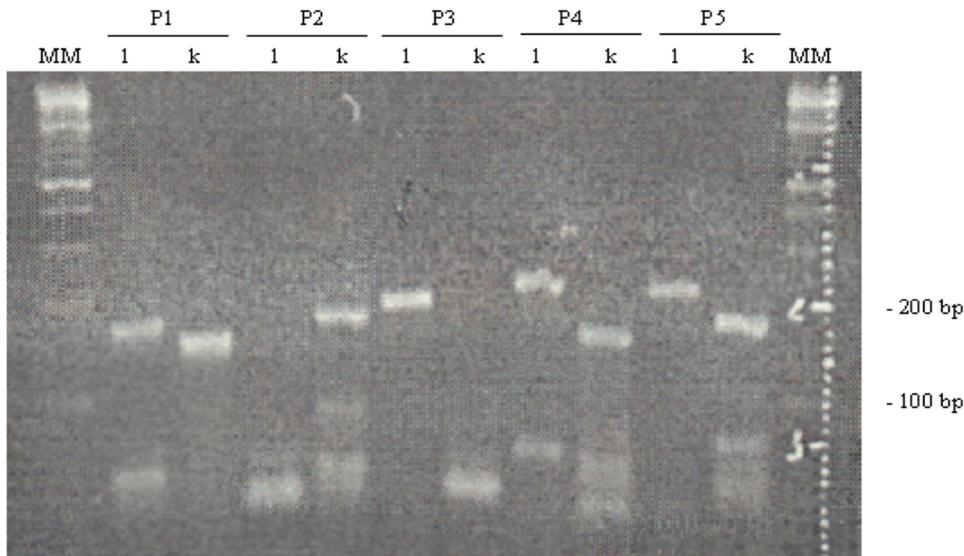


Abbildung 10: Gel 1 zur PCR-Produktkontrolle: Die dargestellten Produktgrößen der Primer liegen zwischen 151 und 225 Basenpaare, welches durch das Gel bestätigt wird. MM = DNA Ladder (Molekularmarker), l = forward a-Primer, k = forward-Primer; P1-5=S1P₁₋₅

In Gel 1 fehlt der Nachweis von S1P₂ forward a-Primer und S1P₃ forward-Primer, welcher durch das untere Gel bestätigt wird (Abb. 10).

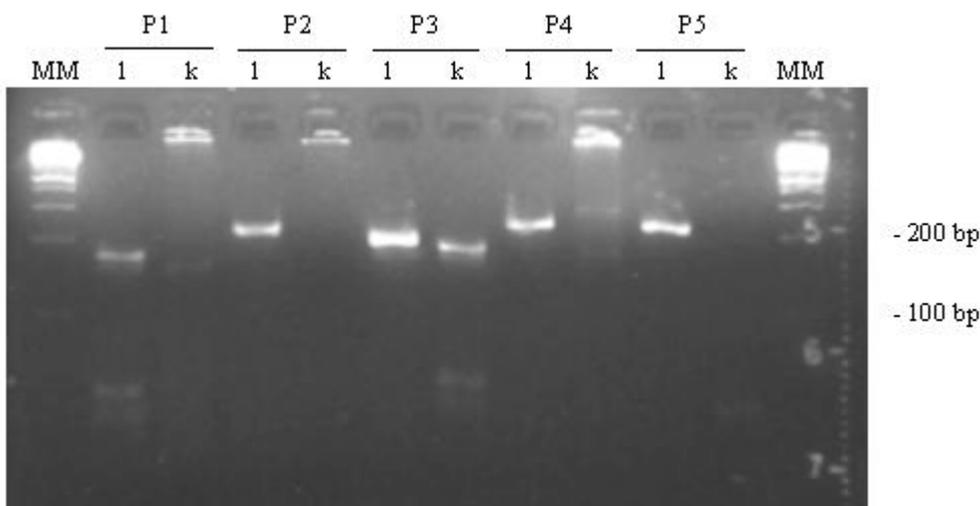


Abbildung 11: Gel 2 zur PCR-Produktkontrolle: Bestätigung des Produktes von S1P₂ forward a- und S1P₃ forward-Primer, da diese im ersten Gel (Abb. 10) nicht angezeigt worden sind. MM = DNA Ladder (Molekularmarker), l = forward a-Primer, k = forward-Primer; P1-5 = S1P₁₋₅

In der ersten Kammer ist der Molekularmarker eingesetzt worden, der mit einer Skala von 25 bis 500 Basenpaare als Skalierung für die PCR-Produkte dient. Für S1P₁ liegen die Banden für den forward a-Primer (171 bp) leicht oberhalb des forward-Primers (151 bp) und zwischen den Markierungen des Molekularmarkers für 100 bp und 200 bp.

Für S1P₂ wird im ersten Gel die Bande für den forward-Primer (173 bp) zwischen der 100er- und der 200er-Skalierung des Molekularmarkers gezeigt, für den forward a-Primer (225 bp) wird im zweiten Gel die Bande leicht oberhalb der 200er-Skalierung angezeigt. Für S1P₃ zeigt sich die Bande für den forward a-Primer (193 bp) im ersten Gel nahe an der 200er Skalierung des Molekularmarkers. Der forward-Primer (168 bp) wird im zweiten Gel zwischen der 100er und 200er Skalierung angezeigt.

Für S1P₄ stellt sich der forward a-Primer (220 bp) oberhalb der 200er Skalierung des Molekularmarkers dar. Der forward-Primer (158 bp) zeigt sich zwischen der 100er und 200er Skalierung.

Für S1P₅ zeigt sich der forward a-Primer (219 bp) leicht oberhalb der 200er Skalierung des Molekularmarkers, der forward-Primer (179 bp) liegt zwischen der 100er und 200er Skalierung.

Die dargestellten Primerbanden entsprechen den angegebenen Produktgrößen der Primer.

5 Diskussion

S1P ist mit seinen Rezeptoren als Lysophospholipidmolekül an vielen wichtigen Stoffwechselprozessen beteiligt, die insbesondere das Wachstum und die Differenzierung von Zellen beeinflussen. Bösartige Tumore und ihr Metastasierungspotential sind hauptsächlich abhängig von der Adhäsion der Zellen, der Migration, Invasivität, Angiogenese und Zellproliferation (Balthasar et al. 2006). Bei bösartigen Tumoren mit Metastasenbildung unterliegen besonders diese Stoffwechselprozesse nicht mehr der „gesunden“ Selbstregulation der betroffenen Zellen. Die Invasivität und Migration der Tumorzellen stellen eines der Hauptprobleme einer bösartigen Tumorzelle dar. Daher wird seit langem versucht, an diesem Punkt einen erfolgreichen therapeutischen Ansatz zu erzielen.

Erst seit dem letzten Jahrzehnt gewinnt das S1P in Bezug auf die Tumorgenese mit seinen Regelkreisläufen immer mehr an Bedeutung. Insbesondere wird die Zellmigration, Invasivität und das Metastasierungsverhalten bezogen auf S1P untersucht.

Beim SCLC sind diese Verhaltensmechanismen von besonderer Bedeutung, da dieser Tumor durch sein frühes Metastasierungsverhalten als besonders aggressiv eingestuft wird (Watkins et al. 2003).

