

Diplomarbeit

**Sphingolipide als autokrine
Wachstumsfaktoren für Glioblastomzellen**

eingereicht von

Anna Martina Brunner

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor(in) der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Institut für Molekularbiologie und Biochemie

unter der Anleitung von

Prof. Dr. Wolfgang Sattler

Ort, Datum

(Unterschrift)

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am

Unterschrift

Danksagungen

Diese Diplomarbeit wurde durch das Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Medizinischen Universität Graz, unter dem Vorstand von Herrn Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Greier, ermöglicht.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Univ.-Prof. Mag. Dr. Wolfgang Sattler, der mir dieses Thema zur Verfügung stellte und mich großartig bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützte, indem er jederzeit ein offenes Ohr für meine Anliegen hatte und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Die Möglichkeit, immer eine Ansprechperson zu haben und das sofortige Beantworten etwaiger Fragen sind nicht als selbstverständlich anzusehen.

Darüber hinaus gilt mein Dank natürlich auch meiner Zweitbetreuerin Frau Univ.-Prof. Mag. Dr. Dagmar Kratky für den Beistand bei der Erstellung dieser Arbeit.

Für die professionelle Einführung in die Laborarbeit und die immer freundliche, uneingeschränkte und geduldige Bereitschaft mir bei der Durchführung der praktischen Arbeiten zur Seite zu stehen, möchte ich Frau Ing. Helga Reicher ganz herzlich danken.

Mein Dank richtet sich auch an Frau Mag. Sabine Damm, die als primäre Ansprechpartnerin wesentlich zur Entstehung meiner Diplomarbeit beigetragen hat. Sie gewährte mir jederzeit bei der Planung, Durchführung und Auswertung der vorliegenden Arbeit erfahrene und wertvolle Unterstützung. Ich möchte mich bei ihr auch für die Hilfe bei der Auswertung der Ergebnisse und die gewissenhafte Durchsicht der Arbeit bedanken.

Großer Dank gebührt der gesamten Forschungsgruppe für die freundschaftliche Aufnahme in das Team und das angenehme Arbeitsklima. Danke für die unterstützenden Ratschläge, die ständige Motivation bei der Erstellung dieser Diplomarbeit und die schöne und abwechslungsreiche Zeit. Ich denke mit Dank und Freude an die gemeinsame Arbeit zurück.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir nicht nur dieses Studium ermöglicht haben, sondern auch ständig ein sehr großes Interesse an meiner Arbeit zeigten und mich so gut es ging unterstützten. Ohne sie wäre die Absolvierung dieses bedeutenden Lebensabschnitts nicht möglich gewesen.

Vielen herzlichen Dank für eure sorgsame Unterstützung!

Zusammenfassung

Hintergrund: Das Glioblastoma Multiforme gilt als der häufigste primäre Tumor des Zentralen Nervensystems. Die mittlere Überlebenszeit bei diesen Patienten liegt bei 15 Monaten nach Diagnosestellung. Der geringe Therapieerfolg ist auf die typischen Eigenschaften dieses Malignoms, die eine ausgeprägte Proliferation und die Neigung zur diffusen Infiltration umfassen, zurückzuführen.

Sphingosin-1-Phosphat, ein bioaktives Lipid reguliert nicht nur die zelluläre Proliferation, sondern auch die Migration und das zelluläre Überleben. Das zelluläre Schicksal wird durch bioaktive Metaboliten des Sphingolipidmetabolismus beeinflusst. S1P wirkt im allgemeinen proliferativ und antiapoptotisch, während Ceramid einen Wachstumsarrest bewirkt und die Apoptose induziert. Aus einer Verschiebung des Sphingolipid-Rheostats zu Gunsten von S1P resultiert ein Überlebensvorteil maligner Zellen. Die S1P-vermittelte Signaltransduktion wird durch die fünf G-Protein-gekoppelten Rezeptoren S1PR1-S1PR5 ermöglicht. Es konnte gezeigt werden, dass S1PR1-S1PR3 und S1PR5 in Glioblastom-Zelllinien und -Geweben exprimiert werden und dass deren Expression mit einer gesteigerten Proliferation und Invasion der malignen Zellen korreliert. Einige Zelltypen, die die Fähigkeit zur S1P-Synthese besitzen, können es auch sezernieren. Dieser extrazelluläre Pool an S1P bewirkt möglicherweise eine parakrine oder autokrine Regulation von Signaltransduktionswegen. Forschungsergebnisse lassen vermuten, dass ATP-Bindungskassetten-Transporter in dieses Inside-Out-Signalling involviert sein könnten.

Fragestellung: Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss der Sphingosin-1-Phosphat Synthese, des Exports und der Signaltransduktionswege auf die Proliferation von Glioblastomzellen zu untersuchen. Konkret wurden der Beitrag des endogenen Sphingolipidmetabolismus und des möglichen S1P-Exporters ABCA1 auf die U87MG Zell-Proliferation untersucht.

Methoden: *S1P Zugabe:* Je nach Versuchsanordnung wurden 40.000, 60.000 oder 100.000 Zellen am Tag null auf 12-Well ausplattiert, für 6 oder 48 Stunden serumfrei kultiviert und dann mit BSA-gebundenem S1P (100 nM, 1 µM, 10 µM) stimuliert. 3 bzw. 5 Tage nach der ersten S1P-Zugabe wurden die Zellen trypsinisiert und am Cell Counter gezählt.

Hemmung der endogenen Sphingolipidsynthese durch Verwendung pharmakologischer Antagonisten: 100.000 Zellen wurden am Tag null auf 12-Well ausplattiert, für 24 Stunden serumfrei kultiviert und dann mit den Inhibitoren SKI-II (1 µM, 5 µM), Myriocin (0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 50 µM), Desipramine (1 µM, 5 µM, 10 µM), Fumonisin B1 (1 µM, 5 µM, 10 µM) oder GW4968 (1 µM, 5 µM, 10 µM) versetzt. Nach Inkubation der Zellen für 3 Tage in An- bzw. Abwesenheit von exogen zugesetztem S1P (1 µM) wurden sie trypsinisiert und am Cell Counter gezählt.

Analyse der ABCA1-Expression mittels Western Blot: Nach Aussaat der Zellen auf 6-Well und 6-stündiger serumfreier Inkubation erfolgte die Zugabe von S1P, sowie von natürlichen und synthetischen LXR-Agonisten. Nach 24 Stunden wurden die Zellen trypsinisiert. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford Protein Assay bestimmt. Nach Bestimmung der Protein-Aliquots wurden die Zelllysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und immunreaktiver ABCA1 mittels eines Rabbit-Anti-ABCA1-Antikörpers detektiert. Als Sekundärantikörper wurde HRP-markierter Antikörper (goat-anti-rabbit) verwendet. Die Banden wurden mittels ECL+-Reaktion visualisiert.

Inhibierung von ABCA1 durch pharmakologische Antagonisten: 100.000 Zellen wurden am Tag null auf 12-Well ausplattiert, für 6 Stunden serumfrei kultiviert und dann mit den ABCA1-Antagonisten Glyburide (200 µM) und DIDS (400 µM) versetzt. Nachdem die Zellen für 3 Tage in der An- und Abwesenheit von exogen zugesetztem S1P (1 µM)

kultiviert worden sind, wurden sie trypsinisiert und die Zellzahlen mit dem Zellcounter- und Analysesystem „Casy TT“ bestimmt.

Resultate:

Die Ergebnisse (Mittelwerte +/- SD) stammen aus einem repräsentativen Experiment, das in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

S1P stimuliert die Proliferation von U87MG Zellen: Die exogene Zugabe von S1P bewirkt eine signifikante Proliferationssteigerung. BSA-gebundenes S1P führte zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der Zellzahl um das 1,3- bzw. das 1,5-fache (100 nM, 10 µM) verglichen mit den Kontrollen (bei Inkubation für 5 Tage).

Pharmakologische Hemmung des Sphingolipidmetabolismus führt zu einer Zellzahlreduktion von U87MG Zellen: Bei Verwendung pharmakologischer Antagonisten des endogenen Sphingolipidmetabolismus resultierten bei U87MG Zellen folgende antiproliferative Effekte: Reduktion der Zellzahl im Vergleich zu den Kontrollen: SKI-II (1 µM 40%, 5 µM 75%), Myriocin (0,1 µM 45%, 1 µM 50%, 5µM 33%, 10µM 55%), Desipramine (5 µM 30%, 10 µM 60%), Fumonisin B1 (10 µM 22%), GW4968 (1 µM 10% [Erhöhung], 10 µM 60%).

ABCA1-Expression: Es konnte gezeigt werden, dass ABCA1 von U87MG Zellen unter basalen Bedingungen exprimiert wird. Bei Zugabe von S1P und von natürlichen (24- und 25-OH-Cholesterin) und synthetischen (T0901317) LXR-Agonisten zeigte sich eine Expressionssteigerung: S1P: um das 2-fache, 24-OH-Cholesterin: um das 9-fache, 25-OH-Cholesterin: um das 8-fache, T0901317: um das 22-fache.

Pharmakologische Inhibitoren von ABCA1 bewirken eine Hemmung der Zellproliferation: Die Resultate dieses Versuchs zeigen einen deutlichen antiproliferativen Effekt der ABCA1-Antagonisten bei U87 Zellen mit einer signifikanten Abnahme der Zellzahl um 40%. Exogen hinzugefügtes S1P (1 µM) bewirkte eine nahezu vollständige Aufhebung der Wachstumsblockade.

Abstract

Background: Glioblastoma multiforme tumors are the most common type of primary brain tumors occurring in adult patients. GBM patients have a median life span of approximately 15 months after diagnosis. The effectiveness of treatments is limited due to the high proliferative potential and the diffusely infiltrating properties of the tumor.

Sphingosine-1-phosphate is a bioactive lipid and a potent regulator of cell growth, survival and migration. Cell fate is determined by bioactive metabolites of the sphingolipid metabolism. S1P typically induces cell proliferation and inhibits apoptosis, while Ceramide induces growth arrest and apoptosis. Therefore, tuning of the sphingolipid metabolism rheostat in favor of S1P results in a cellular survival benefit in tumorigenesis. Five different G protein-coupled receptors termed S1PR1-S1PR5 elicit S1P mediated signaling. It was demonstrated that S1PR1-S1PR3 and S1PR5 are expressed in Glioblastoma cell lines and tissue and that this expression correlates with an upregulation of their proliferative and invasive potential. Many cell types that are capable of S1P synthesis are also able to secrete it. This extracellular S1P pool can then elicit paracrine or autocrine signaling pathways. Increasing evidence suggests that ATP-binding cassette transporters are involved in the inside-out signalling.

Aim of the study: The aim of the present study was to dissect the contribution of S1P synthesis, export and signaling pathways to GBM cell proliferation. Therefore the contribution of endogenous sphingolipid synthesis and the contribution of the putative S1P efflux pump ABCA1 to U87MG glioblastoma cell proliferation was examined.

Methods: *S1P treatment:* U87MG cells were seeded at 40.000, 60.000 or 100.000 cells per well into 12 well culture plates. The cells were serum starved for 6 or 48 hours and received albumin-bound S1P (100 nM, 1 μ M, 10 μ M). 3 or 5 days after the first treatment with S1P cells were trypsinized and the cell number was determined with Casy Cell Counter.

Inhibition of endogenous sphingolipid synthesis by using pharmacological antagonists: U87MG cells were seeded at 100.000 cells per well into 12 well culture plates. The cells were serum starved for 24 hours and received the inhibitors SKI-II (1 μ M, 5 μ M), Myriocin (0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M), Desipramine (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M), Fumonisin B1 (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M) and GW4968 (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M). After the cells have been incubated in the absence or presence of S1P (1 μ M) for 3 days, they were trypsinized and the cell number was determined with Casy Cell Counter.

Western Blot analysis of ABCA1 expression: U87MG cells were seeded into 6 well culture plates. The cells were serum starved for 6 hours and received S1P and synthetic and natural LXR ligands over night. On the next day cells were trypsinized. For immunoblotting, whole cell extracts were used. Protein concentration was measured using the Bradford protein assay. Equal protein aliquots were loaded, separated on SDS-PAGE under reducing conditions, transferred to PVDF membranes and probed with specific primary antibodies. Rabbit anti-ABCA1 was used as primary antibody. To detect the signal, HRP-conjugated secondary antibody (goat-anti-rabbit) was added. Protein expression was visualized using ECL reagents.

Inhibition of ABCA1 by pharmacological antagonists: U87MG cells were seeded at 100.000 cells per well into 12 well culture plates. The cells were serum starved for 6 hours and received the ABCA1 antagonists Glyburide (200 μ M) and DIDS (400 μ M). After the cells have been incubated in the absence or presence of S1P (1 μ M) for 3 days, they were trypsinized and the cell number was determined with Casy Cell Counter.

Results: Data are means +/- standard deviations of triplicate determinations.

S1P stimulates proliferation of U87MG cells: The addition of exogenous added S1P led to significantly enhanced proliferation. BSA-complexed S1P increased cell numbers in a concentration dependent manner by 1,3- and 1,7-fold (100 nM, 10 μ M) in comparison to controls when incubated for 5 days.

Pharmacological antagonism of sphingolipid biosynthesis inhibits growth of U87MG cells: Using pharmacological antagonists of endogenous sphingolipid metabolism revealed antiproliferative effects on U87MG cells: Reduction of cell number in comparison to controls: SKI-II (1 μ M 40%, 5 μ M 75%), Myriocin (0,1 μ M 45%, 1 μ M 50%, 5 μ M 33%, 10 μ M 55%), Desipramine (5 μ M 30%, 10 μ M 60%), Fumonisin B1 (10 μ M 22%), GW4968 (1 μ M 10% [Increase], 10 μ M 60%). This antiproliferative effects was almost completely reversed in response to exogenously added S1P (1 μ M).

ABCA1 expression: ABCA1 is expressed by U87MG cells and expression is upregulated in response to S1P, natural (24- and 25-OH-Cholesterol) and synthetic (T0901317) LXR agonists: S1P: 2-fold, 24-OH-Cholesterol: 9-fold, 25-OH-Cholesterol: 8-fold, T0901317: 22-fold.

Pharmacological antagonism of ABCA1 function impairs proliferation: Using pharmacological antagonists of ABCA1 revealed a pronounced antiproliferative effect of U87MG cells by approx. 40%. This antiproliferative effects was almost completely reversed in response to exogenously added S1P (1 μ M).

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	iii
Zusammenfassung	iv
Abstract.....	vi
Inhaltsverzeichnis	viii
Glossar und Abkürzungen	xi
Abbildungsverzeichnis	xv
Tabellenverzeichnis	xvi
1 Einleitung	17
1.1 Sphingolipidmetabolismus	17
1.2 Sphingosin-1-Phosphat und andere bioaktive Sphingolipide	25
1.2.1 Ceramid	25
1.2.2 Ceramid-1-Phosphat	27
1.2.3 Weitere bioaktive Sphingolipide	28
1.2.4 Regulation des Sphingosin-1-Phosphats	28
1.2.4.1 Sphingosinkinase 1	29
1.2.4.2 Sphingosinkinase 2	29
1.2.4.3 Sphingosin-1-Phosphat-Phosphatasen, Lipid-Phosphatasen	30
1.2.4.4 Sphingosin-1-Phosphat-Lyase	31
1.2.5 Sphingosin-1-Phosphat	31
1.2.5.1 Intra- und extrazelluläre Wirkungen von Sphingosin-1-Phosphat	31
1.2.5.2 Export von Sphingosin-1-Phosphat	33
1.2.5.3 Wirkungen von Sphingosin-1-Phosphat über spezifische Rezeptoren ...	34
1.2.5.3.1 S1PR1	34
1.2.5.3.2 S1PR2	35
1.2.5.3.3 S1PR3	35
1.2.5.3.4 S1PR4	35
1.2.5.3.5 S1PR5	35
1.2.5.4 Die Rolle des Sphingolipidmetabolismus in Erkrankungen	36
1.2.5.4.1 Immunsystem	36
1.2.5.4.2 Kardiovaskuläres System	36
1.3 Der Sphingosinmetabolismus und Krebs	37
1.3.1 Der Sphingolipid-Rheostat und Krebs	37
1.3.2 Die Rolle und Funktion der S1P-Rezeptoren	38
1.3.2.1 S1PR1	39
1.3.2.2 S1PR2	39
1.3.2.3 S1PR3	40
1.3.2.4 S1PR5	40
1.3.2.5 Besonderheiten der rezeptorvermittelten Signaltransduktionswege beim Glioblastom	40
1.3.2.5.1 S1PR1	40
1.3.2.5.2 S1PR2	40
1.3.2.5.3 S1PR3	40
1.3.2.5.4 S1PR5	40
1.3.2.6 Wachstumsfaktoren und Sphingosin-1-Phosphat	40
1.3.2.6.1 EGF	41
1.3.2.6.2 Heregulin	41
1.3.2.6.3 PDGF	41
1.3.2.6.4 VEGF	41
1.3.2.6.5 LPA	42
1.3.2.6.6 Östrogen	42

1.3.2.7	Weitere Einflüsse bioaktiver Sphingolipide auf die Karzinogenese und Tumorprogression.....	42
1.3.2.7.1	Autophagie	42
1.3.2.7.2	Hypoxie	43
1.3.2.7.3	Angiogenese	44
1.4	Hirntumoren	44
1.4.1.1	Epidemiologie.....	45
1.4.1.2	Ätiopathogenese:	45
1.4.1.3	Neuropathologie:	45
1.4.1.4	Klinik.....	46
1.4.1.4.1	Symptomatologie.....	46
1.4.1.4.2	Diagnostik.....	47
1.4.1.4.3	Therapie	48
1.4.2	Besonderheiten des Glioblastoms.....	49
1.4.2.1	Abnorme Signaltransduktionswege im Glioblastoma Multiforme.....	49
1.4.2.2	Veränderungen des Metabolismus im Glioblastoma Multiforme:	51
1.4.2.3	Ätiologie und Pathogenese	51
1.4.2.4	Neuropathologie	52
1.4.2.5	Klinik.....	53
1.4.2.6	Diagnostik.....	53
1.4.2.7	Therapie	53
1.4.2.8	Nachsorge	54
1.5	Lipidmetabolismus im zentralen Nervensystem	54
1.5.1	Lipid-Homöostase im ZNS.....	55
1.5.2	Reverser Cholesterintransport	56
1.5.2.1	Einführung	56
1.5.2.2	ATP-Bindungskassetten-Transporter	57
1.5.2.2.1	Die ABCA-Subfamilie und der Reverse Cholesteroltransport.....	57
1.5.2.3	Beeinflussung des reversen Cholesterintransports durch die nukleäre Transkriptionsfaktoren LXR (Liver-X-Receptors).....	58
2	Hypothese / Fragestellung	60
3	Material und Methoden	61
3.1	Zellkultur	61
3.1.1	Zell-Linie	61
3.1.2	Kultivierung.....	61
3.1.3	Subkultivierung	61
3.1.3.1	Passagieren	61
3.1.3.2	Ausplattieren.....	62
3.2	Zellzahlbestimmung	62
3.2.1	Allgemeines	62
3.2.2	Durchführung	62
3.2.2.1	Proliferationsbestimmung: Sphingosin-1-Phosphat – Dose Response....	63
3.2.2.2	Proliferationsbestimmung nach pharmakologischer Inhibition des Sphingolipidmetabolismus mit und ohne Zugabe von Sphingosin-1-Phosphat.....	64
3.3	Auswirkungen natürlicher und synthetischer LXR-Agonisten auf die ABCA1-Expression	65
3.3.1	Zugabe der LXR-Agonisten	65
3.3.2	Proteinisolation.....	65
3.3.3	Proteinbestimmung nach Bradford	66
3.3.3.1	Allgemeines	66
3.3.3.2	Durchführung	66