Wie individuell die Krebszellen agieren, zeigen auch die Ergebnisse dieser Arbeit. Es ist nachgewiesen worden, dass sich außer bei S1P₂ und S1P₃ große Unterschiede in der Expression der Zelllinien (in vitro) im Vergleich zu den Tumoren (in vivo) finden, da es zu keiner relevanten Expression der Zelllinien in Kultur von S1P₁, S1P₄ und S1P₅ gekommen ist. Auch ist das Expressionsverhalten der Rezeptoren der verschiedenen Tumorzellen von unterschiedlichem Ausmaß. Als kritisch zu betrachten sind dabei die unterschiedliche Anzahl der einzelnen Ergebnisse für die Rezeptoren, die in die Berechnung mit eingeflossen sind.

Auch weisen die Zelllinien/ Tumorzelllinien ein unterschiedliches Verhalten bezüglich der Wachstumsgeschwindigkeit, Tumorgroße und Metastasenanzahl auf (s. Abb. 12). Es wird dargestellt, dass die Wachstumsgeschwindigkeit nicht in Abhängigkeit mit der Metastasenanzahl steht. Schnell wachsende Tumore (H82, OH3 und SW2) haben im Verhältnis eine geringere Metastasenanzahl als langsam wachsende, die eine höhere Metastasenanzahl aufweisen (OH1). Auch ist das Tumorgewicht nicht abhängig von der Metastasenanzahl. OH1 hat das geringste Gewicht, allerdings die höchste Metastasenanzahl (Sodeur et al. 2009).

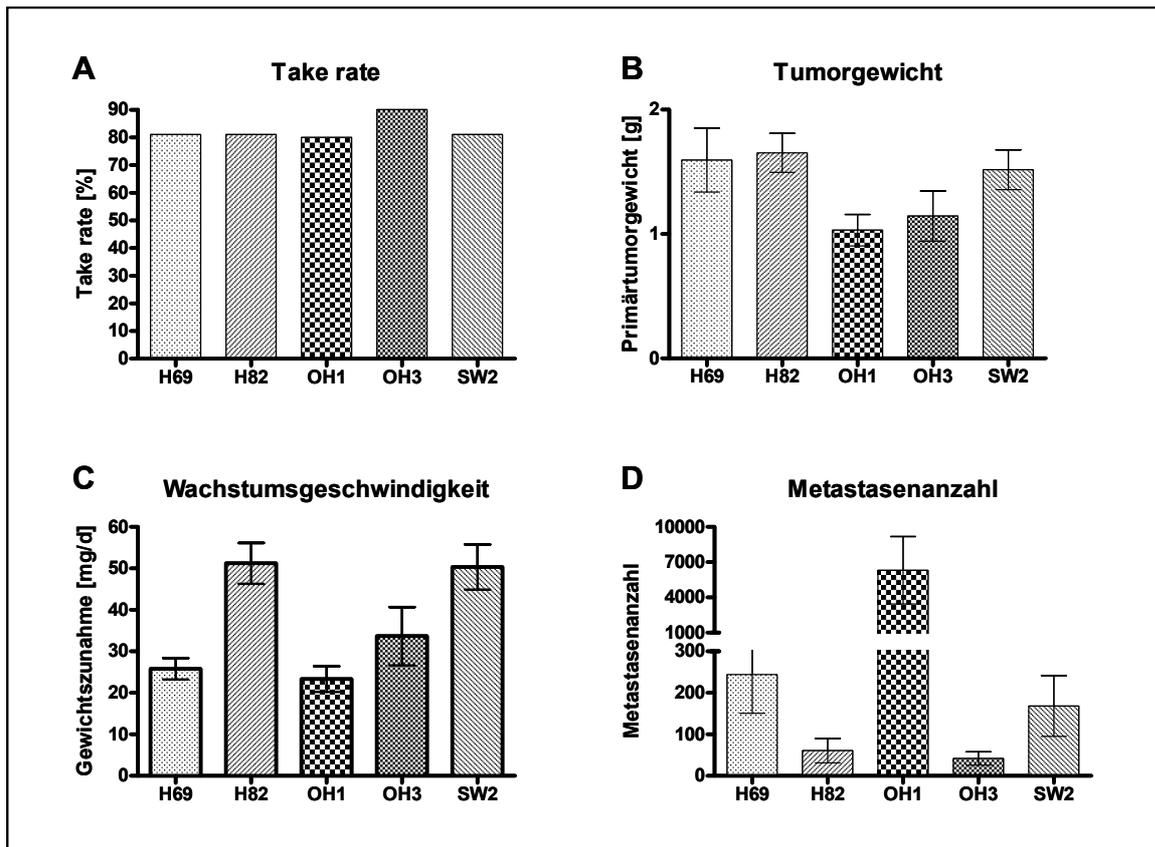


Abbildung 12: Darstellung des Verhaltens der Tumorzelllinien in SCID-Mäusen:
A: Take rate (Tumorentstehung) der einzelnen Tumorzelllinien
B: Durchschnittliches Tumorgewicht der einzelnen Zelllinien
C: Durchschnittliche Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen Zelllinien
D: Durchschnittlich erreichte Metastasenanzahl der einzelnen Zelllinien
 (Sodeur et al. 2009)

Werden die Ergebnisse der drei Rezeptoren und vier Zelllinien (OH1, H69, H82, SW2) in der Übersicht nur auf die Ergebnisse von Sodeur betrachtet, so lässt sich daraus schließen, dass die Wachstumsgeschwindigkeit abhängig von der Rezeptorexpression sein könnte. Die Metastasenanzahl würde hiernach negativ durch eine erhöhte Expression der Rezeptoren beeinflusst werden.

Allerdings fällt die Zelllinie OH3 aus dieser Annahme heraus. Die drei Rezeptoren weisen in dieser Zelllinie eine geringe Expression auf, wobei die Wachstumsgeschwindigkeit mäßig bis stark ist. Die Metastasenanzahl fällt für OH3 am geringsten aus im Vergleich zu den anderen vier Zelllinien. Auf OH3 bezogen wird auf Grund der Ergebnisse dieser Arbeit angenommen, dass die Rezeptorexpression keinen Einfluss auf die Metastasenanzahl ausübt.

5.1 Regulationsmechanismen von S1P₁ in SCLC

Wie die Ergebnisse zeigen, ist die Expressionsrate für den S1P₁-Rezeptor innerhalb der fünf Zelllinien bei H82 am höchsten. Des Weiteren ist noch H69 in einem geringen Maße und SW2 in doppelt so hoher Expression wie H69 exprimiert worden.

Bei einer Überexpression des Rezeptors wird die Zellmigration stimuliert und der Rezeptor als Auslöser einer positiven Chemotaxis beschrieben (Arikawa et al. 2003, Yamaguchi et al. 2003). Die Expression der Rezeptoren ist in dieser Arbeit im Vergleich auf die übrigen Expressionslevel als mäßig zu beurteilen. Diese mäßige Expression von S1P₁ könnte dadurch erklärt werden, dass evtl. viel S1P in den Tumorzellen vorgelegen hat, da S1P sich hemmend auf die Rezeptorexpression und somit auch auf die Zellmigration auswirkt (Smicun et al. 2006).

Die im Vergleich zu S1P₂ niedrigere Expression von S1P₁ kann unter anderem dadurch erklärt werden, dass S1P₁ besonders stark in gesunden Zellen exprimiert wird und in Tumorzellen weniger bis gar nicht nachweisbar ist (Dolezalova et al. 2003, Young et al. 2007).

Da der SCLC für ein aggressives Wachstum bekannt ist, überrascht die niedrige Expression von S1P₁. Die Tumorzellen H82 weisen eine hohe Wachstumsgeschwindigkeit auf. S1P₁ hat grundsätzlich eher eine fördernde Einwirkung auf die Zellmigration. Dieses Ergebnis korreliert nur bedingt, da das Expressionsausmaß höher erwartet werden könnte. In Bezug auf die Metastasierungsanzahl zeigte H89 die geringste Anzahl, was durch die Suppression der Rezeptorexpression erklärt werden kann. Die Expression von S1P₁ an SW2-Tumorzellen ist hier zwar dreifach geringer als an H82. Es wird aber an SW2-Tumorzellen eine eineinhalbfach höhere Metastasenanzahl bei sehr starker Wachstumsgeschwindigkeit beschrieben (Sodeur et al. 2009). Dieses Ergebnis korreliert eher mit den Eigenschaften von SCLC bezogen auf die Invasivität. Die Rezeptoren der Tumorzelllinien OH3 und H69 sind nur sehr gering exprimiert worden. Wobei OH3 und H69 bei mäßiger Wachstumsgeschwindigkeit nur ein niedrigeres Ergebnis in Bezug auf die Metastasenanzahl aufweisen. Dies korreliert sehr gut mit dem insgesamt niedrigen Expressionsergebnis für S1P₁.

Überraschend ist, dass an OH1 keine Expression vorliegt, da für OH1 die höchste Metastasenanzahl bei geringer Wachstumsgeschwindigkeit nach Sodeur festgestellt worden ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit korrelieren nicht mit der typischen Charakteristik des SCLC.

Werden die Ergebnisse von OH3 nicht in die Betrachtung miteinbezogen, könnte bezogen auf S1P₁ vermutet werden, dass eine höhere Metastasenanzahl mit einer niedrigeren Expression der Rezeptoren einhergeht und umgekehrt.

Eine höhere Wachstumsgeschwindigkeit wirkt sich (außer bei OH3) fördernd auf die Rezeptorexpression auf den verschiedenen Tumorzelllinien aus.

Dieser Aspekt kann dahingehend weiter betrachtet werden, dass eine Gabe von S1P den hemmenden Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit/Metastasenanzahl unterstützen würde, da dadurch auch Zellen wie H82, bei weiterer Unterdrückung von S1P₁, gehemmt werden würden. Dieser Aspekt ist durch eine Untersuchung an Melanomzellen belegt worden. Dabei ist zu den Melanomzellen S1P gegeben worden und es ist nach drei Wochen nachgewiesen worden, dass die Lungenmetastasen gehemmt werden (Yamaguchi et al. 2003).

Hinsichtlich der mäßigen Expression von S1P₁ in den Versuchen dieser Arbeit, kann davon ausgegangen werden, dass schon ein gewisses Maß an S1P in den Tumorzellen des SCLC vorgelegen haben muss.

5.2 Regulationsmechanismen von S1P₂ in SCLC

Die letztere oben genannte These, die besagt, dass ein gewisses Maß an S1P in den Tumorzellen von SCLC vorgelegen haben muss, wird auch durch die hohe Expression von S1P₂, sowohl in allen genannten Tumorarten als auch in den Zelllinien, bestätigt. Die S1P₂-Expression wird durch viel S1P hochreguliert, ganz im Gegenteil zu S1P₁. S1P₂ wird auch als Rezeptor der negativen Chemotaxis betitelt (Arikawa et al. 2003, Yamaguchi et al. 2003).

Die hohe Expression dieses Rezeptortyps überrascht zunächst, da S1P₂ nachweislich die Zellbeweglichkeit (Young et al. 2007), die Migration und die Invasivität hemmt (Arikawa et al. 2003, Yamaguchi et al. 2003; Hu et al. 2010, Young et al. 2007), welches über die Inaktivierung der Rac-Aktivität und Aktivierung der Rho-Aktivität gesteuert wird (Arikawa et al. 2003). Diese Behauptung wird durch einen Virenversuch bestätigt, indem festgestellt worden ist, dass die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren besonders an der Regulierung der Metastasenbildung beteiligt sind. Die Metastasenbildung ist in Abhängigkeit von dem Vorkommen des Liganden und der bestehenden zellulären Rac-Aktivität bestätigt worden (Yamaguchi et al. 2003, Hu et al. 2010). Weiterhin ist kontrovers beobachtet worden, dass in Ösophaguskrebszellen und Gliomzellen die

Migration der Zellen durch S1P₂ über die Stimulation von Rho gehemmt wird (Hu et al. 2010, Young et.al. 2007). Diese Behauptung lässt schlussfolgern, dass die Aktivierung der Signalkaskade in verschiedenen Krebszellen durch Rac und Rho möglicherweise unterschiedlich beeinflusst wird. So lässt sich daraus schließen, dass die Hemmung der Migration durch die Stimulation von Rho in Ösophaguskrebszellen nicht zwangsläufig auf die SCLC-Zellen zutreffen muss.

Der SCLC steht mit seinem schnellen Metastasierungspotential dieser hohen Expression von S1P₂ entgegen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass S1P₂ andere wichtige Aufgaben in Tumorzellen übernimmt. Dies wird darin begründet, dass S1P₂ in allen malignen Zellen exprimiert wird (Yamashita et al. 2006). Das wiederum kann darin begründet sein, dass S1P₂ die Zellproliferation und die Gefäßneubildung fördert (Meyer zu Heringdorf u. Jakobs 2007, Ishii et al. 2004).

Wie schon beschrieben, ist die Wachstumsgeschwindigkeit bei den fünf verschiedenen Zelllinien unterschiedlich, jedoch ist sie bei allen ausgeprägt. Es findet sich wiederum eine Übereinstimmung mit der höchsten Wachstumsgeschwindigkeit bei den H82-Tumorzellen im Vergleich zu der Expression des S1P₂-Rezeptors, die hier ebenfalls am stärksten ausgeprägt ist. Leider wird S1P₂ bei OH1 genauso stark exprimiert wie bei H82. Wobei OH1 die geringste Wachstumsgeschwindigkeit aufweist (Sodeur et al. 2009). Die Expressionsrate von S1P₂ bei SW2, OH3 und H69 liegt zwar niedriger als bei den oben genannten Tumorzellenlinien, ist aber im Gesamtvergleich immer noch relativ hoch. Die Wachstumsgeschwindigkeit dieser Zellen ist zwischen derjenigen von OH1 und H82 einzuordnen.

Das würde darauf hinweisen, dass keine übereinstimmende Aussage bezogen auf die Einflussnahme des S1P₂-Rezeptors auf die Wachstumsgeschwindigkeit von SCLC gemacht werden kann.

Die hohe Rezeptorexpression von S1P₂ könnte in der erhöhten Zellproliferation des Tumors liegen, zum anderen ist für die Expression des S1P₁-Rezeptors die These vertreten worden, dass viel S1P in den Tumorzellen vorgelegen hat. Eine hohe S1P-Konzentration korreliert mit einer hohen S1P₂-Expression (Yamaguchi et al. 2003).