3.3.4	SDS-Polyacrylamidgel-Eletrophorese.....	66
3.3.4.1	Allgemeines	66
3.3.4.2	Durchführung	67
3.3.5	Western Blot.....	67
3.3.5.1	Allgemeines	67
3.3.5.2	Durchführung	68
3.3.6	Detektion der Immunreaktion.....	68
3.3.6.1	Durchführung	68
3.3.7	Proliferationsbestimmung nach Zugabe pharmakologischer Antagonisten von ABCA1 und Zugabe von Sphingosin-1-Phosphat.....	69
4	Ergebnisse – Resultate.....	70
4.1	Ziele der Arbeit.....	70
4.2	S1P stimuliert die Proliferation von U87 Zellen	70
4.3	Pharmakologische Antagonisten der Sphingolipidbiosynthese sind potente Inhibitoren der Zellproliferation	73
4.3.1	Sphingosinkinase-Inhibitor I-II	74
4.3.2	Myriocin	74
4.3.3	Desipramin	75
4.3.4	Fumonisin B1	76
4.3.5	GW4968	76
4.4	Exogen zugesetztes S1P kann den proliferativen Block der Antagonisten teilweise aufheben	77
4.5	Synthetische und natürliche LXR-Liganden stimulieren die Expression von ABCA1	79
4.6	Auswirkungen von pharmakologischen Inhibitoren von ABCA1 auf die Proliferation von U87 Zellen.....	81
5	Diskussion	83
	Literaturverzeichnis.....	93
	Curriculum Vitae.....	99

Glossar und Abkürzungen

ABCA-G	ATP-Bindungskassetten-Transporter A bis G
ABC-Transporter	ATP-Bindungskassetten-Transporter
Akt	Proteinkinase B, Onkogen
ANP32A	Saures nukleares Phosphoprotein 32 A
ApoE	Apolipoprotein E
A-SMase	Saure Sphingomyelinase
Atg	Autophagy-related-Genes
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	Bcl-2 Antagonist of Cell Death, proapoptotisches Protein
Bax	Bcl-2 assoziiertes X Protein, Co-Faktor des Tumorsuppressor-Proteins p53
Bcl-2	B-cell lymphoma 2, Regulatorprotein der Apoptose
Bcl-xL	Protein Phosphatase 1, antiapoptotisch wirkendes Mitglied der Bcl-2-Familie
BH3	Bcl-2-Homology domain 3, Apoptose förderndes Protein
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Kohlenstoff
C _{max}	Konzentrationsmaximum
C1P	Ceramid-1-Phosphat
CD69	Cluster of Differentiation 69 Protein, kennzeichnet aktivierte T-Lymphozyten
CDC42	Cell division cycle 42; GTP-bindendes Protein
CerS	Ceramid-Synthasen
CERT	Ceramid Transport Protein
c-Fos	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog, Protoonkogen
CIB1	Calcium und Integrin bindendes Protein 1,
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX-2	Cyclooxygenase-2
CT	Computertomographie
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
DAG	1-,2-Diacylglycerine, Zwischenprodukte bei der Biosynthese der Triglyceride
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid, organisches Lösungsmittel
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL+	Electrochemilumineszenz
eEF1A	eucariotic Translation Elongation Factor 1A
EEG	Elektroenzephalographie
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERK1/2	Extracellular-signal Regulated Kinases 1/2, gehören zu den Mitogen-aktivierten Kinasen, sind an der onkogenen Transformation von Zellen beteiligt
FAPP 2	Pleckstrin Homology Domain Containing Family A Member 8, Sphingolipid Transfer Protein
FCS	fetales Kälberserum

G1-Phase	postmitotische Phase/Präsynthesephase im Zellzyklus
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GCPR	G-Coupled Protein Receptor
Gy	Gray
HDAC1/2	Histon-Deacetylasen 1/2, spielen eine Rolle in der Rb-Protein induzierten Suppression der Zellproliferation
HDL	High Density Lipoprotein
HER	Human Epidermal Growth Factor Receptor, Onkogen
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor, Transkriptionsfaktor der die zelluläre Sauerstoffversorgung reguliert
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich
HRE	Hormone Response Element
HRP	Meerrettichperoxidase, katalysiert die Chemilumineszenzreaktion des Luminols
HSAN1	Serin-Palmitoyl-Transferase Langketten-Untereinheit 1
I2PP2A	nukleärer Inhibitor der Protein-Phosphatase 2A
IgE	Immunglobulin E
IL-1 β	Interleukin-1 β
INF	Interferon, Proteine mit antitumorale Wirkung
JNK	C-Jun-N-terminale Kinasen, Stresskinasen, aktivieren proapoptische Faktoren
Da	Dalton, atomare Masseneinheit
LDL	Low Density Lipoprotein
LPA	Lysophosphatidsäure
LPP	Lipid Phosphat Phosphatase, gehören zur Familie der Hydrolasen
LXR	Leber-X-Rezeptor, gehört zu den Liganden-aktivierten Transkriptionsfaktoren
LXRE	LXR-Response Element
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinasen
MCF-7-Zellen	Michigan Cancer Foundation-7, Brustkrebs-Zelllinie
Mcl-1	Myeloid Cell Leukemia Sequence 1, gehört zur Bcl-2-Familie
Mdm	Kernprotein-Homolog, negativer Regulator des Tumorsuppressorgens p53
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	mammalian Target of Rapamycin, Second Messenger, aktiviert den PI3K-Signalweg
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat, an zahlreichen Redoxreaktionen beteiligt
Nf1	Neurofibromatose 1 – Gen, Tumorsuppressorgen
NF- κ B	Nuclear-Factor- κ -light-chain-enhancer, Transkriptionsfaktor
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen, besitzen keine antigenspezifischen Rezeptoren, gehören zum angeborenen Immunsystem
P/S	Penicillin/Streptomycin
p.o.	per os
p16	Tumorsuppressor-Gen p16
p21	Tumorsuppressor-Gen p21
p38	Tumorsuppressor-Gen p38
p53	Tumorsuppressor-Gen p53, „Wächter des Genoms“
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1, inhibiert die Fibrinolyse
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung, pH=7,4

PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Receptor
PECAM1	Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule 1, CD31
pH	pH-Wert, negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen, spielen eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellproliferation, Migration, Differenzierung
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat, gehört zu der PI3K-Familie
PKB	Proteinkinase B, Onkogen
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP1	Protein-Phosphatase 1
PP2A	Protein-Phosphatase 2A
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog, Tumorsuppressor
Rac	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1, Akt1, wichtiger Mediator des Wachstumsfaktor-vermittelten neuronalen Überlebens
Rb	Retinoblastom-Gen, Tumorsuppressor-Gen, inhibiert die Aktivität von Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie
Rho	gehört zur Familie der kleinen GTPasen, Regulator der Signaltransduktion, ist gemeinsam mit ROCK für die Ausbildung von Zellausläufern verantwortlich
ROCK	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase, reguliert gemeinsam mit Rho die Ausbildung von Zellausläufern
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1PR	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumlaurylsulfat, Monoester der Schwefelsäure, waschaktive Substanz
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, Variante der Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SP3-HDAC1	Ceramid bewirkt eine Deacetylierung von Sp3 durch die Histon-Deacetylase 1 und reguliert so die Telomerase-Expression
S-Phase	Synthesephase im Zellzyklus, Replikation der DNA, Produktion der Histone
SPL	Sphingosin-1-Phosphat-Lyase
Spns 2	Spinster Homolog 2, ist für den S1P-Efflux bei Zebrafischen verantwortlich
SPP1/2	Sphingosin-1-Phosphat-Phosphatase 1/2
T1	Längsrelaxationszeit im MRT
T2	Querrelaxationszeit im MRT
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
TRAF2	TNF-Rezeptor assoziierte Faktoren, beeinflussen unter anderem die Regulation antiinflammatorischer Reaktionen und der Apoptose
U87MG	humane Glioblastomzelllinie
UDP	Uridinphosphat
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator, Fibrinolytikum
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

WHO
ZNS

World Health Organisation
Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Sphingosin-1-Phosphat	17
Abb. 2 Schematische Darstellung des Sphingolipidmetabolismus	18
Abb. 3 Schematische Darstellung der intra- und extrazellulären Angriffspunkte von Sphingosin-1-Phosphat.....	32
Abb. 4 Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus eines ATP-Bindungskassetten-Transporter basierend auf röntgenkristallographischen Untersuchungen	33
Abb. 5 Schematische Darstellung des Ceramid-Sphingosin-Sphingosin-1-Phosphat – Rheostats.....	37
Abb. 6 Schematische Darstellung der Beeinflussung intrazellulärer Signaltransduktionswege durch S1P über seine spezifischen Rezeptoren	39
Abb. 7 Schematische Darstellung onkogener Signaltransduktionswege beim Glioblastoma Multiforme.....	50
Abb. 8 Glioblastoma Multiforme.	52
Abb. 9 Glioblastoma Multiforme.	53
Abb. 10 Schematische Darstellung der LXR-vermittelten Expressionssteigerung von ABCA1 in Astrozyten	58
Abb. 11: Einfluss von exogen zugesetztem S1P auf das Zellwachstum von U87 Zellen ...	71
Abb. 12 Einfluss von exogen zugesetztem S1P unter serumfreien Bedingungen auf das Zellwachstum von U87 Zellen	72
Abb. 13 Schematische Darstellung der Angriffspunkte der Inhibitoren im endogenen Sphingolipidmetabolismus	73
Abb. 14: Einfluss von SK I-II auf das Zellwachstum von U87 Zellen.	74
Abb. 15 Einfluss von Myriocin auf das Zellwachstum von U87 Zellen.	75
Abb. 16 Einfluss von Desipramin auf das Zellwachstum von U87.	75
Abb. 17 Einfluss von Fumonisin B1 auf das Zellwachstum von U87 Zellen.	76
Abb. 18 Einfluss von GW4968 auf das Zellwachstum von U87 Zellen.	77
Abb. 19 Einfluss von exogenem S1P auf das Zellwachstum von U87 Zellen in der Gegenwart von pharmakologischen Antagonisten der Sphingolipidbiosynthese.	79
Abb. 20 LXR Agonisten regulieren die Expression von ABCA1 in U87 Zellen.....	80
Abb. 21 Einfluss von Glyburide und DIDS auf das Zellwachstum von U87 Zellen.	82

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Histologisches Grading intrakranieller Tumoren und dessen Korrelation mit der 5-Jahres-Überlebensrate.....	46
Tab. 2 Für die Proliferationsbestimmung verwendete Konzentrationen von Sphingosin-1-Phosphat	63
Tab. 3 Für die Proliferationsbestimmung verwendete Konzentrationen pharmakologischer Inhibitoren des Sphingolipidmetabolismus	65
Tab. 4 Für die Proliferationsbestimmung verwendete Konzentrationen von S1P, sowie synthetischer und natürlicher LXR-Agonisten	65
Tab. 5 Für die Proliferationsbestimmung verwendete Konzentrationen pharmakologischer Antagonisten des ATP-Bindungskassetten-Transporters A1	69

1 Einleitung

1.1 Sphingolipidmetabolismus

Die Entdeckung der Sphingolipide erfolgte 1876 durch J.L.W. Thudichum¹, der diese Verbindungen aus Hirnextrakten isolierte. Carter erforschte schließlich die chemische Struktur der Sphingolipid-Metaboliten².

Die Sphingolipide wurden aufgrund ihrer ungewöhnlichen Eigenschaften nach der Sphinx, einer Figur aus der griechischen Mythologie, die vorbeikommenden Pilgern Rätsel aufgab, benannt.²

Sphingolipide sind eine Untergruppe der Membranlipide. Sie bestehen aus Sphingosin, einem ungesättigten Aminoalkohol, der über eine Doppelbindung mit einem Kohlenstoffgerüst verbunden ist und einer Fettsäure, die an der Sphingosin-Amino-Gruppe hängt. In Abb. 1 ist stellvertretend die Struktur von Sphingosin-1-Phosphat dargestellt. Aufgrund des unterschiedlichen Restes am C₁-Atom werden die Sphingolipide in drei Subtypen unterteilt.³

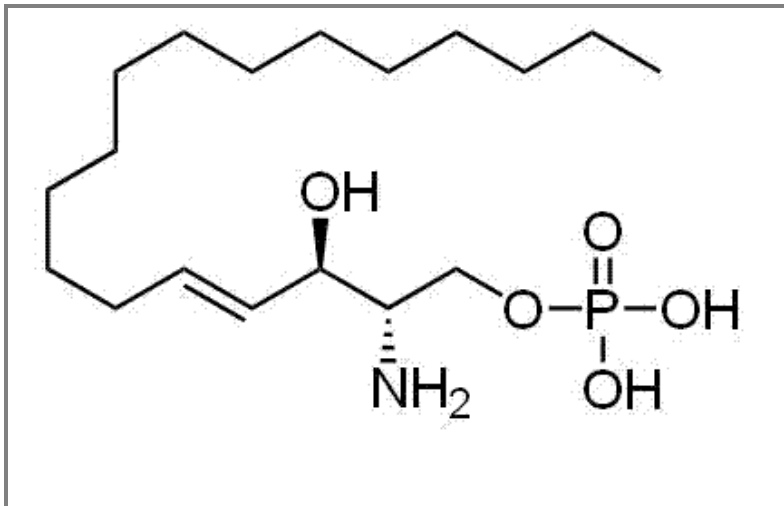


Abb. 1 Sphingosin-1-Phosphat⁴

Neben den zuerst entdeckten strukturellen Funktionen im Aufbau der Lipiddoppelschichten, übernimmt die Gruppe der bioaktiven Sphingolipid-Metaboliten wichtige Funktionen in der Regulation des Zellverhaltens und des Zellmetabolismus.^{3, 5} Darüber hinaus ermöglichen die Sphingolipide durch die Bildung so genannter Lipid-

Mikrodomänen gemeinsam mit Sterolen, eine effektivere Signaltransduktion und erleichtern die Sortierung von Proteinen.⁶

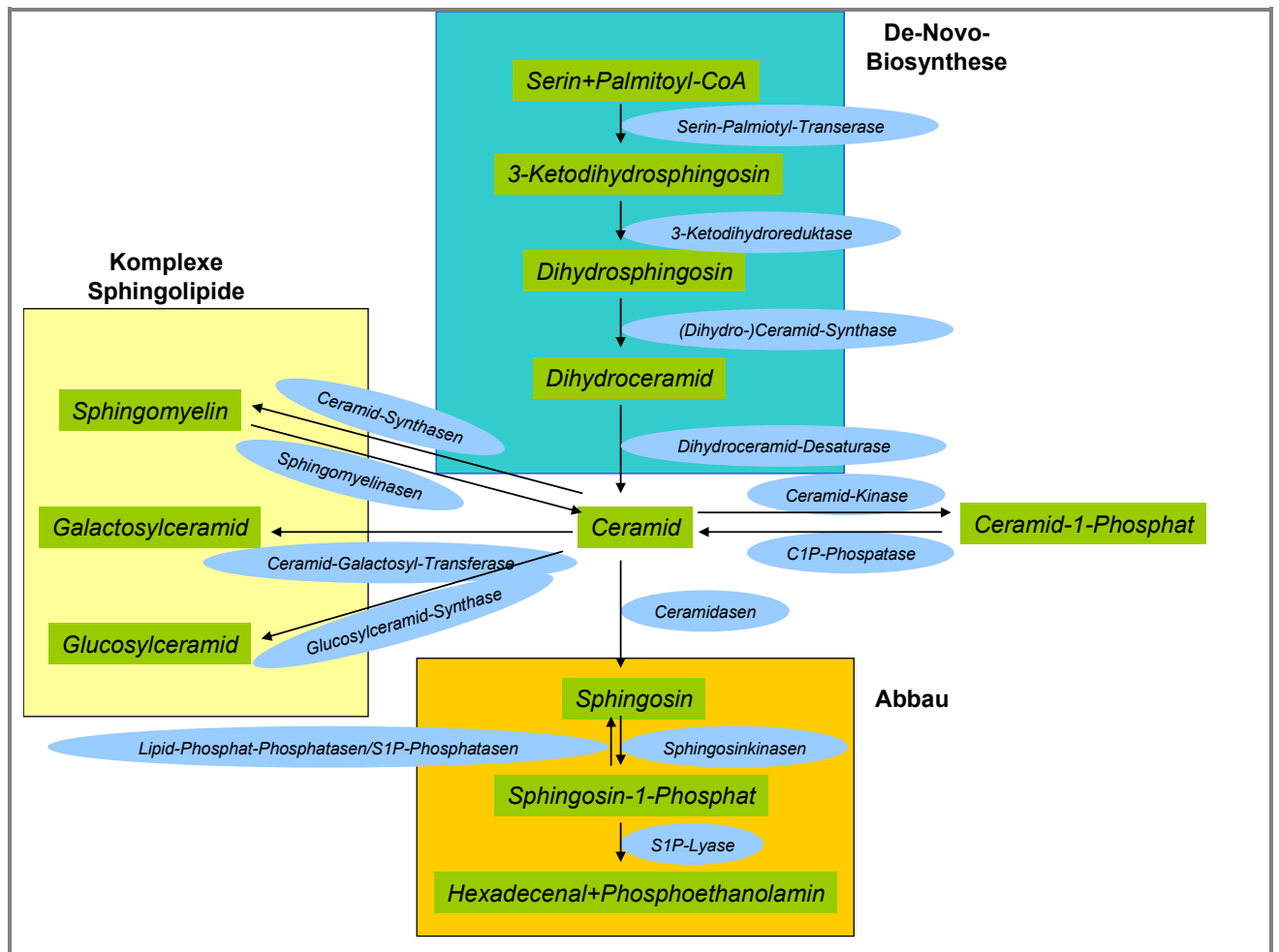


Abb. 2 Schematische Darstellung des Sphingolipidmetabolismus

Ceramid stellt das zentrale Molekül des Sphingolipidmetabolismus dar. In Abb. 2 sind die möglichen Synthesewege ausgehend von Ceramid dargestellt.

Da Ceramid nur an in Membranen-gebundener Form vorliegt, ist es meist in den Zellorganellen zu finden, in denen es produziert beziehungsweise in welche es transportiert worden ist. Daher beginnt die de novo Sphingolipidsynthese, deren erster wichtiger Schritt die, über drei Zwischenreaktionen ablaufende, Produktion von Ceramid ist, im Endoplasmatischen Retikulum. Dabei werden zuerst die sich im Cytosol befindenden Vorläufermetaboliten Serin und Palmitoyl-CoA mit Hilfe der Serin-Palmitoyl-Transferase zu 3-Ketodihydrosphingosin kondensiert. Diese Reaktion erfolgt an der cytosolischen Seite

des Endoplasmatischen Retikulums. Die Serin-Palmitoyl-Transferase selbst wird von drei Genen kodiert (SPTL1, 2 und 3), entsteht durch Bildung eines Heterodimers aus den zwei Untereinheiten SPT1 und SPT2 und befindet sich in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums.

Im nächsten Schritt erfolgt nun an der so entstandenen Verbindung die NADP-abhängige Reduktion einer Keton- zu einer Hydroxylgruppe, wodurch Dihydrosphingosin entsteht. Diese Reaktion, die sehr rasch abläuft, wird von der 3-Ketodihydroreduktase, bestehend aus drei Transmembran-Domänen und kodiert von FVT-1, katalysiert. Dieses Enzym hat seine katalytische Seite ebenfalls an der cytosolischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums, wodurch es sich idealerweise am Ort seiner Substratproduktion befindet.

Der nun folgende, abschließende Schritt der de novo Ceramid-Synthese, der in zwei Etappen erfolgt, benötigt zwei Enzyme, die (Dihydro-)Ceramid-Synthase und die Dihydroceramid-Desaturase, mit deren Hilfe über eine Acetylierung und anschließende Dehydrierungs-Reaktion, Ceramid entsteht. Die immense Bedeutung dieser abschließenden Reaktionen für das zelluläre Schicksal wird dadurch ausgedrückt, dass der erste Reaktionsschritt in Säugetierzellen durch sechs verschiedene Ceramidsynthasen (CerS1-6), die von sechs unterschiedlichen Genen kodiert werden, erfolgt. Jedes dieser Enzyme weist charakteristische, teils überlappende, Substrat-Präferenzen auf, was die Produktion spezifischer Ceramidarten zur Folge hat. Diese Ceramidsubtypen, die sich durch die Länge ihrer Kohlenstoffketten unterscheiden, üben unterschiedliche Einflüsse auf das Zellverhalten aus und übernehmen aufgrund ihrer unterschiedlichen biophysikalischen Eigenschaften spezifische Aufgaben in den unterschiedlichsten Geweben, beispielsweise die Aufrechterhaltung der hydrophoben Barriere in der Epidermis oder die Myelinisierung von Nervenzellen. Die katalytischen Seiten der Ceramidsynthasen, die alle im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind, zeigen ins Cytosol, was es ihnen, das Vorhandensein von Fettsäuren-Acyl-CoAs vorausgesetzt, ermöglicht, neu entstandenes Dihydrosphingosin direkt an den C₂-Amino-Gruppen zu acetylieren.