Dies würde den Anhaltspunkt bestätigen, dass bei einem Tumor mit einer starken S1P₂-Expression oder auch durch einen S1P₂-Agonisten durch eine S1P-Gabe die Metastasierung in einem frühen Stadium gehemmt werden kann. Belegt wird dies durch eine Arbeit, die bei Melanomzellen eine Überexpression von S1P₂ beschreibt. Dabei ist

durch eine anschließende Vorbehandlung der Tumorzellen mit S1P die Lungenmetastasenanzahl deutlich reduziert worden. Diese Vorbehandlung hatte eine Unterdrückung der zellulären Rac-Aktivität zur Folge, die im weiteren Verlauf gezeigt hat, dass diese vorübergehende Veränderung das ausschlaggebende Signal für die Formation von Metastasen zu sein scheint und diese nun negativ beeinflusst werden.

Wird dieser Ansatz weiter verfolgt, sollte weiter untersucht werden, ob die starke Expression von S1P₂ an der hohen Zellproliferation des Tumors liegt. Wenn dies zutrifft, ist die Gabe eines S1P-Analagon kritisch in Bezug auf das Wachstum des Primärtumors zu sehen. Stellt sich dieser Aspekt als unproblematisch dar, gehört der SCLC sicherlich zu den Tumoren, die für ein S1P-Analagon in Bezug auf die S1P-Rezeptorexpression in Betracht kommen könnten.

5.3 Regulationsmechanismen von S1P₃ in SCLC

Diese Arbeit zeigt, dass keine Expression von S1P₃ in Bezug auf die untersuchten Tumorzellen, weder in vivo noch in vitro, des SCLC vorhanden sind.

In anderen Tumorarten wie Melanomzellen (Arikawa et al. 2003), Brustkrebszellen (Dolezalova et al. 2003) und Gliomzellen (Young et al. 2007) fällt S1P₃ aufgrund der positiven Chemotaxis auf. Auch bei einer Überexpression von S1P₃ kommt es zu einer stimulierenden Wirkung auf die Zellmigration und Zellinvasion. Allerdings steigt bei S1P₃ die stimulierende Wirkung bezogen auf die Migration, wenn mehr S1P vorhanden ist (Hu et al. 2010).

Dies begründet aber nicht, dass keine Expression von S1P₃ in den SCLC-Zellen vorliegt. Ein weiteres Beispiel für eine fehlende Expression von S1P₃ ist die Beobachtung, dass in gesunden Magenzellen keine S1P₃-Rezeptoren zu finden sind und dass eine Expression erst mit der Entartung der Zellen festzustellen ist. Dies wird darin begründet, dass S1P eine höhere Konzentration im Magenkrebs aufweist und daher die S1P₃-Konzentration ansteigt (Yamashita et al. 2006). Wie bereits erwähnt, wird angenommen, dass viel S1P in den Tumorzellen vorliegt, womit die Ligandenkonzentration wohl nicht für die fehlende Expression für S1P₃ in SCLC ursächlich ist.

Ein Hinweis für die fehlende Expression von S1P₃ in den SCLC könnte sein, dass die Tumore bezüglich ihrer Bedürfnisse die Rezeptoren hoch- und herab regulieren. So wird z.B. in Melanomzellen viel S1P₂ gefunden (Yamaguchi et al.). Brustkrebszellen exprimieren wenig S1P₂ und viel S1P₃, aber kein S1P₁ (Dolezalova et al. 2003).

Gliomzellen weisen wiederum S1P₂, S1P₃ und S1P₅ auf, aber wenig S1P₁ (Young et al. 2007).

Dies wird durch die Ergebnisse bezogen auf SCLC bestätigt, da S1P₂ die höchste S1P-Rezeptorenexpressionsrate aufweist. Auch die Wahrscheinlichkeit, dass die unterschiedliche Expression von den Rezeptoren S1P₁ und S1P₃ in Bezug auf SCLC durch die Bedürfnisse der jeweiligen Krebsart begründet ist, scheint wahrscheinlich.

Der Aspekt, der jeweiligen Regulierung der Expression durch den Tumor, wird in anderer Hinsicht unterstützt; und zwar wird beschrieben, dass die Expression von S1P₅ von dem Differenzierungsgrad der Zelle abhängig ist (Meyer zu Heringdorf u. Jakobs 2007). Es könnte daher die These aufgestellt werden, dass der Differenzierungsgrad der SCLC-Tumorzellen mit der S1P₃-Expression in Verbindung steht. Diese These müsste durch weitere Forschungsarbeit belegt oder widerlegt werden.

5.4 Regulationsmechanismen von S1P₄ in SCLC

Die Ergebnisse dieser Arbeit beschreiben auch eine Expression des Rezeptors S1P₄ in SCLC. Dieser Rezeptortyp wird nicht in vielen Krebszellen exprimiert (Hu et al. 2010, Young et al. 2007).

Bezogen auf die Expression dieses Rezeptors in SCLC ist dies nicht überraschend, da S1P₄ auch in Lungengewebe exprimiert wird (Graeler et al. 1998). Die höchste Rezeptorexpression ist in den H82-Zellen zu finden und liegt, bezogen auf die gesamte Rezeptorexpression, im mittleren Bereich. Für die vier anderen Zelllinien liegt die S1P₄-Expression deutlich geringer vor.

Die mittlere Expression an H82 muss kontrovers zu den Ergebnissen der Wachstumsgeschwindigkeit und Tumorgröße (H82 am höchsten) diskutiert werden, weil S1P₄ das Zellwachstum hemmt.

Weiterhin hemmt S1P₄ die Zellmigration, welches wiederum mit der niedrigen Metastasenanzahl für H82 einhergeht (Meyer zu Heringsdorf u. Jakobs 2007, Sodeur et al. 2009). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass es bei S1P₄-exprimierten Tumoren durch eine Überexpression des Rezeptors zu einer Hemmung der Metastasierung kommt. Wird dieser Ansatzpunkt in weiteren Untersuchungen bestätigt, würde ein weiteres Ziel sein, einen Agonisten für S1P₄ zu finden, der therapeutisch einsetzbar ist.

In einer neueren Studie ist herausgefunden worden, dass zusammen mit S1P₄ in Brustkrebszellen für die Regulation der ERK1/2 ein weiterer Rezeptortyp von

entscheidender Bedeutung ist. Die ERK1/2-Regulation erfolgt nicht nur über S1P₄ und S1P, sondern auch durch den human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) (Long et al. 2010).

HER2 steht nicht in Abhängigkeit der Sphingosinkinasen (Long et al. 2010) und lässt daher neue therapeutische Forschungsansätze außerhalb des Sphingosinkreislaufs zu.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich der Expression von S1P₄ sollten weitere Untersuchungen mit dem SCLC zeigen, ob diese Regulationsart auf SCLC-Zellen sowie weitere Krebsarten zutrifft, die ebenfalls eine positive Expression für S1P₄ haben.

Eine andere Besonderheit des S1P₄-Rezeptors ist die besondere Ligandenbindung neben dem S1P, nämlich durch das phyto-S1P und das dihydro-S1P. In Bezug auf das SCLC sollten weitere Untersuchungen stattfinden, ob diese Liganden neben dem S1P in den SCLC-Tumorzellen vorkommen und dies ein weiterer therapeutischer Ansatzpunkt sein könnte, da diese Liganden spezifisch für S1P₄ sind.