Im zweiten Schritt wird, katalysiert von der Dihydroceramid-Desaturase, unter Verwendung von Sauerstoff, zuerst eine Hydroxylgruppe in die C₄-Position des Dihydrosphingosin-Gerüsts eingeführt und anschließend NADPH-anhängig dehydriert. Das so entstandene Dihydroceramid mit Doppelbindung an der C₄-C₅-Position wird als Ceramid bezeichnet. Das daran beteiligte Enzym wird vom DES-1-Gen kodiert, besitzt

einige Transmembran-Domänen und ist, wie die zuvor genannten, ebenfalls im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert.

Bei diesem durch de novo Synthese entstandenen Ceramid handelt es sich um das zentrale Molekül des Sphingolipid-Metabolismus, das nun entweder als Baustein komplexerer Sphingolipide, wie den Galactosyl- oder Glucosylceramiden beziehungsweise dem Sphingomyelin, dienen, zu Ceramid-1-Phosphat phosphoryliert oder zu Sphingosin abgebaut werden kann. Welcher dieser Wege überwiegt ist zellbedarfsabhängig und wird über die Lokalisation des Ceramids, die Substratbereitstellung und die Aktivität der an den Reaktionen beteiligten Enzyme reguliert. Da Ceramid, das nach der Produktion an die Membran des Endoplasmatischen Retikulums gebunden vorliegt, ein hydrophobes Molekül ist, kann es nicht frei durch Membranen diffundieren und ist dadurch für die Durchführung der weiteren Prozessierungen, die vorwiegend im Golgi-Apparat, in geringerem Ausmaß aber auch im Cytosol und in anderen Zellkompartimenten ablaufen, auf Transporter angewiesen. Dieser für die weiteren Reaktionen des Sphingolipid-Metabolismus notwendige Ceramid-Transport zum Golgi-Apparat kann entweder vesikulär oder mittels Protein-Ceramid-Transfer-Protein (CERT) erfolgen. Von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass die beiden Transportmechanismen jeweils für verschiedene Ceramidarten mit genau definierten Acyl-Ketten-Längen am effizientesten ablaufen. So erfolgt der Ceramid-Transport mittels Protein-Ceramid-Transfer-Protein am effizientesten für Ceramid mit einer Acyl-Ketten-Länge von weniger als C_{22} , C_{22} - und C_{24} -Ceramid wird weniger effizient, C_{26} -Ceramid gar nicht transportiert. Man vermutet, dass durch diese Transportpräferenzen, die quantitativ durch eine geänderte Ceramid-Synthese-Expression beeinflusst werden können, die Relation der Sphingomyelin- zur Glycosphingolipid-Synthese verändert werden kann. Werden beispielsweise anstelle der langkettenspezifischen, eher kurzkettenspezifische Ceramid-Synthasen exprimiert, so wird das bei dieser Reaktion entstandene Ceramid überwiegend Acyl-Ketten-Längen von weniger als C_{22} aufweisen. Diese Ceramidart wird dann bevorzugt vom Protein-Ceramid-Transfer-Protein in den Golgi-Apparat transportiert werden. Ceramid, das per Protein-Transfer-Protein transportiert wird, wird überwiegend für den Sphingomyelin-Aufbau verwendet. Mittels vesikulären Transports verschifftes Ceramid hingegen gelangt überwiegend zum Cis-Golgi-Apparat, wo es hauptsächlich als Substrat für die Glycosphingolipid-Synthese dient.

Das zum Golgi-Apparat transportierte Ceramid wird hier überwiegend für die Synthese komplexer Sphingolipide, zu denen Galactosylceramid, Glucosylceramid und Sphingomyelin zählen, verwendet. Die Unterteilung der Sphingolipide in die drei Subtypen berücksichtigt neben dem Rest am C₁-Atom weiters den Ort ihrer Entstehung und die daran beteiligten Enzyme. Im Gegensatz zu den beiden erstgenannten, scheint Sphingomyelin, das den größten Anteil der komplexen Sphingolipide in Säugetierzellen einnimmt, essentiell für die Lebensfähigkeit eukaryotischer Zellen sein. Aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften neigen die komplexen Sphingolipide dazu, bei einem Ungleichgewicht zwischen Produktion und Abbau, innerhalb der Zellen zu akkumulieren. Mutationen in diesen katabol wirkenden Enzymen führen zu Lipidspeicherkrankheiten.

Galactosphingolipide entstehen aus UDP-Galactose und Ceramid mit Hilfe der Ceramid-Galaktosyl-Transferase, einem im endoplasmatischen Retikulum lokalisierten Transmembran-Protein, dessen katalytische Seite in das Lumen des Organells zeigt. Die Ceramid-Galaktosyltransferase weist hohe Expressionsraten in Schwann'schen Zellen, Oligodendrozyten, der Niere, den Testes und dem Intestinaltrakt auf, das Produkt der katalysierten Reaktion, Galactosylceramid und die daraus entstehende Verbindung Sulfatid, scheinen für die einwandfreie Funktionsausübung der Oligodendrozyten entscheidend zu sein. Die beiden Metaboliten sollen im zentralen Nervensystem an der Myelinisierung beteiligt sein.

Glucosylceramid, ein weiteres komplexes Sphingolipid, dessen Entstehung aus UDP-Glukose und Ceramid durch die Glucosylceramid-Synthase katalysiert wird, dient als Vorläufer für den Großteil aller, in Säugetierzellen produzierter Sphingolipide, und gilt als essentiell in der Säugetierentwicklung. So soll es in der Zell-Zell-Erkennung während der Embryonal- und Postnatal-Entwicklung eine entscheidende Rolle spielen. Da die katalytische Seite der Glucosylceramid-Synthase, die sich als Transmembran-Protein im Cis-Golgi-Apparat befindet, ins Cytosol zeigt, kann das neu produzierte Glucosylceramid sofort vom Lipidtransportprotein FAPP2 erkannt und aufgenommen werden.

Durch die Übertragung eines Phosphocholin-Restes von Phosphatidylcholin zu Ceramid entsteht Sphingomyelin. Diese Reaktion erfolgt mit Hilfe der Ceramid-Synthase-Familie, zu der drei Enzyme gehören. Diese bestehen aus je sechs Transmembran-Domänen, sind im Trans-Golgi-Apparat und zum Teil auch in der Plasmamembran lokalisiert und ihre katalytischen Seiten zeigen in das Lumen des Golgi-Apparates beziehungsweise in den

Extrazellularraum. Bei der Sphingomyelin-Synthese fällt als Nebenprodukt Diacylglycerol an, welches als bioaktiver Metabolit vermutlich über eine Interaktion mit der Protein-Kinase C, Einfluss auf die Zellproliferation nimmt.

Der koordinierte Abbau von Sphingomyelin, der essentiell für die Aufrechterhaltung der Membran-Homöostase ist, erfolgt durch die Hydrolyse von Phosphocholin, wodurch Ceramid und freies Phosphocholin entstehen. Katalysiert wird die Reaktion durch Sphingomyelinasen, die unterschiedliche pH-Aktivitäts-Optima aufweisen. Die saure und die neutrale Sphingomyelinase, die im Unterschied zur hauptsächlich in der Leber und dem Intestinaltrakt exprimierten alkalischen Sphingomyelinase, ubiquitär vorkommen, gelten als Hauptregulatoren des Sphingomyelin-Katabolismus und werden durch die Gene SPMPD1, SMPD2, SMPD3 und SMPD4 kodiert. Die saure Sphingomyelinase kann neben ihrer lysosomalen Lokalisation auch in den Extrazellularraum sezerniert werden, wo sie sowohl im Plasma in Lipoproteinen transportiertes, als auch sich an der Plasmamembranaußenseite befindliches Sphingomyelin katabolisieren kann. So scheint die sekretorische Form, die Zink als Coenzym benötigt, den Plasma-Sphingomyelin-Gehalt reduzieren zu können und durch den Abbau von membrangebundenem Sphingomyelin zu Ceramid, möglicherweise stress-assoziiert, indirekt auch die Zellregulation zu beeinflussen. Der bedeutendste Vertreter der neutralen Sphingomyelinasen, für die drei Gene kodieren, scheint die neutrale Sphingomyelinase2 zu sein, die ihre katalytische Seite unüblicherweise ins Cytosol gerichtet hat und eine Präferenz für sehr langkettiges Sphingomyelin, das sie bevorzugt zu C₂₄- und C_{24:1}-Ceramid abbaut, besitzt.

Neben der soeben beschriebenen Verwendung von Ceramid für den Aufbau komplexer Sphingolipide kann es im Trans-Golgi-Apparat mittels Ceramid-Kinase auch zu Ceramid-1-Phosphat phosphoryliert werden, welches als bioaktives Molekül dazu in der Lage ist, die Phospholipase A2 zu aktivieren und damit eine gesteigerte Arachidonsäureproduktion hervorzurufen. Die Ceramid-Kinase, die in Anwesenheit von Calcium und Magnesium aktiviert wird, scheint eine Calmodulin-ähnliche Domäne zu besitzen und weist eine Präferenz für Ceramid ab einer Acyl-Ketten-Länge von 12 Kohlenstoffatomen auf. Diese Vorliebe wird auf die quantitativ gesteigerte Anlieferung kurzkettiger Ceramide durch das Protein-Ceramid-Transfer-Protein (CERT) zurückgeführt. Wie der Abbau von Ceramid-1-Phosphat erfolgt, konnte bis jetzt noch nicht geklärt werden, vermutet werden nicht-

spezifische Lipid-Phosphatasen der LPP-Familie oder in der Plasmamembran lokalisierte C1P-Phosphatasen.

Der gemeinsame finale Abbauweg aller Sphingolipide endet beim Sphingosin beziehungsweise Sphingosin-1-Phosphat. Dabei wird Ceramid durch Ceramidasen, die Zellorganell-spezifisch exprimiert werden, durch Deacetylierung zu Sphingosin abgebaut. Dieses wiederum kann durch die Aktivität zweier Sphingosinkinasen zu Sphingosin-1-Phosphat konvertiert werden. Im letzten katabolen Schritt des Sphingolipidmetabolismus wird das Sphingosin-1-Phosphat schließlich irreversibel mit Hilfe der Sphingosin-1-Phosphat-Lyase zu Hexadecenal und Phosphethanolamin abgebaut. Die Ceramidasen werden, so wie die zuvor beschriebenen Sphingomyelinasen, ebenfalls anhand ihrer pH-Aktivitäts-Optima und der damit einhergehenden Lokalisationsspezifität eingeteilt. Saure Ceramidasen, die naheliegenderweise lysosomal lokalisiert sind, deacetylieren bevorzugt mittel- bis langkettige, das heißt C₁₂- und C₁₄-Ceramide, die aus dem Abbau von Plasmamembran-Sphingolipiden stammen. Die neutrale Ceramidase, die an der Plasmamembranaußenseite lokalisiert ist, weist eine hohe Expressionsrate im Epithel des Intestinaltrakts auf und scheint bei der Verdauung von über die Nahrung aufgenommenen Sphingolipiden eine wichtige Rolle zu spielen. Die drei alkalischen Phosphatasen, die Calcium als Coenzym benötigen, unterscheiden sich aufgrund ihrer subzellulären Lokalisationen und Substratspezifitäten. Die alkalische Ceramidase 1 befindet sich im Endoplasmatischen Retikulum und bevorzugt C₂₄- und C_{24:1}-Ceramid. Die alkalische Phosphatase 2, die interessanterweise vor allem in der Plazenta exprimiert wird, metabolisiert aufgrund ihrer geringen Substratspezifität neben C₁₆-, C₁₈-, C₂₀-, C₂₄- und C_{24:1}-Ceramid auch langkettige Dihydro- und Phytoceramidide. Die alkalische Ceramidase 3, die sich sowohl im Endoplasmatischen Retikulum als auch im Golgi-Apparat befindet, verstoffwechselt Ceramide, die eine ungesättigte Fettsäure enthalten und deren Ketten aus weniger als 20 Kohlenstoffatomen bestehen, natürliche Phytoceramide und Dihydroceramide.

Nach dieser durch die Ceramidasen erfolgten Deacetylierung des Ceramids zum Sphingosin kann dieses nun durch die Aktivität der beiden Sphingosinkinasen 1 und 2, die zur DAG-Kinase-Familie gehören, unter Verwendung von ATP an seiner C₁-Hydroxy-Gruppe phosphoryliert werden. Beide Isoformen des Enzyms besitzen unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen und weisen Substratspezifitäten auf. Während die

Sphingosinkinase 1 proliferationsfördernd wirkt, wirkt eine erhöhte Expression der Sphingosinkinase 2 apoptoseinduzierend. Die Sphingosinkinase 1 ist ein prinzipiell im Cytosol lokalisiertes Enzym. Eine von ERK2 katalysierte Phosphorylierung, die eine Translokation der Sphingosinkinase 1 zur Plasmamembran bewirkt, führt zu einer erhöhten Aktivität des Enzyms, welches aufgrund der damit einhergehenden erhöhten Sphingosin-1-Phosphat-Produktion die Zellproliferation fördert. Zusätzlich kann die Sphingosinkinase 1 auch von Zellen sezerniert werden oder in den Zellkern wandern, wo sich zwei Nuclear Export Sequenzen befinden, die dafür sorgen sollen, dass das Enzym den Zellkern verlassen kann, die aber interessanterweise, wenn die Sphingosinkinase 1 an diese Sequenzen bindet, über einen bis jetzt unerforschten Mechanismus die Zellproliferation hemmen.

Die Sphingosinkinase 2 befindet sich vor allem im Zellkern beziehungsweise der perinukleären Region, weist eine geringere Substratspezifität als die Sphingosinkinase 1 auf, und scheint neben ihrer primären Funktion durch Bindung an und damit Aktivierung der Sphingosin-Phosphat-Phosphatase 1 die Ceramidproduktion zu erhöhen.

Das so entstandene Sphingosin-1-Phosphat kann nun entweder relativ unspezifisch mit Hilfe der Lipid-Phosphat-Phosphatasen oder spezifischer mittels S1P-Phosphatasen dephosphoryliert werden. Der Abbau durch die Lipid-Phosphat-Phosphatasen 1-3, die aus je sechs Transmembran-Domänen bestehen und deren katalytische Seiten in den Extrazellularraum zeigen, scheinen hauptverantwortlich für die extrazelluläre Sphingosin-1-Phosphat-Verminderung zu sein. Neben dieser Hauptfunktion scheinen die Lipid-Phosphat-Phosphatasen zusätzlich über eine Steuerung des Phosphatsäurelevels die Aktivität der Sphingosinkinase 1 und damit die Phosphorylierung von Sphingosin regulieren zu können. Die im Endoplasmatischen Retikulum lokalisierten S1P-spezifischen Phosphatasen SPP1 und SPP2, die eine Ähnlichkeit zu den Lipid-Phosphat-Phosphatasen aufweisen, aus je acht Transmembran-Domänen bestehen und ubiquitär exprimiert werden, scheinen neben der Dephosphorylierung von Sphingosin-1-Phosphat, auch die Wiederverwertung der entstehenden Abbauprodukte für die Ceramidproduktion im Endoplasmatischen Retikulum, das heißt den Salvage-Pathway, zu beeinflussen

Den letzten, irreversiblen Schritt im Sphingolipid-Abbau stellt die Konversion von Sphingosin-1-Phosphat zu Phosphoethanolamin und Hexadecenal, katalysiert durch die S1P-Lyase dar. Da sich dieses Enzym, das die höchste Expression im Thymus- und im Intestinaltrakt aufweist, nur im Endoplasmatischen Retikulum, genauer gesagt an der

zytosolischen Oberfläche des Zellorganells, befindet, müssen die Sphingolipide für den endgültigen Abbau in dieses Kompartiment transportiert werden. Aufgrund ihrer geringen Substratspezifität ist die S1P-Lyase dazu in der Lage, neben Sphingosin-1-Phosphat auch Dihydrosphingosin-1-Phosphat und Phytosphingosin-1-Phosphat zu degradieren. Damit kann sie alle in Säugetierzellen anfallenden Sphingosine abbauen.³

1.2 Sphingosin-1-Phosphat und andere bioaktive Sphingolipide

Nach der zuerst erfolgten allgemeinen Betrachtung des Sphingolipidmetabolismus nun die erläutert werden, über welche Mechanismen bioaktive Sphingolipide die Zellregulation und das Zellverhalten beeinflussen können.

Zu den bioaktiven Metaboliten zählen Ceramid, Sphingosin und ihre phosphorylierten Formen Ceramid-1-Phosphat und Sphingosin-1-Phosphat.⁷ Diese Moleküle beeinflussen über Regulierung von Signalwegen unter anderem die Migration, Differenzierung, Proliferation, inflammatorische Reaktionen, die Angiogenese, die Calciumhomöostase und immunologische Reaktionen.⁵ Im Allgemeinen wirken Ceramid und Sphingosin proapoptotisch, Ceramid-1-Phosphat und Sphingosin-1-Phosphat hingegen pro-proliferativ. Die tatsächlichen Funktionen der bioaktiven Metaboliten werden aber durch die intrazelluläre Lokalisation, die vorherrschenden zellulären Transportmechanismen und die Rezeptor-, beziehungsweise Ligandenexpression beeinflusst und sind somit zell-beziehungsweise milieuspezifisch.⁵

Das Ceramid-Sphingosin-Rheostat-Grundmodell, welches das relative Verhältnis der bioaktiven Metaboliten zueinander beschreibt, wird herangezogen um die Einflüsse der Sphingolipide auf den Zellmetabolismus zu beschreiben.^{5, 8}

1.2.1 Ceramid

Ceramid besitzt eine Reihe, intrazellulärer Angriffspunkte und übt vor allem über die Regulierung von Proteinkinasen, Einfluss auf verschiedene Signalkaskaden aus. Proteinkinasen sind Enzyme, die den Transfer einer meist von Adenosintri-phosphat (ATP) stammenden Phosphatgruppe zur Hydroxylgruppe einer Aminosäure katalysieren und

durch strukturelle Veränderungen an ihren Substraten deren Aktivität beeinflussen. Die Substrate der Proteinkinasen sind meist Schlüssel-moleküle, also Enzyme oder Transkriptionsfaktoren, von bedeutenden Signaltransduktionswegen.

Beispielsweise reguliert Ceramid den Ras-Raf-MAPK-Signalweg über direkte oder indirekte Beeinflussung von c-Raf. Ceramid kann sowohl direkt an c-Raf binden als dieses Signalmolekül auch durch Autophosphorylierung und damit Aktivierung des Kinasesuppressors von Ras transaktivieren. Dies führt in weiterer Folge über die Phosphorylierung von Bad zur Induktion der Apoptose.

PKC- δ , eine weitere Proteinkinase, die die Proliferation entscheidend beeinflusst, wird durch die Bindung von Ceramid an eine Cystein-reiche spezifische Region aktiviert und interagiert daraufhin mit Stress-Aktivierten-Protein-Kinasen, die pro-apoptotisch wirken. Ceramid aktiviert durch autokatalytische Proteolyse Cathepsin D, eine endosomal lokalisierte Protease, die eine Rolle in der INF- γ -, Fas-, TNF- α - und Chemotherapie-induzierten Apoptose spielt. Interessanterweise begünstigt ihr Vorläufer Procathepsin D nach Sekretion durch den Abbau der extrazellulären Matrix und Basalmembran die Metastasierung von Malignomen.

Eine verminderte Expression des Protein-Ceramid-Transfer-Proteins (CERT), das, wie bereits erwähnt, den Ceramid-Transport vom Endoplasmatischen Retikulum zum Trans-Golgi-Apparat übernimmt, führt vermutlich über eine Akkumulation von Ceramid im Endoplasmatischen Retikulum zu einer ER-Stress-Reaktion, die zu Apoptose-induziertem Zelltod führt.

Die Ceramid-aktivierten Proteinphosphatasen der PP2A- und PP1-Familie gelten als Tumor-Suppressoren. Ceramid ist in der Lage, über eine Erhöhung der PP2A-Aktivität die Stabilität des Protoonkogens c-Myc zu regulieren. Dabei binden vor allem C₁₆- und C₁₈-Ceramide an den nukleären Inhibitor I2PP2A von PP2A, wodurch die aktive Form von PP2A frei wird, die nun dazu in der Lage ist, c-Myc über Dephosphorylierung zu inaktivieren und in weiterer Folge auch abzubauen. I2PP2A, das zu den Methyltransferasen gehört, reguliert neben der Histonacetylierung auch die Gen-Transkription. In malignen Zellen wurden erhöhte I2PP2A-Level festgestellt, die dazu führen, dass mehr PP2A gebunden werden kann und dadurch mehr aktives c-Myc vorliegt,

das in weiterer Folge als Transkriptionsfaktor über eine vermehrte Expression verschiedener Onkogene zu gesteigertem Tumorwachstum führt.

Ceramid ist über zwei nukleär gelegene Angriffspunkte darüber hinaus auch in der Lage, die Telomerlänge, die entscheidend für die Zellteilungsfähigkeit von Zellen ist, zu regulieren. Einerseits führt Ceramid über eine Regulierung von SP3-HDAC1 zu einer Funktionsverminderung der Telomerase-Reverse-Transkriptase, andererseits verhindert es die nukleäre Lokalisation und damit Aktivierung der Glyceraldehyde-3-Phosphat-Dehydrogenase, die Telomere schützt.²

Trotz dieser pro-apoptotischen Effekte, die Ceramid über die Regulation von Proteinkinasen oder Transkriptionsfaktoren ausübt, weisen neue Forschungsergebnisse auf pro-proliferative Wirkungen einzelner Ceramidsubtypen in Malignomen hin.² Diese gegenteiligen Effekte der einzelnen Ceramidsubtypen konnten vor allem bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich (HNSCC) festgestellt werden.² Und es konnte tatsächlich nachgewiesen werden, dass das Tumorwachstum durch C₁₈-Ceramid, das durch die Ceramidsynthase 1 produziert wird, inhibiert, durch C₁₆-Ceramid, das durch die Ceramidsynthase 6 produziert wird, hingegen induziert wird.² Wie die Expression der Ceramidsynthasen, die entscheidend für die Relation der einzelnen Ceramidsubtypen zueinander ist, reguliert wird, ist noch Gegenstand der Forschung.⁹ Die Ceramidsynthase 1 und ihr Produkt C₁₈-Ceramid führen zu einer Induktion entweder der Autophagie oder direkt der Apoptose. Diese Wirkungen können durch Chemotherapeutika, die zu einer Erhöhung intrazellulärer Ceramidlevel führen, verstärkt werden. Hingegen regulieren die Ceramidsynthase 6 und C₁₆-Ceramid die Stressreaktionen des Endoplasmatischen Retikulums und bewirken über die Inaktivierung der Transkriptionsfaktoren ATF6 beziehungsweise CHOP, eine gesteigerte Zellproliferation und damit ein verstärktes Tumorwachstum. Somit scheint es, dass bestimmte Malignome auf erhöhte Ceramidlevel, die ja eigentlich als apoptosefördernd gelten, angewiesen sind.²

1.2.2 Ceramid-1-Phosphat

Im Gegensatz zu Ceramid wirkt Ceramid-1-Phosphat pro-proliferativ.

Intrazellulär vorliegendes Ceramid-1-Phosphat führt über eine direkte Bindung an die cytosolische Phospholipase A2 zu deren Aktivierung. Dieser Vorgang bewirkt eine erhöhte Arachidonsäurefreisetzung, erhöhte Prostaglandinbildung und initiiert damit eine

Entzündungsreaktion.² ⁵Weiters führt es über Inaktivierung der A-SMase zu einer Hemmung der Apoptose und reguliert die Signalmoleküle JNK, ERK und PKB, NF-κB, mit migrationsfördernden und pro-proliferativen Effekten.¹⁰

1.2.3 Weitere bioaktive Sphingolipide

Ceramid-Phosphoethanolamin, das mit Hilfe eines Sphingomyelin-Synthase verwandten Enzyms im Endoplasmatischen Retikulum hergestellt wird, soll in Säugetierzellen wichtig für die Aufrechterhaltung der normalen Zellfunktionen sein und stellt das Hauptphosphosphingolipid bei Insekten dar.⁵

1-Deoxysphingoide, zu denen 1-Deoxy-Dihydrosphingosin und 1-Deoxy-Dihydroceramid gehören, akkumulieren bei einem relativen Mangel an 1-Hydroxyl-Gruppen und können dann aufgrund ihrer Cytotoxizität zur Hereditären Sensorischen und Autonomen Neuropathie Typ1 (HSAN1) führen.⁵

Sphingadiene, also Verbindungen, die sich durch die Nummer und Position ihrer Doppelpbindungen, die Anzahl der Hydroxylgruppen und ihren Kettenverzweigungen von den Sphingosinen unterscheiden, initiieren über eine Inhibierung von Akt die Autophagie und wirken pro-apoptotisch.⁵

Sphingosin reguliert über die Bindung an das Protein ANP32A die PP2A-Aktivität und die COX-2-Expression.²

1.2.4 Regulation des Sphingosin-1-Phosphats

Sphingosin-1-Phosphat entsteht, wie schon beschrieben, katalysiert durch zwei Sphingosinkinasen aus Ceramid und wird durch S1P-Phosphatasen dephosphoryliert oder die S1P-Lyase irreversibel abgebaut. Da im erweiterten Sphingolipid-Rheostat-Modell auch die Enzyme, die den Auf- und Abbau der bioaktiven Metaboliten katalysieren, berücksichtigt werden, sollen in der nun folgenden genaueren Betrachtung der bioaktiven Wirkungen von Sphingosin-1-Phosphats die Regulationsmöglichkeiten seiner Metabolisierung vorangestellt werden.

Interessanterweise fördert die Sphingosinkinase 1 selbst das Zellwachstum, während die Sphingosinkinase 2 das Zellwachstum inhibiert.

1.2.4.1 Sphingosinkinase 1

Die Sphingosinkinase 1 kann relativ unspezifisch über Agonisten der G-Protein gekoppelten Rezeptoren, Tyrosin-Kinase-Rezeptoren, proinflammatorische Cytokine, Immunglobulinrezeptoren, schmale GTPasen, Calcium und Protein-Kinase-Aktivatoren aktiviert werden.⁸ Die Translokation der Sphingosinkinase 1 wird durch Phosphorylierung des Enzyms an Ser225 durch ERK1 und ERK2 erleichtert.⁸ Dieser Vorgang alleine reicht aber für die Auslösung einer Translokation zur Plasmamembran nicht aus.¹¹ Eine weitere Aktivitätssteigerung des Enzyms erfolgt durch einen vom Calcium-und-Integrin-Binding1-Protein (CIB1) initiierten „Calcium-Myristoyl-Switch“. ^{5, 8, 11} Die dadurch bedingte Konformationsänderung bewirkt eine erhöhte Membranaffinität und Plasmamembranselektivität des Enzyms.⁸ Die so bedingte Aktivitätssteigerung ist für die Zelltransformation entscheidend.¹¹ Obwohl der eben beschriebene Mechanismus der Aktivierung der Sphingosinkinase 1, der am besten erforschte ist, kann deren Aktivitätszustand und Lokalisation auch durch eine Reihe weiterer Faktoren beeinflusst werden.

Der TNF-Rezeptor-assoziierte-Faktor 2 (TRAF2) spielt eine Rolle in der ERK2-katalysierten Phosphorylierung und damit Aktivierung der Sphingosinkinase 1.

Die Phosphatidsäure, die mit Hilfe der Phospholipase D entsteht, aktiviert die Sphingosinkinase 1 und induziert ihren Transport zum Golgi-Apparat, wo sie das Zellüberleben zu regulieren scheint. Eine Hochregulation des Adhäsions- und Signalmoleküls PECAM1 wirkt über eine verstärkte Expression der Sphingosinkinase 1 mit daraus resultierendem PI3K-Akt-mediertem Überleben in Endothelzellen zytoprotektiv. Weiters scheint die Aminoacylase 1 über eine Interaktion mit der Sphingosinkinase 1 als Tumorsuppressor zu agieren. Der Protein-Elongations-Faktor 1A (eEF1A), der als Onkogen gilt, aktiviert beide Sphingosinkinasen.⁸

1.2.4.2 Sphingosinkinase 2

Die Sphingosinkinase 2 benötigt für ihre Aktivierung spezifischere Agonisten, wie EGF, IgE-Rezeptor-Crosslinking, IL-1 β und TNF- α .¹¹ Das Enzym kann, bedingt durch seine BH3-Domäne, neben seiner primären Funktion als Katalysator, auch Sphingosin-1-Phosphat unabhängig das Zellverhalten, beeinflussen.^{5, 11} Über eine direkte Interaktion mit Bcl-xL, die das Außerkräftsetzen seiner anti-apoptisch wirkenden Funktionen zur Folge

hat, löst die Sphingosinkinase 2 eine Cytochrom C-Freisetzung mit nachfolgender Aktivierung der Caspase 3 aus, die in einer Induktion der Apoptose mündet.^{5, 8}

Eine Überexpression der Sphingosinkinase 2 hat den Übergang von der G1- in die S-Phase zur Folge, das bedeutet, die betroffene Zelle wird über die Hemmung der DNA-Synthese in den Zellzyklusarrest geführt.¹¹

Die Sphingosinkinase 2 kann weiters mit H3-Histonen und Histondeacetylasen Repressor-Komplexe formen, die sich in Promoter-Regionen von Genen, die beispielsweise für p21 oder bestimmte Transkriptionsfaktoren kodieren, anreichern. Sphingosin-1-Phosphat fördert, nach Sphingosinkinase 2-katalysierter Produktion, die Histonacetylierung und inhibiert die Histondeacetylasen 1 und 2 wodurch die Repression der Genexpression aufgehoben wird. Eine Phosphorylierung der Sphingosinkinase 2 bewirkt ihren Export vom Nucleus zum Cytoplasma. Es konnte gezeigt werden, dass das Enzym auch in den Reifungsprozess von unreifen Phagosomen zu reifen Phagolysosomen eingreift.⁸ Interessanterweise inhibiert ein Knockdown der Sphingosinkinase 2 die Proliferation in Glioblastomzellen effektiver als ein Knockdown der Sphingosinkinase 1.⁸

Zusätzlich üben die beiden Sphingosinkinasen ihre unterschiedlichen Funktionen über die Regulation des Ceramidlevels aus. So vermindert die Sphingosinkinase 1 den zellulären Ceramidgehalt durch Inhibierung von Ceramidsynthasen, während die Sphingosinkinase 2 über eine verstärkte Sphingosin-Gewinnung aus dem Salvage-Pathway den Ceramidgehalt erhöht.¹¹

Weiters konnten die beiden Sphingosinkinasen in Centrosomen nachgewiesen werden. Man vermutet, dass sie dort möglicherweise die Spindelformation und damit die Mitose beeinflussen.¹²

1.2.4.3 Sphingosin-1-Phosphat-Phosphatasen, Lipid-Phosphatasen

Die Sphingosin-1-Phosphat-Phosphatasen (SPP1, SPP2) sollen den Ceramidlevel im Endoplasmatischen Retikulum beeinflussen können und dadurch den Transport von Ceramid und Proteinen vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat verändern. Die Sphingosin-1-Phosphat-Phosphatase 1 scheint auch den Import von extrazellulär vorliegendem Sphingosin-1-Phosphat via ATP-Bindungskassetten-Transporter bewerkstelligen zu können.¹³ Sphingosin-1-Phosphat kann neben diesen beiden

spezifischen Enzymen auch von den unspezifischer wirkenden Lipid-Phosphatasen (LPPs) abgebaut werden, die einen Einfluss bei der extrazellulären Sphingosin-1-Phosphat-Kommunikation und dem Sphingosin-1-Phosphat-Import auszuüben scheinen.¹⁴

1.2.4.4 Sphingosin-1-Phosphat-Lyase

Die Sphingosin-1-Phosphat-Lyase, die durch zelluläre Stressoren, wie Ischämie, Bestrahlung oder chemische Schädigung aktiviert wird, wirkt über Aktivierung von p53 und p38 anti-proliferativ und führt bei verstärkter Expression zu erhöhtem Chemotherapie-Ansprechen der malignen Zellen.^{7, 15} Weiters scheint sie im PDGF-vermittelten Signalweg verwickelt zu sein und eine Rolle bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen, bei der Gefäßentwicklung und bei der Wundheilung zu spielen.^{7, 15}

1.2.5 Sphingosin-1-Phosphat

1.2.5.1 Intra- und extrazelluläre Wirkungen von Sphingosin-1-Phosphat

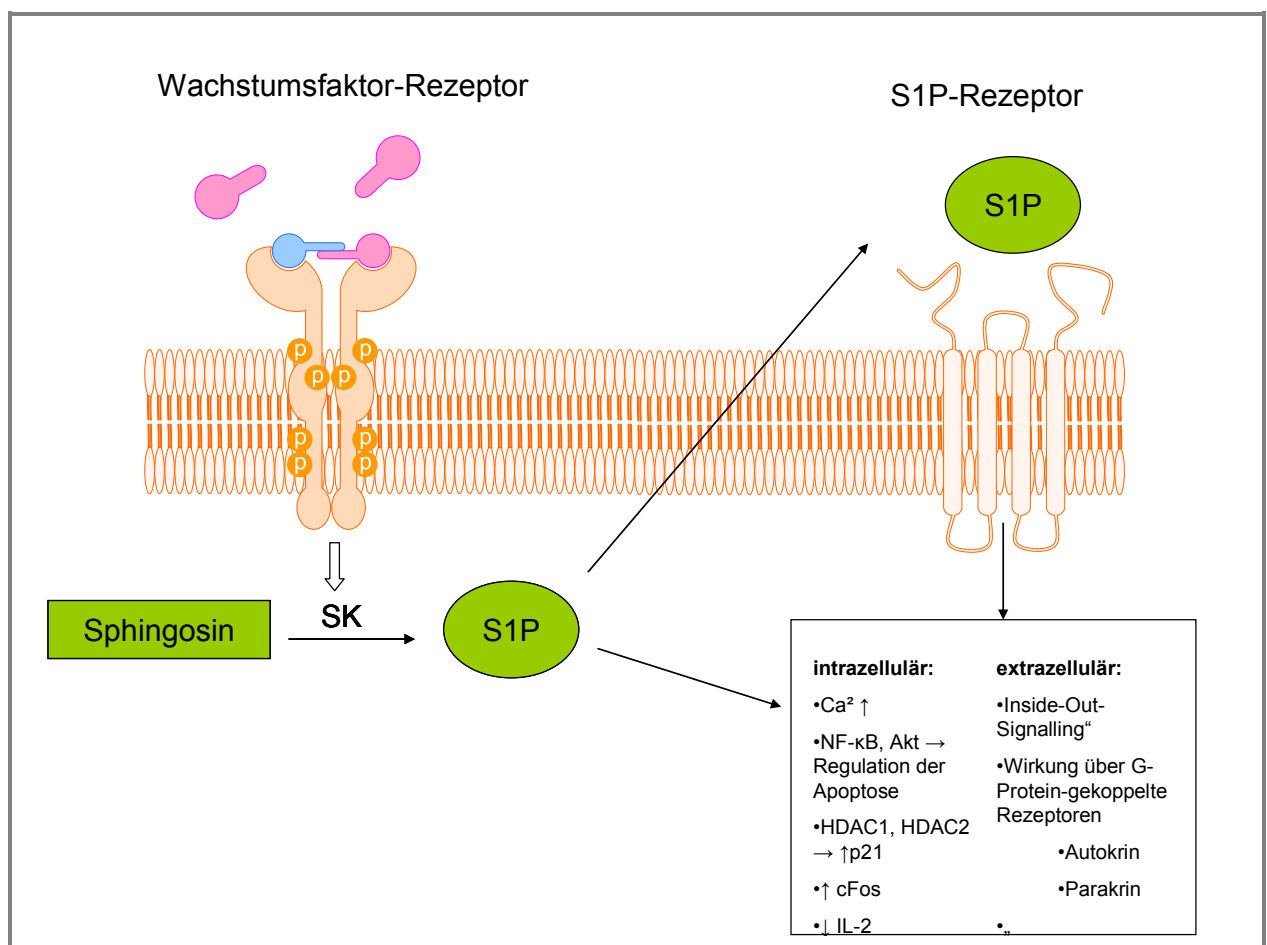


Abb. 3 Schematische Darstellung der intra- und extrazellulären Angriffspunkte von Sphingosin-1-Phosphat

Wie in Abb. 3 erkennbar entfaltet Sphingosin-1-Phosphat seine Wirkungen sowohl intra- als auch extrazellulär. Intrazellulär wirkt Sphingosin-1-Phosphat als Second-Messenger, extrazellulär kann es an fünf spezifische G-Protein-gekoppelte Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren (S1PR1-5) binden und so das Zellverhalten beeinflussen.^{5, 11}

Das Wissen über die intrazellulären Wirkungen von Sphingosin-1-Phosphat ist im Gegensatz zu den gut erforschten extrazellulären Funktionen von Sphingosin-1-Phosphat sehr begrenzt. Sphingosin-1-Phosphat kann durch Aktivierung Thapsigargin-sensitiver-Calcium-Kanäle den intrazellulären Calciumlevel erhöhen.¹¹ Weiters kann der bioaktive Metabolit direkt in den NF- κ B- und Akt-Signalweg eingreifen und so die Induktion der Apoptose regulieren.¹¹

Sphingosin-1-Phosphat scheint auch, über Suppression von IL-2, inflammatorische Reaktionen abzumildern.¹¹

Zusätzlich ist Sphingosin-1-Phosphat auch in der Lage, die Genexpression direkt zu beeinflussen. Beispielsweise verhindert es zusammen mit der Sphingosinkinase 2, nach Bildung eines Komplexes mit den Histon-Deacetylasen 1 und 2 (HDAC1, HDAC2) im Nucleus, die Deacetylierung von Lysinresten innerhalb der Histonenden, beeinflusst dadurch die Histon-DNA-Bindung und bewirkt so eine Hochregulation von p21 und c-Fos.^{2, 5}

Extrazellulär kann Sphingosin-1-Phosphat über seine spezifischen Rezeptoren, parakrin, also durch aus der Umgebung stammendes S1P, autokrin, also durch von der Zelle selbst sezerniertes S1P, oder durch „Inside-Out“-Signalling, wirken.¹¹ Unter „Inside-Out-Signalling“ versteht man die autokrine oder parakrine Aktivierung einer Zelle durch intrazellulär produziertes Sphingosin-1-Phosphat über seine spezifischen Rezeptoren.¹⁶ Teilweise kann dieser Vorgang unter Mitaktivierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren erfolgen, was dann als Transaktivierung bezeichnet wird.⁸ An MCF-7-Zellen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Östradiol S1PR3-vermittelt über eine Aktivierung des Epidermal-Growth-Factors, mit daraus resultierender Phosphorylierung von ERK1 und ERK2, die Genregulation reguliert. Dabei stimuliert Östrogen die Sphingosinkinase 1, wodurch vermehrt Sphingosin-1-Phosphat produziert wird, welches dann an den S1P-Rezeptor 3 dieser Zellen bindet. Der stimulierte S1P-Rezeptor 3 aktiviert in weiterer Folge die Metalloproteinase MMP-9, die daraufhin den Epidermal Growth Factor (EGF) aus dem

EGF-Heparin-bindenden-Protein freisetzt, ihn damit aktiviert, und so zu einer Phosphorylierung von ERK 1 und 2 führt.¹¹

1.2.5.2 Export von Sphingosin-1-Phosphat

Da Sphingosin-1-Phosphat überwiegend an der Innenseite der Plasmamembran produziert wird und aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaften Zellmembranen nicht einfach so passieren kann, muss seine Ausschleusung nach extrazellulär über spezielle Transporter, die zur ATP-Bindungskassetten-Transporter-Familie (Abb. 4) gehören, erfolgen.¹⁶ Diese katalysieren die Ausschleusung von Lipiden, also beispielsweise neutralen Fetten, Phospholipiden oder Cholesterin, von intra- nach extrazellulär und spielen so, neben der Ermöglichung des „Inside-Out-Signallings“ von Sphingosin-1-Phosphat auch eine wichtige Rolle im Rücktransport von Cholesterin via HDL zur Leber.^{17, 16}

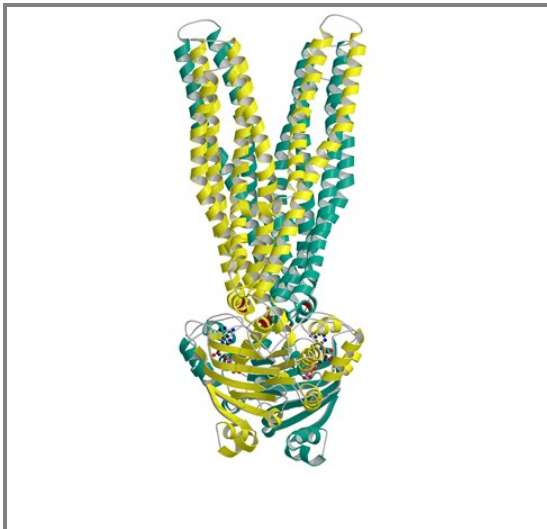


Abb. 4 Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus eines ATP-Bindungskassetten-Transporter basierend auf röntgenkristallographischen Untersuchungen¹⁸