5.5 Regulationsmechanismen von S1P₅ in SCLC

Die Expression von S1P₅ in SCLC ist nach den vorliegenden Ergebnissen eher als gering einzustufen. Allerdings ist die Expression von S1P₅ bezüglich des SCLC erwartet worden, da diese Epithelzellen neuroektodermalen Ursprunges sind (Onganer et al. 2005) und S1P₅ hauptsächlich in neuronalen Gewebe exprimiert wird (Takabe et al. 2008, Hurst et al. 2008).

Die Expression von S1P₅ in den SCLC Tumorzellen ist sehr niedrig im Vergleich zu den anderen Rezeptorexpressionen. Dies könnte darin begründet sein, dass die Überexpression von S1P₅ die Zellmigration hemmt. Daher wird angenommen, dass die Krebszellen S1P₅ herab regulieren. Gezeigt wurde dieses Phänomen bei der Untersuchung von Ösophaguskrebszellen, bei denen die Konzentration für S1P₅ in Ösophaguskrebszellen deutlich geringer ist als in gesunden Zellen (Hu et al 2010).

Diese These wird durch die Ergebnisse in dieser Arbeit bestätigt, da die Expression von S1P₅ im maximalen Mittelwert deutlich geringer ist als die Expression von S1P₄ und S1P₁. Es ist, zur Stützung dieser These, sicherlich erforderlich, dass eine Untersuchung von gesunden Zellen der Lungenschleimhaut bezüglich der Expressionshöhe von S1P₅ erfolgt und dies mit den Ergebnissen dieser Arbeit verglichen wird. Die therapeutische Konsequenz wäre bei übereinstimmenden Ergebnissen die Anhebung der S1P₅-Expression, um eine Hemmung der SCLC-Tumorzellen zu erzielen.

Ein weiterer Aspekt in der oben genannten Arbeit ist nicht nur die Hemmung der Zellmigration sondern auch, dass die Zellproliferation und DNA-Synthese durch die S1P₅-Überexpression gehemmt wird (Hu et al. 2010).

Dabei wird diskutiert, ob die Rezeptor-auslösenden Prozesse Liganden-abhängig oder Liganden-unabhängig sind. Dies ist dadurch bedingt, dass durch S1P₅ in Anwesenheit von S1P der cAMP-Spiegel eigentlich absinken müsste, da S1P₅ durch S1P gehemmt wird. Der cAMP-Spiegel sinkt allerdings nicht weiter ab. Es ist daher fraglich, ob S1P₅ Liganden-sensibel ist oder die Homöostase des cAMP-Spiegels durch andere Mechanismen geregelt wird (Niedernberg et al. 2003).

Dieser Aspekt ist durch eine andere Untersuchung der S1P₅-Expression an Gliomzellen bestätigt worden. In dem entsprechenden Artikel wird beschrieben, dass bei Hochregulation von S1P₅ mit und ohne Anwesenheit von S1P die Zellproliferation und die DNA-Synthese von Gliomzellen signifikant gehemmt wird (Young et al. 2007).

Im Gegensatz hierzu wird beschrieben, dass in Abwesenheit von S1P aktivierte ERK erniedrigt ist und durch Stimulation durch S1P das Level aktivierter ERK noch niedriger ist (Young et al. 2007). Dies würde eine Beeinflussung durch einen Liganden bestätigen.

Dies sollte Gegenstand weiterer Forschung sein, da Tumore wie der SCLC, die S1P₅ exprimieren, einen sehr spezifischen Angriffspunkt zeigen. Zum anderen wird dann bei einer Liganden-unabhängigen Regulation der Einsatz von einem S1P-Analogon als nicht sinnvoll erachtet.

Als einen weiteren Punkt muss das geringe Expressionsausmaß von S1P₅ betrachtet werden. Es ist fraglich, ob hier ein therapeutischer Ansatz sinnvoll erscheint. Es sollten weitere Messungen vorliegen, bevor darüber eine klare Entscheidung zu treffen ist.

5.6 Andere einflussnehmende Elemente auf S1P-Rezeptoren

Wie schon im Bereich des Rezeptors S1P₄, wo die Anwesenheit von HER2 für die Stimulation der Signalkaskade benötigt wird, sind andere Aspekte zu erwähnen, die Einfluss auf die Expression der S1P-Rezeptoren nehmen.

Als einen weiteren einflussnehmenden Aspekt müssen die Steuerelemente der Signalkaskade berücksichtigt werden. Es wird beschrieben, dass das G_i-Protein in die positive Regulation in Bezug auf Migration und Invasion der Magenkrebszellen durch S1P₃ im Bereich des S1P-abhängigen Signalwegs involviert ist. Es ist aber nicht involviert in die negative Regulation auf Zellmigration und Invasion durch S1P₂. Hierbei wird weiter

ausgeführt, dass S1P₃ neben dem G_i-Protein auch die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-Kinase) für die Stimulation der Chemotaxis benötigt. S1P₂ lässt seinen Signalweg nur über G_i-Proteine vermitteln (Yamashita et al. 2006). Dies ist ein weiterer Grund für die Behauptung, dass für die Rezeptoraktivität der S1P-Rezeptoren nicht nur die Liganden als entscheidendes Element wichtig sind. Dies wird durch die intrinsische Wirkung des S1P₅ ebenfalls bestätigt.

Als ein weiterer Aspekt wird beschrieben, dass der S1P-Regelkreislauf sehr komplex ist und daher angenommen wird, dass nicht nur ein Rezeptor z.B. auf Gliomzellen wirkt, sondern ein Zusammenspiel von mehreren Faktoren stattfinden muss. Diese These wird damit begründet, dass, durch den Ausfall von S1P₂ und S1P₃, S1P₁ in Bezug auf die Zellproliferation weiter regulierend wirkt. Dies könnte durch die verschiedenen G-Proteine bedingt sein, die für die Stimulation der Signalkaskade benötigt werden. Daher wird ein therapeutischer Ansatz bezüglich der drei Hauptrezeptoren S1P₁, S1P₂ und S1P₃ bezogen auf die Gliomzellen vorgeschlagen (Young et al. 2007). Dieser Vorschlag würde auch für SCLC entscheidend sein, da nicht nur S1P₂ wirkt, sondern auch S1P₁, S1P₄ und fraglich S1P₅. Alle zusammen wirken auf die Zellproliferation und Zellmigration des SCLC, wodurch seine charakteristischen Eigenschaften dargestellt werden.

Diese These wird nochmals durch die Ergebnisse in der Untersuchung von Schilddrüsenkrebszellen bestätigt. In ihnen wird beschrieben, dass S1P₁ und S1P₃ für die Zellmigration zuständig sind, S1P₁ alleine aber unfähig ist, die Zellmigration einzuleiten (Balthasar et al. 2006).

Als einen weiteren einflussnehmenden Aspekt der Signalkaskade der S1P-Rezeptoren ist auch der Regelkreislauf des S1P zu nennen. Durch die Hemmung bzw. Förderung in diesem Bereich wird die Produktion von S1P entweder herauf oder herab reguliert, was dementsprechende Folgen auf die S1P-Rezeptoren hat.

Als typisches Beispiel sei der Einfluss auf die Sphingosinkinase zum Herabregulieren der Rezeptoren benannt (Young et al. 2007).

Die Expression der Sphingosinkinase ist in dieser Arbeit bezogen auf die SCLC nicht weiter untersucht worden. Für gesunde Lungenzellen ist bekannt, dass hier die Sphingosinkinase Typ 1 produziert wird, nicht aber Typ 2 (Zhao et al. 2009).

Eine Untersuchung in krebsinfiltrierter Darmmukosa hat eine stark erhöhte Expression der Sphingosinkinase Typ 1 dargestellt, wohingegen die gesunde Darmmukosa wenig oder keine Sphingosinkinase Typ 1 vorweist. Daher ist naheliegend, auf der Suche nach

therapeutischen Ansätzen, die Sphingosinkinase zu berücksichtigen, da sie in der Literatur auch als Onkogen bezeichnet wird (Kawamori et al. 2009).

Dafür wären bezogen auf die SCLC weitere Untersuchungen notwendig, wie z.B. eine vorliegende Erhöhung der Sphingosinkinase Typ 1 in SCLC, um einen erneuten therapeutischen Ansatz aufzuzeigen.

In einer anderen Studie wird auf das unterschiedliche Verhalten der Rezeptorexpression in Brustkrebszellen durch Einwirken von äußeren Einflüssen eingegangen (Dolezalova et al. 2003). Bei den Brustkrebszellen werden, wie zuvor beschrieben, überwiegend S1P₃ und wenig S1P₂ in unbehandelten Brustkrebszellen exprimiert. Diese Zellen sind dann mit retinoid acid (RA) und mit Vitamin D3 behandelt worden. Bei Behandlung der Zellen mit RA ist festgestellt worden, dass überwiegend S1P₂ exprimiert worden ist und kaum noch S1P₃. Bei Behandlung der Zellen mit Vitamin D3 ist für beide Rezeptoren geringe Expressionslevel erreicht worden. Die deutliche Beeinflussung der Rezeptorexpression durch RA und Vitamin D3 lässt folgende therapeutische Ziele suggerieren:

Zum einen wird sich, durch die Unterdrückung von S1P₂ und S1P₃ vermutlich die Tumorgenese verringern. Zum anderen zeigt sich, durch die Hemmung von S1P₃ durch RA und eine gesteigerte Expression von S1P₂, eine geringere Migration der Tumorzellen. Ziel ist es also, für jeden Tumor den richtigen Agonisten für S1P₂ und einen Antagonisten für S1P₃ zu finden (Dolezalova et al. 2003). Bezogen auf den SCLC bedeutet dies, dass weitere Untersuchungen bezüglich eines Agonisten, der die Rezeptorexpression unterdrückt, stattfinden sollten. Da die Hauptexpression für SCLC bei S1P₂ liegt, wäre die Behandlung der Zellen mit Vitamin D3 ein erster Ansatz.

In dieser Arbeit ist die Rolle von S1P ausführlich für die Rezeptoren beschrieben worden. Es wird diskutiert, dass nicht nur S1P als Ligand für die S1P-Rezeptoren wichtig ist, sondern auch das lysophosphatidic acid (LPA) als Ligand Einfluss nimmt. LPA gehört, wie das S1P, zu der Gruppe der Lysophospholipide.

Es ist bereits beschrieben worden, dass die Rezeptoren in Anwesenheit eines Lysophospholipids entweder hoch oder herab reguliert werden. Im Ovarialkarzinom ist beobachtet worden, dass durch die Anwesenheit von LPA (Lysophospholipid acid) S1P₂ und S1P₃ herauf reguliert werden. S1P₁, S1P₄ und S1P₅ werden hingegen durch die Anwesenheit von S1P herauf reguliert. Andersherum werden S1P₂ und S1P₃ durch S1P

herab reguliert, während S1P₁, S1P₄ und S1P₅ durch LPA herab reguliert werden (Smicun et al. 2006).

Diese Ergebnisse würden erklären, warum die Expression von S1P₁, S1P₄ und S1P₅ sehr ähnlich ausfällt. Allerdings erklären sie nicht, warum keine Expression von S1P₃ vorhanden ist. Auch stimmt diese Annahme nicht mit der Theorie überein, dass in den SCLC-Zellen viel S1P vorliegt, was durch die Expression der Rezeptoren von S1P₁ und S1P₂ begründet worden ist.

6 Zusammenfassung

S1P ist als bioaktives Lysophospholipidmolekül in vielen Bereichen des Körpers essentiell in die Regulation des Zellstoffwechsels eingebunden. Die dazugehörigen Rezeptoren S1P₁₋₅ regulieren wichtige zelluläre Funktionen wie Zellproliferation, Zellmigration, Chemotaxis, Zell-Zell-Kontakte und Zelladhäsion. Der Ligand S1P mit dem Rezeptor S1P₁ spielt bei der Auswanderung der T-Lymphozyten aus dem Thymus eine entscheidende Rolle. Daher stellt sich die Frage, ob bei der Auswanderung der Tumorzellen S1P in Analogie zu den Lymphozyten hier ebenfalls eine entscheidende Rolle spielt.

Es sind in der vorliegenden Arbeit die Expressionen der fünf Rezeptoren S1P₁₋₅ auf kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen (OH1, OH3, H69, H82 und SW2) aus Kulturzellen und aus Primärtumoren (aus SCID-Mäusen) untersucht worden. Dabei sollte nachgewiesen werden, ob diese spezifischen Rezeptoren, die an den Liganden S1P binden, vermehrt auf den Zellen vorkommen. Aufgrund seines aggressiven Wachstums und seiner frühen hämatogenen Metastasierung ist das kleinzellige Bronchialkarzinom als Modellsystem ausgewählt worden. Die Untersuchung erfolgte mittels Real-Time-PCR mit der relativen Quantifizierung am LightCycler.

Bei der Auswertung der Ergebnisse ist deutlich geworden, dass die Expression der Rezeptoren in den Kulturzellen nicht vergleichbar mit ihrer Expression in den Primärtumoren ist. Bis auf S1P₂ fielen alle Ergebnisse für die Kulturzellen negativ aus. Für S1P₃ ist weder in Kultur noch auf den Tumoren eine Expression festgestellt worden. S1P₁, S1P₄ und S1P₅ wiesen insgesamt sehr unterschiedliche Expressionsraten auf. Aufgrund der unterschiedlichen Expressionsraten der Rezeptoren auf den unterschiedlichen Tumorzellen kann keine allgemeingültige Aussage in Hinsicht auf das Metastasierungsverhalten des kleinzelligen Bronchialkarzinoms getroffen werden.

Allerdings könnte ein weiterer Aspekt hinsichtlich der Tumorprogression die Regulierung spezieller Rezeptoren darstellen. Aufgrund des neuroektodermalen Ursprungs des Tumors ist eine hohe S1P₅-Expression erwartet worden. Diese Rezeptoren sind allerdings in den Zellen der Kultur nicht exprimiert worden. Da S1P₅ hemmend auf die Zellproliferation wirkt, zeigt seine Herabregulierung in allen Zellen in der Kultur an, dass die Expression dieses Rezeptors in einem frühen Stadium der malignen Progression abgeschaltet wird. Neben dieser speziellen Regulierung kann bei dem kleinzelligen Bronchialkarzinom auf eine ligandenabhängige Steuerung über S1P geschlossen werden. Besonders die niedrigen Expressionsraten für S1P₁ und die hohen Expressionsraten für S1P₂ bestätigen diese These, da S1P₁ durch eine große Menge von S1P herab und S1P₂ herauf reguliert wird.