Die Transportproteine bestehen aus zwei, sich aus sechs α -Helices zusammensetzenden, Transmembran-Domänen und besitzen an ihrer ins Cytosol reichenden Seite die zwei namensgebenden ATP-bindenden Kassetten. Kodiert werden die sieben Transporter ABCA bis ABCG von 49 Genen, die entsprechend ihrer Proteinprodukte zu sieben Hauptgruppen zusammengefasst werden.¹⁶

Im zentralen Nervensystem erfolgt die Ausschleusung von Sphingosin-1-Phosphat bei Astrozyten überwiegend durch den Subtyp ABCA1. Interessanterweise ist die Freisetzung

des bioaktiven Sphingolipids dabei an die Lipoprotein-Bildung und den dessen Transport gekoppelt. In verschiedenen Versuchen wurde gezeigt, dass Sphingosin-1-Phosphat in einer frühen Stufe der Lipoproteinbildung in diese Partikel eingefügt und dann in diesen nach extrazellulär transportiert wird. Im zentralen Nervensystem wird Sphingosin-1-Phosphat überwiegend in, von Astrozyten und der Mikroglia produziertem, ApoE, und nur in einem geringen Ausmaß in HDL, ausgeschleust.¹⁷ Auch im Plasma und Liquor liegt Sphingosin-1-Phosphat nach Sekretion überwiegend an Lipoproteine, oder an Albumin gebunden vor, was einerseits zwar seine Bioaktivität mindert, andererseits aber durch die Bindung, den Abbau durch Ektoenzyme, wie Lipid-Phosphat-Phosphohydrolasen, verhindert.¹⁶

Es konnte gezeigt werden, dass die ATP-Bindungskassetten-Transporter, die auch als Multi-Drug-Resistance-Transporter bezeichnet werden, in einer Vielzahl von Malignomen überexprimiert werden, was zu einer verstärkten para- oder autokrinen Stimulation mit Aktivierung pro-proliferativer Prozesse führt.¹⁶

Neue Erkenntnisse legen nahe, dass auch das Transmembranprotein Spns2, das eine Rolle in der Herzentwicklung spielt und vom Zebrafish-Spinster-2-Gen kodiert wird, dazu in der Lage ist, Sphingosin-1-Phosphat auszuschleusen.^{16 19}

1.2.5.3 Wirkungen von Sphingosin-1-Phosphat über spezifische Rezeptoren

Das extrazellulär vorliegende Sphingosin-1-Phosphat kann nun über die spezifischen Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren, je nach Zelltyp, Rezeptorexpressionsmuster und einer Vielzahl von weiteren Faktoren, wie dem G-Protein-Subtyp, unterschiedlich auf die Zellen wirken.^{5 11}

Beispielsweise wird über diese Rezeptoren die Entwicklung des Gefäßsystems und die Regulation der Gefäßweite, die Auswanderung von Lymphozyten aus lymphatischen Geweben und die Cytokin-Produktion, die Innenohrentwicklung, sowie die Integrität des Pulmonalepithels, beeinflusst.

Nervenzellspezifische Funktionen dieser Rezeptoren umfassen beispielsweise die Regulation der Motilität von Astrozyten und Gliomazellen, die Astrozytenproliferation, die Axonaussprossung oder den raschen Rückzug der oligodendrozytären Zellausläufer.⁵

1.2.5.3.1 SIPR1

S1PR1, ein auf fast allen Zelltypen exprimierter Rezeptor, spielt eine wichtige Rolle in der Angiogenese, der Gefäßentwicklung und der Regulation des vaskulären Gefäßtonus und ist zusammen mit S1PR2 und S1PR3 auch für die Aufrechterhaltung der vaskulären Integrität über Kontrolle der endothelialen und epithelialen Barriere verantwortlich.¹¹ Weiters beeinflusst der Rezeptor, der auch von ruhenden T- und B-Lymphozyten exprimiert wird und deren Auswanderung aus Lymphknoten fördert, den relativen Anteil an zirkulierenden Lymphozyten und damit die Funktion des Immunsystems.¹¹

1.2.5.3.2 S1PR2

S1PR2, ein ebenfalls von den meisten Zelltypen exprimierter Rezeptor, scheint über eine Aktivierung von Rho und dessen nachgeschaltetem Effektorprotein ROCK den Effekten von S1PR1 und S1PR3 entgegenzuwirken. Beispielsweise wird durch seine Aktivierung die zelluläre Migration gehemmt und die vaskuläre Permeabilität gesteigert. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor wichtige Aufgaben in der Entwicklungsphase des auditiven und vestibulären Systems übernimmt und notwendig für die Mastzelldegranulation ist.¹¹

1.2.5.3.3 S1PR3

Im Gegensatz zu den beiden zuvor genannten Rezeptoren wird S1PR3 nur an der Oberfläche spezifischer Zelltypen des kardiovaskulären Systems, der Lunge, der Niere, der Milz, des Intestinaltraktes und des Knorpelgewebes exprimiert. Er wirkt ebenfalls über eine Aktivierung von Rho und ROCK auf die vaskuläre Permeabilität, scheint darüber hinaus aber auch die Herzfrequenz regulieren zu können.¹¹

1.2.5.3.4 S1PR4

S1PR4, ein Rezeptor mit spezifischerem Expressionsmuster, greift über die Aktivierung von ERK 1 und 2 und folgender Aktivitätssteigerung der Phospholipase C über die daraus resultierende Öffnung intrazellulärer Calciumspeicher in den Calciumhaushalt ein. Zusätzlich beeinflusst der Rezeptor die strukturelle Organisation des Cytoskeletts.¹¹

1.2.5.3.5 S1PR5

S1PR5, ein größtenteils an der Oberfläche von Oligodendrozyten exprimierter Rezeptor, wirkt über die Inhibierung von ERK 1 und 2 anti-proliferativ. Es konnte beobachtet werden, dass eine Stimulation von S1PR1 zu seiner Expressionsverminderung führt.¹¹

1.2.5.4 Die Rolle des Sphingolipidmetabolismus in Erkrankungen

Nach der nun eher allgemein gehaltenen Beschreibung der bioaktiven Moleküle und ihrer zellulären Funktionen und Wirkungen, soll nun die Rolle der Sphingolipide bei verschiedenen Krankheiten betrachtet werden.

1.2.5.4.1 Immunsystem

Das Ausmaß der zirkulierenden T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, NK-Zellen und hämatopoetischen Stammzellen wird über die Bildung eines systemischen Sphingosin-1-Phosphat-Gradienten reguliert. Das Konzentrationsgefälle wird über erythrotytäre Sphingosinkinasen und über im Thymus lokalisierte Sphingophospholipasen (SPL) aufgebaut. Antigen-stimulierte-Lymphozyten, werden durch Komplexbildung von CD69 mit S1PR1 und dadurch bedingter S1PR1-Inaktivierung an der Auswanderung in die Zirkulation gehindert. Erst nach Reexpression des Rezeptors wandern die Lymphozyten, einem lokalen, endothelial aufgebauten Gradienten folgend, zu den kortikalen Sinus der Lymphknoten. Diese Beeinflussung der Zelllokalisierung durch Sphingosin-1-Phosphat scheint bei verschiedenen autoimmunologischen Erkrankungen wie Multipler Sklerose, Rheumatoider Arthritis oder bei Autoimmunreaktionen nach Organtransplantationen von Bedeutung zu sein.⁵

1.2.5.4.2 Kardiovaskuläres System

Sphingosin-1-Phosphat gilt als kardioprotektiv, da es über eine S1PR1-abhängige Akt-Signalweg-Aktivierung das Überleben von Kardiomyozyten nach Hypoxie erhöht und das Ausmaß ischämisch- und reperfusionsbedingter Schädigung vermindert. Weitere Versuche konnten zeigen, dass Sphingosin-1-Phosphat auch bei Ischämien, die in anderen Geweben auftreten, also unter anderem bei Insulten, akuten Lungentraumen oder der Sepsis, cytoprotektiv wirkt. Auch die Stimulation der endothelialen Stickstoffmonoxid-Produktion mit daraus resultierender Vasodilatation, eine Reaktion, die dem HDL zugeschrieben worden ist, scheint Sphingosin-1-Phosphat-vermittelt zu sein.⁵

1.3 Der Sphingosinmetabolismus und Krebs

1.3.1 Der Sphingolipid-Rheostat und Krebs

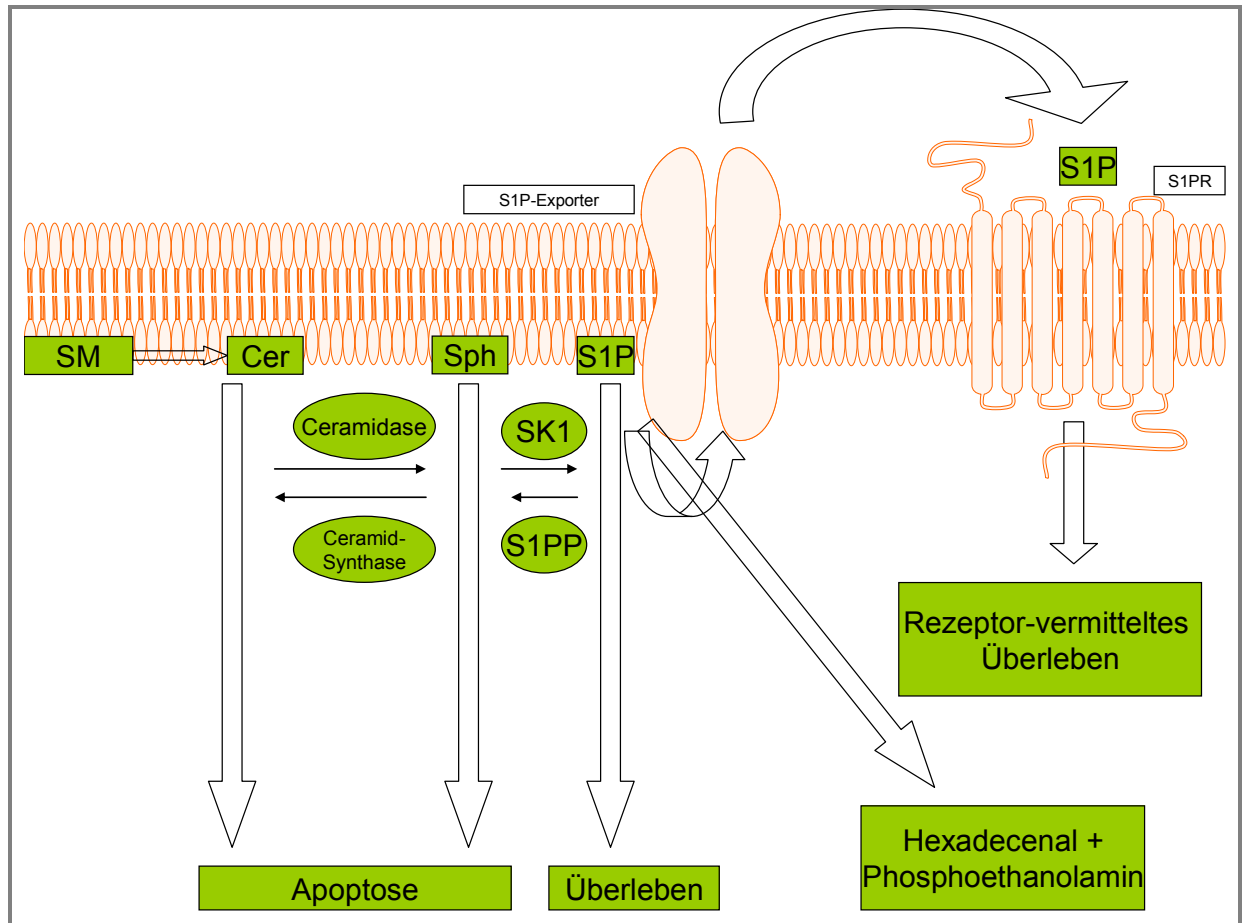


Abb. 5 Schematische Darstellung des Ceramid-Sphingosin-Sphingosin-1-Phosphat – Rheostats

In Malignomen wird häufig ein durch ein Ungleichgewicht des in Abb. 5 schematisch dargestellten Sphingolipid-Rheostats bedingter dysregulierter Sphingolipidmetabolismus gefunden.

Ceramid wirkt über verschiedene intrazelluläre Angriffspunkte, wie über die Protein-Phosphatase 1 und 2A, Cathepsin D und die Protein Kinase C δ pro-apoptotisch.⁸

Die zu den Onkogenen gehörende Sphingosinkinase 1 beeinflusst das Zellverhalten über mehrere Signaltransduktionswege. Sie fördert die Ras-abhängige Zelltransformation, beeinflusst über Regulation von Adhäsion und Migration die Metastasierungsneigung und führt zu einer Überexpression von anti-apoptotisch wirkenden Bcl-2-Mitgliedern. Das

Enzym ist in vielen Malignomen, wie beispielsweise dem Glioblastom überexprimiert und korreliert dann mit einer verminderten Überlebensrate der Patienten.^{7,8}

Die für den Abbau des Sphingosin-1-Phosphats notwendigen Enzyme, die Sphingosin-1-Phosphat-Phosphatasen und die Sphingosin-1-Phosphat-Lyase, die nach stressbedingter Aktivierung, p53- und p38-vermittelt die Apoptose induziert, gelten als Anti-Onkogene und sind in verschiedenen Tumoren, unter anderem dem Colonkarzinom, herabreguliert.^{7,5}

Sphingosin-1-Phosphat spielt eine bedeutende Rolle in der Karzinogenese.

Die Ausschleusung dieses Sphingolipids durch ATP-Bindungskassetten-Transporter bewirkt über die auto- und parakrine Stimulation der S1P-Rezeptoren pro-proliferative Effekte. Extrazelluläres Sphingosin-1-Phosphat erhöht die Expression anti-apoptotisch wirkender Moleküle, wie Bcl-2 und Mcl-1. Mcl-1, das zur Bcl-2-Familie gehört, wird vor allem im Multiplem Myelom überexprimiert und wurde daher nach diesem benannt (myeloid cell leukemia-1). Zusätzlich vermindert Sphingosin-1-Phosphat die Expression von pro-apoptotisch wirkenden Molekülen, wie Bad und Bax und verhindert deren Aktivierung, wodurch es die Fas-induzierte Apoptose inhibiert.^{7,8} Intrazellulär bewirkt Sphingosin-1-Phosphat weiters einen erhöhten Level an freiem Calcium, aktiviert die Phospholipase D, stabilisiert das mitochondriale Membranpotential und hemmt die Cytochrom C-Freisetzung.⁷

Interessanterweise scheint Sphingosin-1-Phosphat im Prostatakarzinom und im Wilms Tumor vermutlich über Ceramid-Akkumulation oder Expression des Connective Tissue Growth Factors (CTGF), pro-apoptotisch zu wirken.⁷

1.3.2 Die Rolle und Funktion der S1P-Rezeptoren

Das Muster der S1P-Rezeptorexpression an der Zelloberfläche von malignen Zellen ist entscheidend für die Induktion von Migration, Invasion und damit auch Metastasierung durch extrazelluläres Sphingosin-1-Phosphat.⁷

Zunächst sollen die grundsätzlichen, rezeptorvermittelten Signaltransduktionswege (Abb. 6) genauer beschrieben werden.

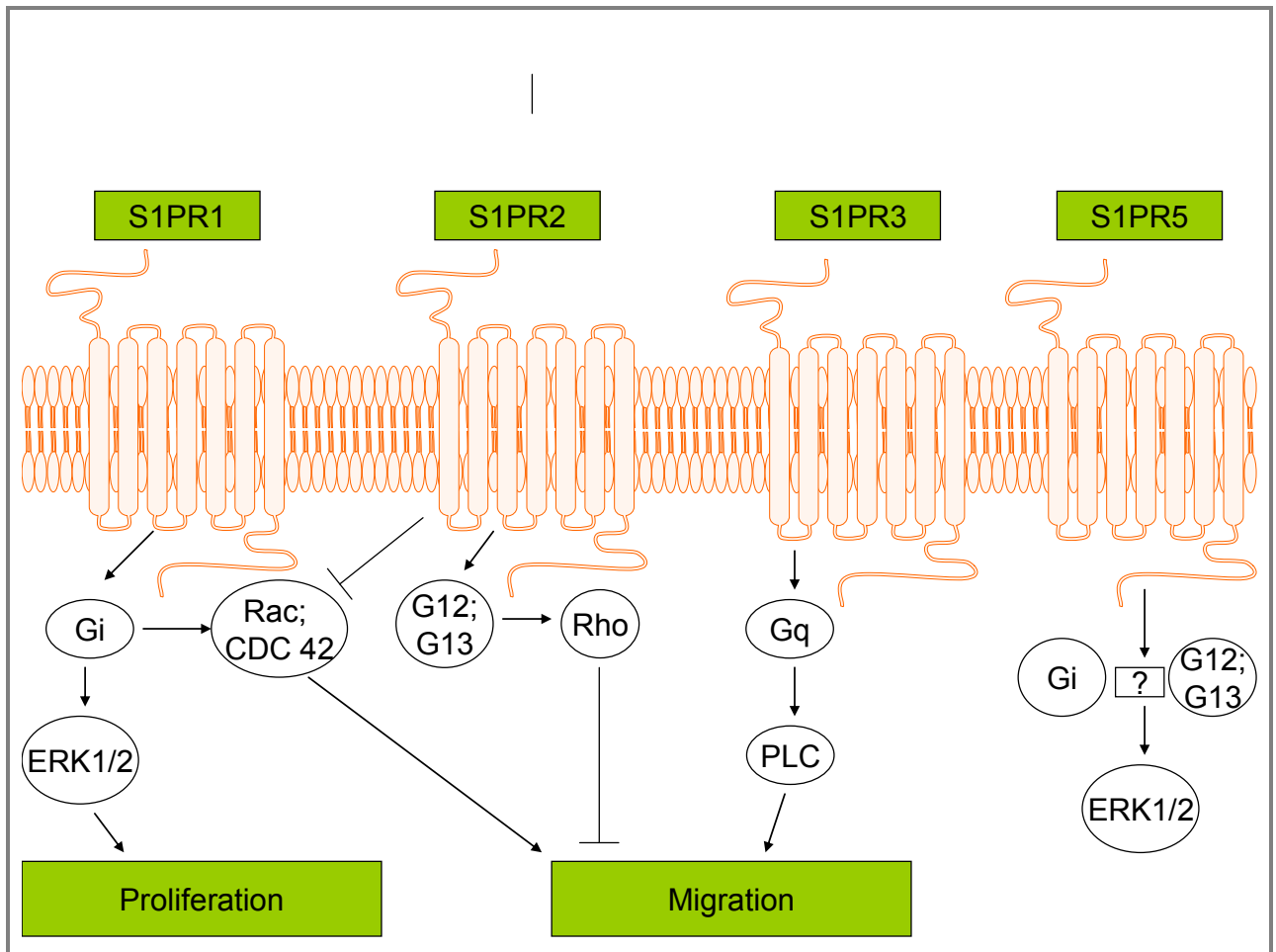


Abb. 6 Schematische Darstellung der Beeinflussung intrazellulärer Signaltransduktionswege durch S1P über seine spezifischen Rezeptoren

1.3.2.1 S1PR1

Der S1PR1 führt über Gi-Aktivierung mit nachfolgender Aktivierung von ERK1 und ERK2 zu einer verstärkten Proliferation und über Aktivierung von Rac und CDC42 zu verstärkter Migration.

1.3.2.2 S1PR2

S1PR2 hemmt die Migration einerseits über Inhibition von Rac und CDC42 und andererseits über Aktivierung von G12 und G13 mit folgender Rho-Aktivierung.

1.3.2.3 S1PR3

S1PR3 fördert die Migration über eine Aktivierung von Gq mit folgender PLC-Aktivitätssteigerung.