7 Literaturverzeichnis

Aebert H, Eckert R, Friedel G, Geißler M, Golf A, Hartmann JT, Hehr T, Hetzel J, Ohmenhäuser A, Schäfer J, Simon H, Sökler M, Steger V, Vogel F, Wehrmann M, Weinmann M, Wickert M (2008) Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge: Bronchialkarzinom. Schriftenreihe „Therapieempfehlungen“ des Südwestdeutschen Tumorzentrums – Comprehensive Cancer Center Tübingen 3. Auflage, Tübingen, 3-14.

Allende ML, Dreier JL, Mandala S, Proia RL (2004) Expression of the Sphingosine 1-Phosphate Receptor, S1P₁, on T-cells Controls Thymic Emigration. *J Biol Chem* 279: 15396-15401.

Alvarez SE, Milstien S, Spiegel S (2007) Autocrine and paracrine roles of sphingosine-1-phosphate. *Trends Endocrinol Metab* 18: 300-307.

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. *J Biol Chem* 278: 32841-32851.

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

Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H (2008) *Pathologie*. 4. Auflage, Urban & Fischer, München, 191-196.

Carney DN, Gazdar AF, Bepler G, Guccion JG, Marangos PJ, Moody TW, Zweig MH, Minna JD (1985) Establishment and Identification of Small Cell Lung Cancer Cell Lines Having Classic and Variant Features. *Cancer Res* 45: 2913-2923.

Cooper S, Spiro SG (2006) Small cell lung cancer: Treatment review. *Respirology* 11: 241-248.

Deppermann KM (2011) Epidemiologie des Lungenkarzinoms. *Internist (Berl.)* 52: 125-129.

Derbyshire EJ, Stahel RA, Wawrzynczak EJ (1992) Cytotoxic properties of a ricin A chain immunotoxin recognizing the cluster-5A antigen associated with human small-cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 35: 417-420.

Dolezalova H, Shankar G, Huang MC, Bikle DD, Goetzl EJ (2003) Biochemical Regulation of Breast Cancer Cells Expression of S1P₂ (Edg-5) and S1P₃ (Edg-3) G- Protein-Coupled Receptors for Sphingosine 1-Phosphate. *J Cell Biochem* 88: 732-743.

Ganti AK, West WW, Lackner RP, Kessinger (2010) Current Concepts in the Diagnosis and Management of Small-Cell Lung Cancer. *Oncology (Williston Park)* 24: 1034-1039.

Gazdar AF, Carney DN, Russell EK, Sims HL, Baylin SB, Bunn PA, Guccion JG, Minna JD (1980) Establishment of Continuous, Clonable Cultures of Small-Cell Carcinoma of the Lung Which Have Amine Precursor Uptake and Decarboxylation Cell Properties. *Cancer Res* 40: 3502-3507.

Gazdar AF, Carney DN, Nau MM, Minna JD (1985) Characterization of Variant Subclasses of Cell Lines Derived from Small Cell Lung Cancer Having Distinctive Biochemical, Morphological, and Growth Properties. *Cancer Res* 45: 2924-2930.

Graeler MH, Bernhardt G, Lipp M (1998) EDG6, a novel G-protein-coupled receptor related to receptors for bioactive lysophospholipids, is specifically expressed in lymphoid tissue. *Genomics* 53: 164-169.

Griffin CA, Baylin SB (1985) Expression of the c-myc Oncogene in Human Small Cell Lung Carcinoma. *Cancer Res* 45: 272-275.

Horn F (2009) *Biochemie des Menschen*. 4 Auflage, Thieme, Stuttgart, 308-352.

Hu WM, Li L, Jing BQ, Zhao YS, Wang CL, Feng L, Xie YE (2010) Effect of S1P5 on proliferation and migration of human esophageal cancer cells. *World J Gastroenterol* 16: 1859-1866.

Hurst JH, Mumaw J, Machacek DW, Sturkie C, Callihan P, Stice SL, Hooks SB (2008) Human neural progenitors express functional lysophospholipid receptors that regulate cell growth and morphology. *BMC Neurosci* 9:1-18.

Im DS, Clemens J, Macdonald TL, Lynch KR (2001) Characterization of the Human and Mouse Sphingosine 1-Phosphate Receptor, S1P₅ (EDG-8): Structure-Activity Relationship of Sphingosine 1-Phosphate Receptors. *Biochemistry* 40: 14053-14060.

Ishii I, Fukushima N, Ye X, Chun J (2004) Lysophospholipid Receptors: Signaling and Biology. *Annu Rev Biochem* 73: 321-354.

Kawamori T, Kaneshiro T, Okumura M, Maalouf S, Uflacker A, Bielawski J, Hannun YA, Obeid LM (2009) Role for sphingosine kinase 1 in colon carcinogenesis. *FASEB J* 23: 405-414.

Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC (2007) *Biochemie und Pathobiochemie*. 8. Auflage, Springer, Heidelberg, 773-785, 1141-1162.

Long JS, Fujiwara Y, Edwards J, Tannahill CL, Tigyi G, Pyne S, Pyne NJ (2010) Sphingosine 1-Phosphate Receptor 4 uses HER2 (ERBB2) to regulate extracellular signal regulated kinase-1/2 in MDA-MB-453 breast cancer cells. *J Biol Chem* 285: 35957-35966.

Lynch KR, Macdonald TL (2008) Sphingosine 1-phosphate chemical biology. *Biochim Biophys Acta* 1781: 508-512.

Mabry M, Nakagawa T, Nelkin BD, McDowell E, Gesell M, Eggleston JC, Casero RA JR, Baylin SB (1988) V-Ha-ras oncogene insertion: A model for tumor progression of human small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 6523-6527.

Maceyka M, Payne SG, Milstien S, Spiegel S (2002) Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1585: 193-201.

Meyer zu Heringdorf D, Jakobs KH (2007) Lysophospholipid receptors: Signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1768: 923-940.

Micke P, Faldum A, Metz T, Beeh KM, Bittinger F, Hengstler JG, Buhl R (2002) Staging small cell lung cancer: Veterans Administration Lung Study Group versus International Association for the Study of Lung Cancer--what limits limited disease? *Lung Cancer* 37: 271-276.

Mitra P, Payne SG, Milstien S, Spiegel S (2007) A Rapid and Sensitive Method to Measure Secretion of Sphingosine-1-Phosphate. *Methods Enzymol* 434: 257-264.

Muguruma H, Yano S, Kakiuchi S, Uehara H, Kawatani M, Osada H, Sone S (2005) Reveromycin A inhibits osteolytic bone metastasis of small-cell lung cancer cells, SBC-5, through an antiosteoclastic activity. *Clin Cancer Res* 11: 8822-8828.

Murray N, Turrisi T (2006) A Review of First-Line Treatment for Small-cell Lung Cancer; *J Thorac Oncol* 1: 270-278.

Niedernberg A, Blaukat A, Schöneberg T, Kostenis E (2003) Regulated and constitutive activation of specific signaling pathways by the human S1P5 receptor. *Br J Pharmacol* 138: 481-493.

Onganer, PU, Seckl MJ, Djamgoz MBA (2005) Neuronal characteristics of small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 93: 1197–1201.

Oskeritzian CA, Milstien S, Spiegel S (2007) Sphingosine-1-phosphate in allergic responses, asthma and anaphylaxis. *Pharmacol Ther* 115: 390-399.

Pollock J, Garon E (2010) Management of Small-Cell Lung Cancer: Time to Move Forward. *Oncology (Willston Park)* 24: 1043, 1046-1047.

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

Roche Applied Science (2005) Technical Note Assay Formats for Use in Real-Time-PCR. Roche Diagnostik GmbH, No. LC 18/2008, Mannheim.

Roche Applied Science: The LightCycler System. Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/lightcycler/lightcycler_docs/brochures/lc_instrument_brochure.pdf (Stand 24.06.2011, 18:00).

Smicun Y, Reierstad S, Wang FQ, Lee C, Fishman DA (2006) S1P regulation of ovarian carcinoma invasiveness. *Gynecol Oncol* 103: 952-959.

Sodeur S, Ullrich S, Gustke H, Zangenmeister-Wittke U, Schumacher U (2009) Increased numbers of spontaneous SCLC metastasis in absence of NK cells after subcutaneous inoculation of different SCLC cell lines into pfp/rag2 double knock out mice. *Cancer Lett* 282: 146-151.

Spiegel S (1999) Sphingosine 1-phosphate: a prototype of a new class of second messengers. *J Leukoc Biol* 65: 341–344.

Spiegel S, Milstien S (2002) Sphingosine 1-Phosphate, a Key Cell Signaling Molecule. *J Biol Chem* 277: 25851-25854.

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

Starke H (2006) Expression von Differenzierungsmarkern in kombinierten kleinzelligen Bronchialkarzinomen. Medizinische Dissertation, Universität Marburg Innere Medizin.

Taha TA, Hannun YA, Obeid LM (2006) Sphingosine Kinase: Biochemical and Cellular Regulation and Role in Disease. *J Biochem Mol Biol* 39: 113-131.

Taha TA, Argraves KM, Obeid LM (2004) Sphingosine-1-phosphate receptors: receptor specificity versus functional redundancy. *Biochim Biophys Acta* 1682: 48-55.

Takabe K, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S (2008) “Inside-Out” Signaling of Sphingosin-1-Phosphate: Therapeutic Targets. *Pharmacol Rev* 60: 181-195.

Thudichum J (1884) A treatise on the chemical constitution of the brain. Bailliere, Tindall and Cox., London, 149.

Wang W, Graeler MH, Goetzl EJ (2005) Type 4 sphingosine 1-phosphate G protein-coupled receptor (S1P4) transduces S1P effects on T cell proliferation and cytokine secretion without signaling migration. *FASEB J* 19: 1-16.

Watkins DN, Berman DM, Baylin SB (2003) Hedgehog Signaling, Progenitor Phenotype in Small-Cell Lung Cancer. *Cell Cycle* 2: 196-198.

Welsch (2006) Lehrbuch Histologie. 2. Auflage, Urban & Fischer, München, 27-36.

Worden FP, Kalemkerian GP (2000) Therapeutic advances in small cell lung cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 9: 565-579.

Yamaguchi H, Kitayama J, Takuwa N, Arikawa K, Inoki I, Takehara K, Nagawa H, Takuwa Y (2003) Sphingosine-1-phosphate receptor subtype-specific positive and negative regulation of Rac and haematogenous metastasis of melanoma cells. *Biochem J* 374: 715-722.

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: 80-87.

Yano S, Nishioka Y, Izumi K, Tsuruo T, Tanaka T, Miyasaka M, Sone S (1996) Novel metastasis model of human lung cancer in SCID mice depleted of NK cells. *Int J Cancer* 67: 211-217.

Young N, van Brocklyn JR (2007) Roles of Sphingosine-1-Phosphate (S1P) Receptors in Malignant Behavior of Glioma Cells. Differential Effects of S1P2 on Cell Migration and Invasiveness. *Exp Cell Res* 313: 1615-1627.

Zhao Y, Kalari SK, Usatyuk PV, Gorshkova I, He D, Watkins T, Brindley DN, Sun C, Bittman R, Garcia JGN, Berdyshev EV, Natarajan V (2007) Intracellular Generation of Sphingosine 1-Phosphate in Human Endothelial Cells: Role of Lipid Phosphate Phosphatase-1 and Sphingosine Kinase 1. *J Biol Chem*. 282: 14165–14177.

Zieglschmid V (2003) Expressionsanalyse zum Nachweis disseminierter Tumorzellen im Blut von Brustkrebspatientinnen. Naturwissenschaftliche Dissertation, Universität Wolfsburg.

8 Danksagung

Die Fertigstellung dieser Arbeit ist ohne die fachliche aber auch emotionale Unterstützung durch Mitarbeiter des Instituts, Freunde und Familie nicht möglich gewesen. Ich möchte mich daher bei allen Beteiligten recht herzlich bedanken, auch wenn ich an dieser Stelle nicht alle namentlich nennen kann:

Mein Dank gilt in erster Linie meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Udo Schumacher, der auf direkte Weise immer ansprechbar für mich war und mir stets mit Rat und Tat eine große Unterstützung gewesen ist.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinem Betreuer, Herrn Dr. Reinhard Müller, Institut für Anatomie II, Experimentelle Morphologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf, der mich in die Labortätigkeit eingearbeitet und mir in dieser Eingewöhnungszeit mit Tipps und Tricks die Laborvorgänge verständlicher gemacht hat.

Eine wichtige Unterstützung waren auch die Mitarbeiterinnen des Instituts für Anatomie II, Frau Renate Gehrke und Frau Kathrin Stübke, die mir wiederum für Fragen im Laboralltag zur Seite standen.

Im Weiteren möchte ich mich bei meinen Kollegen, Herrn Woiteck Bialecki und Daniel Pörtner bedanken, die die Etablierung der Standardkurven am LightCycler vorgenommen haben. Bedanken möchte ich mich auch bei Christoph Berliner, der mich in die RNA-Gewinnung aus den Tumoren eingewiesen hat.

Auch gilt mein Dank Prof. Zangenmeister-Wittke, Universitätsspital Zürich, Schweiz, von dem freundlicherweise die Zelllinien zur Verfügung gestellt worden sind.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Ehemann Tobias und meiner Familie, meiner Mutter und meinem Vater sowie meiner Schwester Daniela, die mich mit ihren Gedanken und Verständnis immer unterstützt haben.

Für weitere positive Gedanken und Unterstützung auf meinem langen zweiten Bildungsweg möchte ich mich bei Prof. Dr. Hartwig Euler, Carolin Hempel, Christin Hempel, Wiebke Petersen, Sebastian Koch und Dr. Nicole Dischinger bedanken, die mir in den guten und schlechten Zeiten den nötigen Anschub gegeben haben.

Mein Dank gilt auch meiner „Boxpartnerin“ Marlien Hinz, ohne die ich in der Anatomie II nicht nach einer freien Doktorandenstelle gefragt hätte.

9 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.

Jessica Allendorf