1.3.2.4 S1PR5

S1PR5 scheint über Aktivierung von Gi, G12 und G13, ERK1 und ERK2 aktivieren zu können.⁸

1.3.2.5 Besonderheiten der rezeptorvermittelten Signaltransduktionswege beim Glioblastom

1.3.2.5.1 S1PR1

Sphingosin-1-Phosphat führt über die Bindung an den S1PR1 sowohl über eine Induktion des Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Systems (uPA), als auch über eine Aktivierung des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors-1 (PAI-1) zu gesteigerter Invasion. Die Überlebensraten sind bei Patienten, die hohe PAI-1- und Epidermal Growth Factor (EGF) – Expressionsraten aufweisen, schlechter. Diese Korrelation ist darauf zurückzuführen, dass EGF die PAI-1-Expression über einen Sphingosinkinase 1-abhängigen Signalweg erhöht.⁸ Über diesen Rezeptor wird auch Rac-CDC42-abhängig die Migration gefördert und über Aktivierung von ERK1 und 2 die Proliferation stimuliert.⁷

1.3.2.5.2 S1PR2

Der stimulierte Rezeptor hemmt über eine Aktivierung der Rho-Kinase, von Rho A und einer Inhibierung von Rac, die Migration und Motilität, durch fokale Adhäsion und Ausbildung von Stressfasern, kann aber gleichzeitig eine erhöhte Invasivität vermitteln.^{7,8}

1.3.2.5.3 S1PR3

Sphingosin-1-Phosphat wirkt beim Glioblastom über diesen Rezeptor migrationsfördernd.⁷

1.3.2.5.4 S1PR5

Die Stimulation von S1PR5 inhibiert interessanterweise in Glioblastomzellen die ERK-Aktivierung und verhindert so die Proliferation.

1.3.2.6 Wachstumsfaktoren und Sphingosin-1-Phosphat

Wachstumsfaktoren und Sphingosin-1-Phosphat können durch die S1P-abhängige Transaktivierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen mit folgender Formierung funktionaler

Rezeptor-Komplexe zu einer Verstärkung regulatorischer Schleifen führen und so gemeinsam Prozesse wie die Proliferation, Migration und Angiogenese beeinflussen. Deshalb sollen die Interaktionen von Sphingosin-1-Phosphat mit den Wachstumsfaktoren nun näher beleuchtet werden.

1.3.2.6.1 EGF

EGF ist in der Lage, über eine Aktivitätssteigerung der beiden Sphingosinkinasen, die Migration zu induzieren. Zusätzlich können EGF-Rezeptoren aber auch durch eine Sphingosin-1-Phosphat-induzierte gesteigerte EGF-Freisetzung stimuliert werden. Darüber hinaus wird HER2, ein Mitglieder der EGF-Rezeptoren, EGFR- und Metalloproteinase-abhängig, von Sphingosin-1-Phosphat aktiviert. Diese Aktivierung stimuliert die EGF-Freisetzung. Das freie EGF bindet dann an HER2-EGFR-Heterodimere, stimuliert so die EGFR-Tyrosin-Kinase-Aktivität und bewirkt dadurch eine Phosphorylierung von EGFR und HER2. Das phosphorylierte HER2 unterstützt und verstärkt die EGFR-vermittelte Signaltransduktion.

1.3.2.6.2 Heregulin

Die Funktionen von Heregulin bei der Induktion von Migration und Motilität scheinen Sphingosin-1-Phosphat abhängig zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass an HER3- oder HER4-gebundenes Heregulin in der Lage ist, die Sphingosinkinase 1 zu aktivieren. Die Aktivität dieses Enzyms ist entscheidend für die, über einen Filamin A- und p21-beinhaltenden Kinase-Komplex vermittelte, Actin-Polymerisierung und S1PR1-abhängige Motilitätszunahme.

1.3.2.6.3 PDGF

PDGF und S1PR1 steigern gemeinsam die Migration, zusätzlich transaktiviert Sphingosin-1-Phosphat über S1PR3 den PDGF β -Rezeptor, was zu einer Aktivierung von ERK und Akt führt. S1PR1 und PDGFR β bilden gemeinsam einen funktionalen Signalkomplex, der die PDGF-stimulierte Aktivierung der Erk unterhält und so die Migration fördert. Dieser Vorgang wird als integrative Signalübermittlung oder „GCPR-Jacking“ bezeichnet. Zusätzlich scheint der S1PR1-PDGFR β -Komplex über die Regulation des Migrationsverhaltens von glatten Muskelzellen und Fibroblasten die Neovaskularisierung beeinflussen zu können.

1.3.2.6.4 VEGF

Sowohl Sphingosin-1-Phosphat als auch VEGF führen über eine Inhibierung von Ras-GAP zu einer Aktivierung des Ras-ERK-Signalweges. Die beiden Verbindungen regulieren also über eine gegenseitige Verstärkung die Angiogenese-beeinflussenden Signalwege.

Die Sphingosinkinase 1- und Sphingosin-1-Phosphat-abhängige Regulation der Ras-GAP und die Verstärkung der VEGF-induzierten Ras-ERK1-ERK2-Signalübermittlung in Endothelzellen ist wichtig für die Neovaskularisierung.

1.3.2.6.5 LPA

Die Sphingosin-1-Phosphat-Übermittlung in Malignomen kann über eine Interaktion zwischen Sphingosin-1-Phosphat und der Lysophosphatidsäure (LPA) reguliert werden. Die Lysophosphatidsäure führt über Erhöhung der EGF-Freisetzung mit verstärkter Stimulation der EGF-Rezeptoren, zu einer Hochregulation der Sphingosinkinase 1 mit daraus resultierender gesteigerter Sphingosin-1-Phosphat-Produktion. Sphingosin-1-Phosphat wird anschließend ausgeschleust und fördert über S1PR3 die Migration und Invasion.

1.3.2.6.6 Östrogen

Unter der typischerweise in Brustkrebszellen auftretenden „Criss-Cross-Transaktivierung“ versteht man die indirekte Aktivierung des EGF-Rezeptores durch Östrogen. Östrogen aktiviert, mediiert durch ERK1 und ERK2, die Sphingosinkinase 1, woraus eine erhöhte Produktion und Freisetzung von Sphingosin-1-Phosphat ergibt. Sphingosin-1-Phosphat führt dann S1PR3-vermittelt zu einer erhöhten Metalloproteinase-induzierten EGF-Freisetzung. Das extrazelluläre EGF führt nun rezeptorabhängig zu einer Stimulation des EGF-Signalweges.⁸

1.3.2.7 Weitere Einflüsse bioaktiver Sphingolipide auf die Karzinogenese und Tumorprogression

1.3.2.7.1 Autophagie

Autophagie, darunter versteht man den lysosomal stattfindenden Abbau von Proteinen oder geschädigten Organellen, beeinflusst entscheidend das zelluläre Schicksal und hat somit auch Auswirkungen auf den Gesamtorganismus. Dysfunktionen in der Regulation dieses Mechanismus spielen nicht nur eine Rolle in der Krebsentstehung, sondern auch bei Lipidspeicherkrankheiten, neurodegenerativen Erkrankungen und beim Altern. Autophagie kann für Zellen überlebenswichtig sein, da bei Nährstoffmangel über den Abbau geschädigter Organellen, Aminosäuren für die Energiebereitstellung gewonnen werden können. Andererseits kann durch Autophagie auch die Apoptose induziert werden.

Da dieser Prozess also immensen Einfluss auf das zelluläre Schicksal hat, ist es verständlich, dass eine Vielzahl von als Autophagy-related-Genes (Atg) bezeichneten Genen, dessen Ausführung regulieren.

mTOR inhibiert PI3K-abhängig die Atg-Protein-Induktion, Aminosäurenmangel und Beclin1 hingegen induzieren die Atg-Protein-Induktion. Die bioaktiven Metaboliten des Sphingolipidstoffwechsels, besonders Ceramid und Sphingosin-1-Phosphat, können über diese Signalwege, die Induktion und Art der Autophagie beeinflussen. Die Sphingosinkinasen und Sphingosin-1-Phosphat fördern bei Nährstoffmangel die Bildung von Autophagosomen und den Anstieg der Proteolyserate und bewahren die Zellen so über eine relativ geringe Zunahme der Beclin1-Expression, durch Einleitung der protektiven Autophagie vor der Apoptose.⁷ Exogenes Sphingosin-1-Phosphat bewirkt über eine S1PR5-vermittelte Inaktivierung von mTOR mit daraus resultierendem Verlust der Autophagie-Suppression, zelluläres Überleben.⁸ Ceramid führt über verschiedene Mechanismen zu intrazellulären Stress-Reaktionen, die die Ausführung der protektiven Autophagie zur Folge haben.⁷ Beispielsweise führt C₂-Ceramid über eine Verminderung von Nährstofftransportern zu einem Nährstoffmangel und aktiviert so die Autophagie.²⁰ Der Ceramid-vermittelte Autophagie-initiierte Zelltod erfolgt typischerweise mittels starker Zunahme der Beclin-1-Expression. In Glioblastomzellen führt eine Überexpression von mda-7/IL-24 im Endoplasmatischen Retikulum aufgrund einer Stressreaktion zu vermehrter Produktion von Ceramid, Ca²⁺ und reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS), woraus Autophagie und Zelltod resultieren.²¹

Die Sphingosinkinase 1-induzierte Autophagie-Überlebens-Reaktion muss bis zum Einsetzen der Hypoxie-induzierten Sphingosinkinase 1-Expression aufrechterhalten werden. Erst dann kann eine ausreichende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung über die gesteigerte Neovaskularisation garantiert werden.⁸

1.3.2.7.2 Hypoxie

In 50-60% der soliden Tumoren herrschen hypoxische Bedingungen. Dies führt zur Aktivierung von Signalwegen, die die Angiogenese, das Tumorwachstum, die Metastasierungsneigung und auch die Resistenz gegenüber cytotoxischen Schäden beeinflussen.⁷ Der Hypoxie-induzierbare Faktor HIF1 ist hauptverantwortlich für die zelluläre Adaptation an hypoxische Bedingungen. Unter Sauerstoffmangel nimmt der Anteil an freiem, unhydroxyliertem HIF zu. Anhaltende Hypoxie führt zu einer Steigerung

der Sphingosinkinase 1- und Sphingosinkinase 2-Expression. Dabei wird die Transkription der beiden Enzyme über die Bindung von HIF1 α und HIF2 α an zwei Hypoxie-induzierbaren-Faktor-reagierende Elemente (HREs) im Bereich des Sphingosinkinase-Promoter-Region reguliert. Hypoxie fördert die Migration von Endothelzellen und erhöht in Glioblastomzellen die Sphingosin-1-Phosphat-Produktion und -Freisetzung, welches wiederum die Neovaskularisation stimuliert. Tumorzellen schützen sich also durch Expression der HIFs und daraus resultierender erhöhter Sphingosinkinase 1-Expression vor Hypoxie-induziertem Stress. Darüber hinaus beeinflusst die Sphingosinkinase 1 die Sauerstoffsensitivität der Krebszellen auch über die Regulation des HIF1 α -Levels. Hypoxische Bedingungen in Glioblastomen und anderen Malignomen führen zu einer ROS-abhängigen Aktivierung der Sphingosinkinase 1, die daraufhin über eine Aktivierung des Glykogen-Synthase-Kinase-3 β -Signalweges eine Expressionsteigerung von HIF1 α bewirkt. Zusätzlich wird über eine Hypoxie-induzierte- und Sphingosinkinase 1-abhängige Aktivierung von Akt der Abbau des HIF1 α verhindert.^{7, 8, 22}

1.3.2.7.3 Angiogenese

Die Angiogenese, die ab einer gewissen Tumormasse für eine ausreichende Oxygenierung im Tumorgewebe essentiell ist, wird überwiegend über Stimulierung des in Tumorgefäßen häufig überexprimierten S1PR1 mit nachfolgender Regulation von Rho vermittelt. Durch Transaktivierung und synergetische Wirkungen von Sphingosin-1-Phosphat und VEGF wird die Angiogenese initiiert und eine gesteigerte Neovaskularisierung ermöglicht. Sphingosin-1-Phosphat stimuliert die Proliferation und Migration von Endothelzellen, während VEGF die Proliferation, Migration und Adhäsion von Endothelzellen und glatten Muskelzellen kontrolliert.⁷

1.4 Hirntumoren

Grundsätzlich können raumfordernde intrakranielle Neoplasmen vom Neuroepithel oder den umgebenden Strukturen abstammen oder es kann sich um entwicklungsgeschichtlich ektopy intrakranielle Gewebsdifferenzierungen handeln.²³

Gliome, also Tumoren neuroepithelialen beziehungsweise glialen Ursprungs, werden aufgrund des vorherrschenden Zelltyps in Astrozytome, Oligodendrogliome, gemischte

Gliome und Ependymome unterteilt.²⁴ Sie sind die am häufigsten auftretenden Malignome des zentralen Nervensystems (Tab. 1).²⁵

1.4.1.1 Epidemiologie

Die Inzidenz der Hirntumoren beträgt 5-9/100.000. Der Altersgipfel liegt bei 50 bis 55 Jahren. Das Glioblastoma Multiforme gilt mit einer relativen Häufigkeit von 12-23%, bezogen auf alle zentralnervösen Neoplasien, als der am häufigsten auftretende primär zentralnervöse Tumor.^{25, 26}

1.4.1.2 Ätiopathogenese:

Die Ätiologie der Hirntumoren ist unklar. Als Risikofaktoren für das Auftreten von Glioblastomen gelten ionisierende Strahlung und eine genetische Prädisposition, wobei aber erwähnt werden muss, dass bei weniger als 5% aller Glioblastome hereditäre Ursachen, wie das Li Fraumeni-Syndrom oder die Neurofibromatosen 1 und 2 zu Grunde liegen.^{27, 28}

1.4.1.3 Neuropathologie:

Die mikroskopischen allgemeinen zellulären Merkmale, die auch für die zentralnervösen Neoplasien gelten, umfassen Zellpolymorphie, Anisonukleose, Kernpolymorphie, Kernhyperchromasie, Mitosefiguren, Nukleolenvergrößerung, Aneuploidie, eine Verschiebung der Kern-Plasma-Relation zugunsten des Kerns und das Auftreten von Stammzelllinien. Typisch fürs Glioblastom sind eine hohe mitogene Aktivität, Zellreichtum, ein stark ausgeprägter Polymorphismus und ausgeprägte Gefäßproliferationen.

Die WHO-Klassifikation unterteilt die Hirntumore anhand dieser lichtmikroskopischen Kriterien in vier Grade, die von benigne (Grad I) bis hochmaligne (Grad IV) reichen.

TUMOR	WHO-GRAD	5-J-ÜLR
Pilozystisches Astrozytom	I	87%
Diffus-infiltrierendes Astrozytom	II	49%
Anaplastisches Astrozytom	III	31%
Glioblastom	IV	3%
Oligodendrogliom	II/III	63%

Ependyomom	II/III	67%
Medulloblastom	IV	56%
Schwannom/MPNST	I/III	>80%
Meningeom	I (II/III)	>70%

Tab. 1 Histologisches Grading intrakranieller Tumoren und dessen Korrelation mit der 5-Jahres-Überlebensrate

Makroskopisch werden bei intrakraniellen benignen Tumoren Kalkeinlagerungen oder eine Zystenbildung festgestellt. Maligne Tumoren weisen bei insuffizienter Blutversorgung zentral nekrotische Veränderungen auf. Rasches Tumorwachstum kann durch mangelhaft ausgebildete Gefäße mit Einblutungen einhergehen, die sich klinisch mit apoplektiformer Symptomatik äußern.²³ Gliome infiltrieren typischerweise die weiße Substanz und führen dadurch zu einer sichtbaren Verdickung und Abflachung der Gyri.

Störungen der Blut-Hirnschranke, toxische Stoffwechselprodukte und tumorbedingte hämodynamische Veränderungen führen beim Großteil der Hirntumoren zur Ausbildung eines perifokalen Ödems, das zusätzlich zur Problematik des erhöhten Hirndruckes beiträgt.

Die Metastasierung intracerebraler Malignome erfolgt überwiegend über den Liquor, häufig in Form sogenannter „Abtropfmetastasen“.²⁴

1.4.1.4 Klinik

1.4.1.4.1 Symptomatologie

Hirntumoren werden überwiegend durch den, durch das intrakranielle Tumorwachstum bedingten, Druckanstieg symptomatisch. Dabei gelten Kopfschmerzen mit 70% als häufigstes, wenn auch relativ unspezifisches, Erstsymptom.²⁵ Diese Kopfschmerzen, die von Übelkeit und Erbrechen begleitet sein können, treten vor allem morgens auf, sind frontal lokalisiert und werden typischerweise durch Durchführung des Valsalva-Manövers verstärkt.

Bei 15-20% der Patienten stellt ein epileptischer Anfall, der häufig auf die Lokalisation des Hirntumors rückschließen lässt, das Erstsymptom dar. Grand-Mal-Anfälle weisen auf eine

frontale, komplex partielle Anfälle auf eine temporale und sensible oder motorische Jackson Anfälle auf eine zentrale Lokalisation der Neoplasie hin.

Antriebsstörungen und Verlangsamung bis zur Apathie, Wesensveränderungen oder Affektlabilität und andere psychische Auffälligkeiten können, wiederum abhängig von der Tumorlokalisierung, ebenfalls erste Anzeichen einer intrakraniellen Raumforderung sein.

Zu den eindeutigen Hirndruckzeichen, die eher im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf aber bei rascher Wachstumsprozedienz auch schon früh auftreten können, zählen unter anderem Störungen der Pupillomotorik. Diese können sich beispielsweise bei gleichseitiger Kompression des Nervus oculomotorius als einseitige Mydriasis, bei Beeinträchtigung des Diencephalons als beidseitige Miosis oder bei einer Kompression des Mittelhirns als beidseitige Mydriasis äußern. Stauungspapillen, Vigilanzstörungen und im Endstadium der Erkrankung das Syndrom der Einklemmung, welches in die obere Einklemmung, also die Verlagerung und Einklemmung des Di- und Mesencephalons im Tentoriumschlitz und die untere Einklemmung, also die Einklemmung der Medulla oblongata im Foramen occipitale magnum, unterteilt werden kann, stellen weitere typische Zeichen erhöhten Hirnsdrucks dar.

Abhängig von der Lokalisation des Tumors können auch neurologische Herdsymptome auftreten. Frontale und bilaterale Tumoren werden häufig durch psychopathologische Symptome, supraselläre durch Visusminderung, parietale durch Aphasie, Apraxie oder Hemiparese, okzipitale durch Hemianopsie und infratentorielle typischerweise durch Ataxie, manifest.²³

Die klinische Malignitätsbeurteilung umfasst neben dem Alter des Patienten, der Krankheitsdauer und der obligaten histopathologischen Beurteilung bei intrakraniellen Tumoren auch deren biologisches Verhalten, also das Ausmaß der raumfordernden Wirkung und die Metastasierungsneigung.²³

1.4.1.4.2 Diagnostik

Neben der Eigen- und Fremdanamnese und Fragen nach Frühsymptomen und dem eventuellen Vorhandensein einer B-Symptomatik soll in der folgenden körperlichen Untersuchung vor allem auf das Vorhandensein neurologischer Herdsymptome, die durch die Tumorlokalisierung selbst aber auch durch die Massenverschiebung bedingt sein können, geachtet werden.

Eine Bestätigung einer Verdachtsdiagnose muss, bei Verdacht auf einen Hirntumor, immer mittels CT beziehungsweise MRT erfolgen. Dadurch kann in rund 90% der Fälle der Tumor mittels Kontrastmittel-CT nachgewiesen werden und bei Durchführung einer MRT häufig sogar eine radiologische Artdiagnose erfolgen.

Die Lumbalpunktion, die nicht zur Standarddiagnostik gehört, erlaubt neben dem Ausschluss entzündlicher Ursachen eine zytologische Diagnostik und oft auch eine ätiologische Zuordnung.²⁹ Im EEG kann sich ein Hirntumor durch den Nachweis epileptischer Potentiale oder durch Herdbefunde manifestieren.

Zu diagnostischen Zwecken oder einer präoperativen Abklärung kann, vor allem bei stark vaskularisierten Tumoren oder pathologischen Gefäßveränderungen, die Durchführung einer cerebralen Angiographie notwendig sein.^{23, 25}

1.4.1.4.3 Therapie

Therapeutische Optionen bei Hirntumoren umfassen Operation, Radiatio und Chemotherapie. Im Gegensatz zur stereotaktischen Biopsie, die nur der Diagnosesicherung gilt, wird bei der offenen Biopsie beziehungsweise der Operation eine gleichzeitige möglichst vollständige Resektion des Tumors angestrebt. Bei Tumoren des WHO-Grades I und II, stellt die Operation die Therapie der Wahl dar, da die Patienten nach einer vollständigen Resektion als geheilt gelten. Bei Tumoren des WHO-Grades III und IV ist das Ausmaß der Resektion für die Größe des Zeitintervalls bis zum Auftreten eines Rezidivs entscheidend.

Wenn aufgrund der Größe, Lokalisation und radiologischen Verdachtsdiagnose des Tumors, sowie aufgrund des Allgemeinzustandes, Alters oder der Begleiterkrankungen des Patienten keine Operationsindikation gestellt wird, erfolgt eine neoadjuvante Radio- oder Chemotherapie. Die Radiatio kann prinzipiell entweder extern fraktioniert oder bei inoperablen mittelliniennahen Tumoren mit stereotaktisch eingebrachten Radionukliden als Brachytherapie erfolgen. Kleine, operativ schwer zugängliche Tumoren stellen eine Indikation für die Radiochirurgie dar.

Die Chemotherapie, die sowohl neoadjuvant, adjuvant oder bei einem Rezidiv erfolgen kann, wird bei anaplastischen Astrozytomen und Gliomen mit Temozolamid, einem

Imidazotetrazinonderivat, das als Nitroseharnstoffverbindung zu einer Alkylierung und DNA-Quervernetzung führt, durchgeführt.³⁰ Bei intracerebralen Neoplasien mit gestörter Blut-Hirn-Schranke ist prinzipiell auch eine intravenöse, bei Malignomen, die zu einer Metastasierung über den Liquor neigen, auch eine intrathekale Applikation der Chemotherapeutika möglich.

Die begleitende symptomatische Therapie umfasst die Senkung des intrakraniellen Drucks. Die Behandlung des Hirnödems erfolgt primär mittels Kortikosteroiden, bei nicht ausreichendem Therapieeffekt dieser werden zusätzlich osmotisch wirksame Substanzen wie Mannitol oder Glycerol verabreicht.

Wenn durch das maligne Geschehen bedingt epileptische Anfälle auftreten, ist eine medikamentöse Therapie, üblicherweise mit Carbamazepin, indiziert, die präoperativ beginnt und postoperativ noch über mindestens drei Monate fortgeführt werden soll. Zusätzlich kann die Verabreichung von Analgetika, meist Opiaten, und Antiemetika erforderlich sein.²³

1.4.2 Besonderheiten des Glioblastoms

Der hochmaligne nach der WHO als Grad IV klassifizierte Tumor manifestiert sich bevorzugt im höheren Lebensalter und ist vor allem in den Großhirnhemisphären, bevorzugt frontotemporal lokalisiert.^{23, 28}

1.4.2.1 Abnorme Signaltransduktionswege im Glioblastoma Multiforme

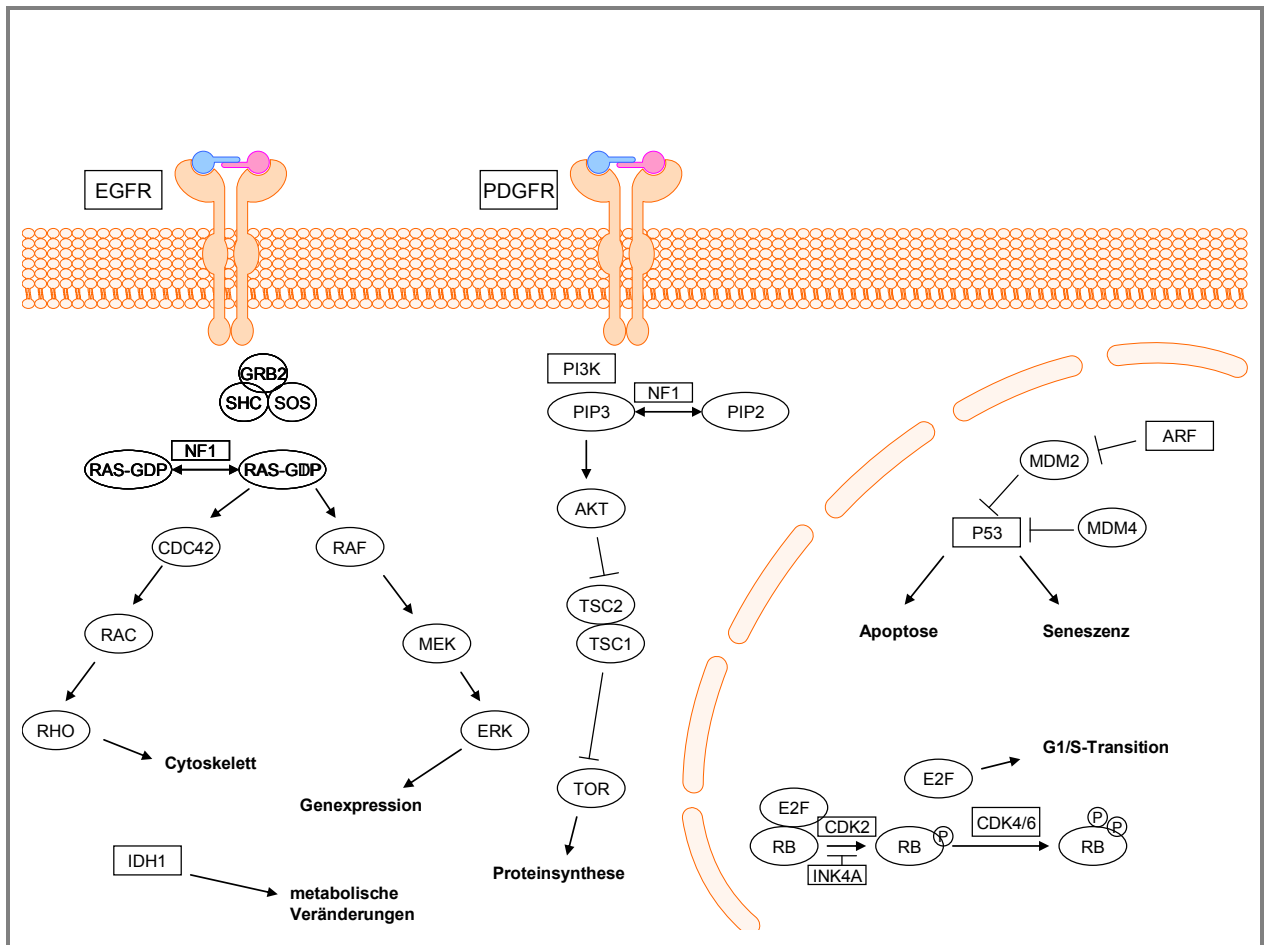


Abb. 7 Schematische Darstellung onkogener Signaltransduktionswege beim Glioblastoma Multiforme

Entscheidend für die Tumorentstehung sind Mutationen in Regulationsmechanismen, die Einfluss auf die Proliferation oder die Apoptose haben (Abb. 7).

In Studien konnte gezeigt werden, dass beim Glioblastom am häufigsten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, Ras, PI3K, p53 und Rb von Veränderungen oder Mutationen betroffen sind.³¹ Der Funktionsverlust von Rb kann durch Überexpression der Cyclin-abhängigen Kinasen 2 und 4 oder eine Inaktivierung ihres negativen Regulators p16 erfolgen. Die Wirkung von p53 kann durch Überexpression der Ubiquitin-Ligasen Mdm2 oder Mdm4 oder einen Funktionsverlust von p14, welches die Mdm2 inhibiert, beeinträchtigt werden. Mutationen in Protoonkogenen führen zu einer persistierenden Aktivierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen trotz fehlender Rezeptor-Liganden-Bindung. Bei Glioblastomzellen betreffen diese Mutationen am häufigsten den EGF- und den PDGF-Rezeptor. Die rezeptorvermittelte Signaltransduktion wird in Gliazellen intrazellulär durch die

Tumorsuppressoren Nf1 und PTEN reguliert. Das Neurofibromatosegen 1 (Nf1), das über eine Ras-GAP-Domäne verfügt, ist in der Lage die Aktivierung von Ras abzuschwächen. PTEN greift über eine Dephosphorylierung von PIP3 in den PI3K-Signalweg ein.²⁶

1.4.2.2 Veränderungen des Metabolismus im Glioblastoma Multiforme:

Eine Reihe von genetischen und epigenetischen Veränderungen ist dafür verantwortlich, die Proliferationsfähigkeit von Tumorzellen aufrechtzuerhalten und damit die Tumorprogression zu fördern.

In Glioblastomzellen wurden neben einer erhöhten Glukoseaufnahme, die mittels Positronen-Emissions-Tomographie zu diagnostischen Zwecken genutzt wird, eine bevorzugte ATP-Gewinnung über die aerobe Glykolyse und Veränderungen im Glutaminkatabolismus beobachtet.

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts entdeckte Otto Warburg, dass in Malignomen trotz ausreichender Sauerstoffversorgung, anders als in normalen Geweben, wo die mitochondriale oxidative Phosphorylierung überwiegt, mehr als 50% des ATPs durch Glykolyse produziert werden. Dieser auch als „aerobe Glykolyse“ bezeichnete Effekt, erscheint aufgrund des hohen Glukosebedarfs, der relativ geringen ATP-Erzeugung und der erhöhten Laktatproduktion zunächst unvorteilhaft für die Zellen. Man konnte sich, da die ATP-Verfügbarkeit in Glioblastomzellen im Allgemeinen ausreichend ist und dieses viel effizienter über die oxidative Phosphorylierung gewonnen wird, lange Zeit nicht erklären, weshalb die Tumorzellen diesen Stoffwechselweg bevorzugen. Aufgrund der hohen Proliferationstendenz muss in malignen Geweben aber neben der ATP-Erzeugung, auch die ausreichende Verfügbarkeit von Nucleotiden, Fettsäuren und Aminosäuren gewährleistet werden. Die Bereitstellung dieser Metabolite für anabole Stoffwechselvorgänge erfolgt durch die aerobe Glykolyse und den Glutaminkatabolismus.³²

1.4.2.3 Ätiologie und Pathogenese

Molekularbiologisch werden das primäre und das sekundäre Glioblastom unterschieden. Das primäre, das de novo entsteht, weist eine Amplifikation und Überexpression des EGF-Rezeptors, PTEN-Mutationen, p16-Deletionen und gelegentlich eine Amplifikation des MDM2-Gens auf. Im Gegensatz dazu entsteht das sekundäre Glioblastom durch

Progression aus einem niedriggradigen Astrozytom, stellt also dessen entdifferenzierte Form dar, und weist in mehr als 70% Mutationen des p53-Gens auf.²⁸

Neure Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass neuronale Stammzellen, die sich subventrikulär im Bereich der Seitenventrikel und in der subgranulären Zone im Bereich des Gyrus dentatus befinden, in der Pathogenese des Glioblastoms eine entscheidende Rolle spielen könnten. Diese Subpopulation von Glioblastomzellen scheint auch für den geringen Behandlungserfolg bei diesem Malignom verantwortlich zu sein.²⁶

1.4.2.4 Neuropathologie

Typisch und auch namensgebend für das Glioblastoma Multiforme ist die „bunte Schnittfläche“ mit Nekrosen, Einblutungen und grauweißem Tumorgewebe. Ein bilateral symmetrisches Tumorwachstum mit Infiltration beider Hemisphären, ist ebenfalls charakteristisch für dieses Malignom und wird als Schmetterlingsgliom bezeichnet.

Histologisch imponiert der Tumor als zellreich, polymorph und hoch mitogen. Mehrkernige Riesenzellen und Glioblastom-Palisaden, also die Anordnung astrozytenartiger Tumorzellen um kernlose Nekrosebänder, sind typisch aber nicht obligat (Abb. 8).²⁸

5-10% der Glioblastome erweisen sich bereits bei Diagnosestellung als multifokal.²⁴

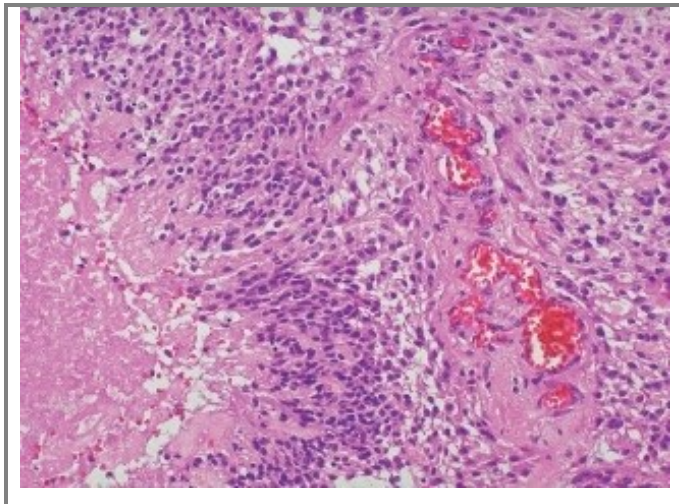


Abb. 8 Glioblastoma Multiforme.

Man sieht zellreiches, undifferenziertes Gewebe. Die typische, palisadenförmige Stellung der Tumorzellen ist um ausgedehnte Nekrosebezirke zu erkennen. Deutlich sichtbar auch die ausgeprägte Kapillarproliferation. HE-Färbung, Vergr. 200-fach.³³

1.4.2.5 Klinik

Aufgrund der Entdifferenzierung des Tumors und der dadurch bedingten hohen Malignität ist die Anamnese typischerweise kurz und der Krankheitsverlauf rasch progredient. Zwischen dem Auftreten von Initialsymptomen, wie Kopfschmerzen, psychopathologische Veränderungen und epileptische Anfälle, und dem Auftreten neurologischer Herdsymptome liegt ein kurzes Zeitintervall von üblicherweise wenigen Wochen. Apoplektische Gliome können durch eine Einblutung zu einer akuten Verschlechterung des neurologischen Beschwerdebildes führen.

1.4.2.6 Diagnostik

Bei klinischem Verdacht auf einen Hirntumor wird eine CT- oder MRT-Untersuchung ohne und mit Kontrastmittel durchgeführt. Im CT stellt sich der Tumor erfahrungsgemäß, bedingt durch die degenerativen Veränderungen, zentral hypodens dar. Meist ist der Tumor von einem perifokalen Ödem umgeben und zeigt ein ringförmiges Enhancement. Im MRT (Abb. 9) ist in T1-Wichtung ein gemischtes Signal, in T2-Wichtung ein hyperintenses, inhomogenes Signal typisch. Das EEG weist häufig unspezifische Allgemeinveränderungen auf, unter Umständen kann sich auch ein Herdbefund zeigen.²³



Abb. 9 Glioblastoma Multiforme.

Sagittales MRT Cerebri mit Kontrastmittel; T1-gewichtet: Man erkennt eine peripher kontrastmittelaufnehmende, zentral nekrotische Läsion.³⁴

1.4.2.7 Therapie

Anzustreben ist eine möglichst vollständige Resektion des Tumors, um die intrakranielle Raumforderung zu vermindern und die Remissionsdauer zu verlängern.

Die bei Gliomen mit Grad III und IV standardmäßig adjuvant durchgeführte Radiotherapie erfolgt fraktioniert (2Gy/d) mit einer Gesamtdosis von 60 Gray. Operativ schwer zugängliche Tumoren können auch mit Iod-125-Kathetern oder Afterloading-Therapie behandelt werden.

Die Chemotherapie, die standardmäßig in Kombination mit der Radiotherapie erfolgt, beginnt mit einer täglichen peroralen Verabreichung von Temozolamid in einer Dosierung von $75\text{mg}/\text{m}^2$. Diesem ersten kombinierten Zyklus folgen sechs Zyklen mit alleiniger Chemotherapie mit einer Dosierung von Temozolamid von $150\text{-}200\text{mg}/\text{m}^2$, die jeweils fünf Tage dauern und am Tag 29 wiederholt werden.

Supportive Therapiemaßnahmen umfassen eine ausreichende analgetische Therapie, die Behandlung des Hirnödems, die Prävention thromembolischer Ereignisse und bei Bedarf eine antiepileptische Therapie.^{27 35}

Bei Rezidiven wird individuell, abhängig von Patienten- und Tumorparametern, die Indikation zur Reoperation, Chemo- oder neuerlicher Strahlentherapie, geprüft.²⁹

1.4.2.8 Nachsorge

Patienten mit Grad IV-Tumoren sollten in Abständen von drei Monaten klinisch und bildgebend untersucht werden.³⁵

1.5 Lipidmetabolismus im zentralen Nervensystem

Cholesterin ist der essentielle Vorläufer von Gallensäuren, Vitamin D und Steroidhormonen, wie Progesteron, Östrogen, Testosteron, Glukokortikoiden und Mineralkortikoiden. Es gilt darüber hinaus als wichtiger Bestandteil von Zellmembranen und hat so auch wesentlichen Einfluss auf die Membranpermeabilität. Cholesterin wird im Menschen zum überwiegenden Teil durch endogene Biosynthese gewonnen, die Cholesterinaufnahme über die Ernährung spielt nur eine untergeordnete Rolle. Die Cholesterinhomöostase umfasst die Verteilung des Substrats zwischen der Peripherie und der Leber. Die Leber reguliert die de novo Biosynthese des Cholesterins, die Exkretion in die Galle, die Sekretion ins Blut in Form von Very-Low-Density-Lipoproteinen (VLDL),

die Modulation der Rezeptor-medierte zelluläre Cholesterinaufnahme, die Cholesterin-Veresterung und die Speicherung des Cholesterins. Der Intestinaltrakt reguliert die Cholesterin-Aufnahme und dessen Ausscheidung.³⁶

1.5.1 Lipid-Homöostase im ZNS

Prinzipiell können periphere, nicht hepatische Zellen Cholesterin sowohl durch die lokale Synthese als auch durch die Aufnahme von Sterolen aus Lipoproteinen gewinnen.³⁷

Da das zentrale Nervensystem aufgrund der Blut-Hirn-Schranke von der peripheren Zirkulation getrennt ist, weist der Lipidmetabolismus des zentralen Nervensystems einige Besonderheiten auf.

Das Gehirn gilt als das cholesterinreichste Organ des menschlichen Körpers.

Innerhalb des ZNS wird das gesamte Cholesterin de novo synthetisiert. Im Gegensatz zur Peripherie findet man im zentralen Nervensystem nur High-Density-Lipoprotein-artige Lipoproteine. Da sie unter normalen Bedingungen hauptsächlich von Astrozyten und der Mikroglia produziert und sezerniert werden, bezeichnet man sie auch als gliale Lipoproteine.

Cholesterin stellt das Hauptsterol im Gehirn des Erwachsenen dar. 70-80% des zentralnervösen Cholesterins befinden sich in dem von den Oligodendrozyten produzierten Myelin. Nach Abschluss der Myelinogenese nimmt die Cholesterinsynthese stark ab und findet dann hauptsächlich in Astrozyten statt. Neuronen sind nicht zu einer effizienten Cholesterinsynthese in der Lage und sind somit auf das von den Astrozyten produzierte Cholesterin angewiesen, das sie in Form von ApoE-Lipoproteinen mit Hilfe von zur LDL-Familie gehörenden Rezeptoren aufnehmen. Das von den Neuronen aufgenommene Cholesterin wird daraufhin in einer von der 24-Hydroxylase katalysierten Reaktion, deren Vorkommen sich auf die Großen Pyramidenzellen im Bereich des Cortex, des Hippocampus und der Purkinje-Zellen beschränkt, zu 24(S)-Hydroxycholesterin hydroxyliert. Dieses Oxysterol kann nun die Blut-Hirn-Schranke durchwandern und gelangt so in die periphere Zirkulation, wo es nach dem Transport zur Leber über die Galle ausgeschieden werden kann.

Da über diesen Weg aber nur 50% des gesamten zentralnervösen Cholesterins ausgeschieden werden, vermutet man, dass ein weiterer, bisher noch nicht identifizierter Weg der Cholesterinelimination aus dem ZNS besteht.³⁸

1.5.2 Reverser Cholesterintransport

1.5.2.1 Einführung

Unter dem reversen Cholesterintransport versteht man den Transport von sich in der Peripherie befindlichem Cholesterin zurück zur Leber. Der reverse Cholesterintransport ist ein aktiver Vorgang, der sich aus den Teilschritten Efflux, Veresterung, Transfer und Clearance zusammensetzt.³⁷

ATP-abhängige Cholesterintransporter sind für den Transport von intrazellulärem Cholesterin nach extrazellulär verantwortlich.³⁹

Das ausgeschleuste Cholesterin wird anschließend durch die Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase verestert und dadurch in einen apolaren Zustand gebracht.³⁹

Nach Bindung des apolaren und veresterten Cholesterins an High-Density-Lipoproteine gelangen diese über das Blut zur Leber, wo sie über ApoE-Rezeptoren aufgenommen werden.³⁹

In der Leber erfolgt dann entweder die Wiederverwertung des Sterols durch den Einbau in neu synthetisierte Lipidpartikel, die Sekretion in den Intestinaltrakt als freies Cholesterin oder nach Umbau zu Gallensäuren die Ausscheidung über die Gallenflüssigkeit. Im Darm wird ein Teil des Cholesterins dann wieder gemeinsam mit über die Nahrung aufgenommenem Cholesterin reabsorbiert und steht dann nach Aufnahme über die intestinale Lymphflüssigkeit, die Bildung von Chylomikronen und deren anschließende Lipolyse in der Leber wieder für Biosynthesevorgänge oder strukturelle Aufgaben zur Verfügung.^{37, 39}

Nukleäre Transkriptionsfaktoren spielen durch die Regulation verschiedener Gene eine entscheidende Rolle im reversen Cholesterintransport. Die Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren erhöht den Cholesterinefflux.³⁶

1.5.2.2 ATP-Bindungskassetten-Transporter

Die ATP-Bindungskassetten-Transporter sind, wie bereits erwähnt, eine Superfamilie von mehr als 50 Transmembranproteinen, die den aktiven Transport von verschiedenen Substraten, beispielsweise Aminosäuren, Lipiden, Lipopolysacchariden, anorganischen Ionen oder Medikamenten, bewerkstelligen. Phylogenetische Analysen führten zur Einteilung der Transporter in sieben verschiedene Subfamilien, die als ABCA bis ABCG bezeichnet werden. Die für den gegen einen Konzentrationsgradienten durchgeführten transmembranären Transport benötigte Energie wird durch Hydrolyse von Adenosintriphosphat bereitgestellt. Dabei ist für den Transport eines Substratmoleküls die Hydrolyse von zwei Molekülen ATP erforderlich.

Die ATP-Bindungskassetten-Transporter setzen sich aus zwei Transmembran-Domänen und zwei Nucleotid-bindenden Domänen zusammen. Die Substratspezifität des jeweiligen Transporters wird entscheidend durch die Aminosäuresequenz der Transmembran-Domäne beeinflusst. Mutationen dieser Exportproteine führen zu genetischen Krankheiten, wie Cystischer Fibrose, Morbus Tangier oder der Adrenoleukodystrophie. ATP-Bindungskassetten-Transporter, die der Subgruppe der P-Glykoprotein-Multigen-Familie angehören, spielen eine entscheidende Rolle in der Medikamentenresistenz von Malignomen.

Nicht alle ATP-Bindungskassetten-Transporter sind direkt in den Substrattransport involviert. Einige beeinflussen als Bauteil von Ionenkanälen durch die ATP-abhängige Veränderung der Proteinstruktur selbst den Öffnungszustand des Ionenkanals.

1.5.2.2.1 Die ABCA-Subfamilie und der Reverse Cholesteroltransport

Diese Subfamilie wird von 12 ABCA-Genen kodiert, die auf dem Chromosom 17 lokalisiert sind. Die Proteine können anhand ihrer Intron-Struktur in zwei Gruppen, von denen die erste sieben, die zweite fünf Gene umfasst, eingeteilt werden.

Der ATP-Bindungskassetten-Transporter ABCA1 ist für den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im reversen Cholesterin-Transport verantwortlich, spielt daneben aber auch, wie bereits erwähnt, eine Rolle im Export von Phospholipiden wie Sphingosin-1-Phosphat.

Der exakte Aufbau der ABC-Transporter konnte noch nicht erforscht werden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen legen aber den Schluss nahe, dass durch die zwei

Transmembran-Domänen eine intramembranöse, hydrophile Kammer gebildet wird, die in Richtung der Zelloberfläche porenartige Gebilde aufweist. Da es elektronenmikroskopisch so scheint, dass diese Kammer keine Verbindung zum Cytosol besitzt, wird vermutet, dass P-Glykoproteine an der Innenseite der Plasmamembran als „Floppasen“ wirken und so lipophile Moleküle in die Kammer befördern.⁴⁰

1.5.2.3 Beeinflussung des reversen Cholesterintransports durch die nukleäre Transkriptionsfaktoren LXR (Liver-X-Receptors)

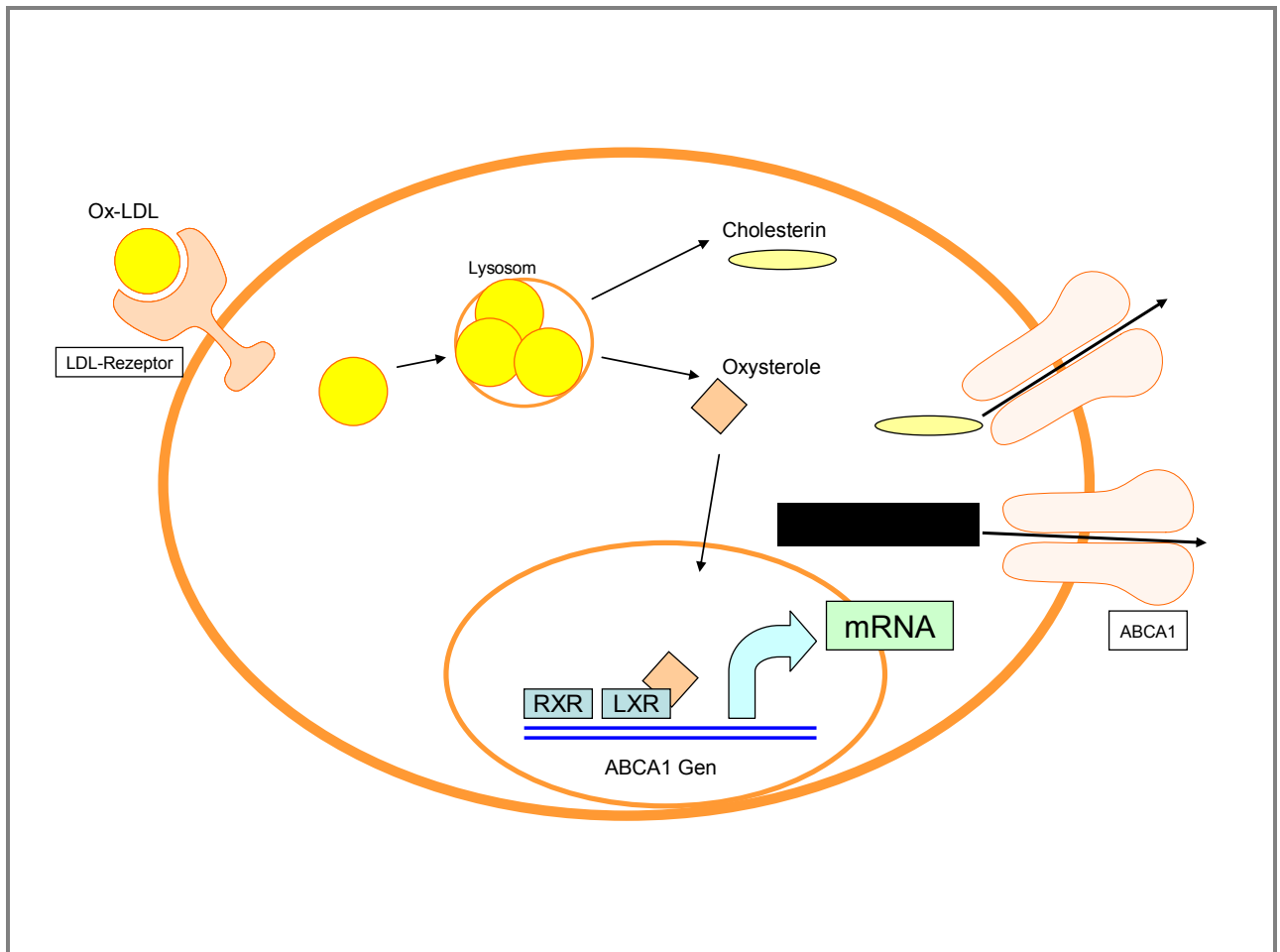


Abb. 10 Schematische Darstellung der LXR-vermittelten Expressionssteigerung von ABCA1 in Astrozyten

LXR gehören zur Superfamilie der Liganden-aktivierten Transkriptions-Faktoren (Abb. 10).

Die Liver-X-Rezeptoren sind nukleäre Rezeptoren, die durch verschiedene Liganden aktiviert werden können. Physiologisch werden die Rezeptoren durch endogene Sterole,

also die oxidierten Derivate von Cholesterin, aktiviert. In verschiedenen Experimenten konnten aber auch andere Aktivatoren der LXRs, wie D-Glukose, Phytosterole oder natürliche Gallensäuren gefunden werden. Zu den synthetischen LXR-Liganden gehören beispielsweise T0901317 und GW3965.

Die LXRs können in zwei Subgruppen, LXR α und LXR β , unterteilt werden. LXR α findet man vor allem in stoffwechselaktiven Geweben, wie Leber, Dünndarm, Nieren oder Fettgewebe. LXR β hat eine geringere Lokalisationsspezifität, kann aber vor allem während der Gehirnentwicklung nachgewiesen werden.

Die LXRs binden an LXR-Response-Elements und bilden daraufhin Heterodimere mit den Isoformen RXR α , RXR β und RXR γ des Retinoid-X-Rezeptors. Durch Bindung an die LXREs regulieren die LXRs die Expression ihrer Zielgene, beispielsweise der UDP-Glucuronyltransferase 1, der Fettsäuren-Synthase oder des Phospholipid-Transfer-Proteins. LXREs konnten auch in den Introns von Genen der ATP-Bindungskassetten-Transporter nachgewiesen werden.

Beide Formen der Liver-X-Rezeptoren fungieren als Cholesterin-Sensoren. Wenn durch eine erhöhte Cholesterinkonzentration intrazellulär Oxysterole akkumulieren, induzieren die LXRs die Transkription von Genen, die die Zellen vor einer Cholesterinüberladung schützen. Die LXR-Aktivierung reguliert die Gallensäuren-Synthese und deren Exkretion, den reversen Cholesterin-Transport, die Cholesterin-Biosynthese und die die Absorption beziehungsweise Exkretion von Cholesterin im Verdauungstrakt.

LXR spielt durch die Regulation verschiedener Gene, wie ABCA1, ABCG1, Apolipoprotein E und das Phospholipid-Transferprotein, eine entscheidende Rolle im reversen Cholesterintransport. Die LXR-Aktivierung erhöht den Cholesterinefflux und wirkt dadurch antiatherogen. Es konnte gezeigt werden, dass ABCA1 ein LXR-Responsible-Element aufweist.

Neben den Funktionen im reversen Cholesterintransport scheinen die Liver-X-Rezeptoren auch die Cholesterinbiosynthese und die Cholesterinaufnahme zu beeinflussen und somit auch eine entscheidende Rolle in der Regulation des Plasma-Cholesterin-Levels zu spielen.³⁶

2 Hypothese / Fragestellung

Zahlreiche Forschungsergebnisse der letzten Jahre legen den Schluss nahe, dass Sphingosin-1-Phosphat, die Sphingosinkinasen und die spezifischen Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren in der Lage sind, die Proliferation, Migration und Invasion beim Glioblastom zu beeinflussen. Wie erwähnt, kann Sphingosin-1-Phosphat intrazellulär als Second Messenger fungieren oder extrazellulär durch die Bindung an fünf spezifische membranständige Rezeptoren in das zelluläre Geschehen eingreifen.

Im Rahmen der Diplomarbeit wird die Rolle der ATP-Bindungskassetten-Transporter beim „Inside-Out-Signalling“ von Sphingosin-1-Phosphat erforscht. Konkret sollte geklärt werden, ob humane Glioblastomzellen dazu in der Lage sind, Sphingosin-1-Phosphat über ATP-Bindungskassetten-Transporter auszuschleusen.

Dazu wurden die dosisabhängigen Wirkungen von exogen hinzugefügtem Sphingosin-1-Phosphat auf die Proliferation von Glioblastomzellen untersucht.

Weiters sollte geklärt werden, welche Auswirkungen die pharmakologische Inhibierung des endogenen Sphingolipidmetabolismus auf die Proliferation hat.

Schließlich wurde auch die transkriptionelle Regulation der ABCA1 Expression auf Proteinebene analysiert und der Einfluss von pharmakologischen ABCA1 Inhibitoren auf das Proliferationsverhalten untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Zell-Linie

Die Versuche wurden mit der humanen neuronalen Glioblastom Zell-Linie U87MG durchgeführt. Diese Zell-Linie wurde, neben mehreren anderen von J. Ponten und Mitarbeitern zwischen 1966 und 1969 aus malignen Gliomen isoliert und in Kultur gebracht. Die U87 Zellen stammen aus dem Glioblastom eines 44-jährigen Mannes.

Typisch für diese epithelialen Zellen ist ein Monolayer-Wachstum.⁴¹

3.1.2 Kultivierung

Die Glioblastomzellen wurden in 75cm²-Zellkultur-Flaschen mit 12 ml Dulbecco's Modified Eagles Medium – high Glucose, das mit 10% Fetalem Kälberserum (FCS) und 2% Penicillin und Streptomycin (P/S) versetzt worden ist, kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und mit einem CO₂-Gehalt von 5%. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage ausgewechselt.

3.1.3 Subkultivierung

3.1.3.1 Passagieren

Abhängig von der Konfluenz des Monolayers erfolgte das Passagieren ein- bis zweimal pro Woche. Dazu wurde zuerst, nach der Entfernung des Mediums, der Zellrasen zweimal mit je 10 ml PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden 2 ml Trypsin dazupipettiert. Nach mikroskopischer Kontrolle der Zellablösung vom Boden der Zellkultur-Flasche wurde das Suspensat zur Neutralisation der Trypsin-Reaktion mit 2 ml Medium versetzt. Dann wurde das Zellsuspensat, durch Zentrifugieren bei 900 rpm für 4min sedimentiert, der Überstand abgesaugt und durch 10 ml Medium ersetzt. Vor der neuerlichen Aussaat musste das Zellpellet, aufgrund der starken Adhärenz der Zellen, durch mehrmaliges Aufziehen durch eine Nadel (20G*1,5“) ausreichend resuspendiert werden. Anschließend

konnte das Zellsuspensat nach Vorlegen von Medium in eine neue Zellkultur-Flasche überführt werden. Das Splitten erfolgte gewöhnlich in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:10.

3.1.3.2 Ausplattieren

Das Aussäen für die Zellversuche wurde üblicherweise im Rahmen des Passagierens beziehungsweise Splittens durchgeführt. Dabei wurde, wenn für den Versuch eine genaue Zellzahl benötigt worden ist, diese durch die Vermessung von 100µl des Zellsuspensats mittels elektronischen Zellzählers bestimmt. Anschließend wurde das der Zellzahl entsprechende Volumen des Zellsuspensats zum Medium dazugegeben und dieses Gemisch mit einer Pasteurpipette mehrmals resuspendiert. Danach erfolgte die gleichmäßige Aussaat in die 6- oder 12-Well-Platten.

3.2 Zellzahlbestimmung

Alle die Zellproliferation betreffenden Versuche wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt und mehrmals wiederholt.

3.2.1 Allgemeines

Die Zellzahl wurde mit dem elektronischen Zellcounter- und Analysiersystem „Casy TT“ bestimmt. Dieses kann über die Anwendung des Widerstandsprinzips und die Durchführung einer Pulsflächenanalyse die Zellzahl und Größenverteilung einer Probe bestimmen. Dies geschieht mit Hilfe eines elektrischen Feldes. Das Ansaugen einer genau definierten Menge der Zellsuspension über eine Kapillare, die sich in diesem Feld befindet, induziert über die Änderung des elektrischen Widerstandes in diesem System einen elektrischen Puls, der detektiert wird. Die Häufigkeit des Auftretens und der Größe der aufgezeichneten elektrischen Pulse geben Aufschluss über die Anzahl, die Größenverteilung und die Vitalität der Zellen.

3.2.2 Durchführung

Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellrasen zunächst einmal mit je 2 ml PBS-Puffer pro Well gewaschen. Anschließend wurden pro Well 300µl Trypsin dazupipettiert.

Nach kurzer Inkubation und folgender mikroskopischer Kontrolle der Zellablösung vom Gefäßboden, wurde die Trypsinreaktion durch die Zugabe von 700µl Medium pro Well abgestoppt. Nachdem das Zelllysate durch zehnmaliges Aufziehen mittels Pipette resuspendiert worden ist, wurden je 100µl in je 10ml isotonischer Lösung überführt und mit dem elektronischen Zellcounter vermessen.

3.2.2.1 Proliferationsbestimmung: Sphingosin-1-Phosphat – Dose Response

Die Wells der 12-Well-Platten wurden, nachdem pro Well 1 ml Medium (D-MEM, +FCS, +P/S) vorgelegt worden ist, mit einer, mittels elektronischen Zellzählers bestimmten, Zellzahl, je nach Versuch variierend zwischen 40.000 und 100.000 Zellen pro Well, besät. Nachdem die Zellen für 20 Stunden inkubiert worden sind, um ein ausreichendes Anwachsen der Zellen an der Unterlage zu gewährleisten, wurden die Zellen für sechs Stunden serumfrei gesetzt, um durch den Entzug der Wachstumsfaktoren eine Synchronisation der Zellzyklen zu erreichen und um die Sensibilität der Zellen auf das nachfolgende Sphingosin-1-Phosphat zu erhöhen. Es erfolgte dann ein neuerlicher Wechsel des Mediums (D-MEM, -FCS, -P/S) und Sphingosin-1-Phosphat wurde, nach Anfertigung einer Verdünnungsreihe, in den entsprechenden Konzentrationen dazupipettiert.

Sphingosin-1-Phosphat bedurfte aufgrund seiner schlechten Löslichkeit einer besonderen Behandlung. So musste die Sphingosin-1-Phosphat-Lösung, nach der Zugabe von BSA/PBS (4mg/ml) entsprechend der benötigten Stock-Konzentrationen, gevortext, für 30 Sekunden im Ultraschallbad beschallt und anschließend für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert werden. Nach dieser Behandlung war eine ausreichende Löslichkeit gegeben und es konnte nun für die Versuche verwendet oder bei -20°C eingefroren werden.

KONZENTRATION	SUBSTANZ
100nm	S1P
1µM	S1P
10µM	S1P

Tab. 2 Für die Proliferationsbestimmung verwendete Konzentrationen von Sphingosin-1-Phosphat

Sphingosin-1-Phosphat wurde alle 24 Stunden dazupipettiert.

Die Proliferation wurde dann 48, beziehungsweise 72 Stunden nach der ersten Sphingosin-1-Phosphat-Zugabe mit Hilfe des elektronischen Zellcountinggerätes bestimmt.

3.2.2.2 Proliferationsbestimmung nach pharmakologischer Inhibition des Sphingolipidmetabolismus mit und ohne Zugabe von Sphingosin-1-Phosphat

Die Versuche wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Nach Aussaat von je 100.000 Zellen pro Well, wurden diese am folgenden Tag serumfrei gesetzt. Nach sechs Stunden wurde das Medium gewechselt (D-MEM; -FCS, +P/S) und es erfolgte die Zugabe der Inhibitoren beziehungsweise des Sphingosin-1-Phosphats (1 μ M). Sphingosin-1-Phosphat wurde erneut nach 24 und 48 dazupipettiert. 72 Stunden nach der ersten Zugabe des Phospholipids erfolgte die Proliferationsbestimmung.

KONZENTRATIONEN	SUBSTANZEN/WELL
	C
	C+S1P
	DMSO
	DMSO+S1P
	H2O
1 μ M	SKI II
1 μ M	SKI II+S1P
5 μ M	SKI II
5 μ M	SKI II+S1P
100nM	Myriocin
100nM	Myriocin+S1P
1 μ M	Myriocin
1 μ M	Myriocin+S1P
10 μ M	Desipramin
10 μ M	Desipramin+S1P
25 μ M	Fumonisin B1
25 μ M	Fumonisin B1+S1P

Tab. 3 Für die Proliferationsbestimmung verwendete Konzentrationen pharmakologischer Inhibitoren des Sphingolipidmetabolismus

3.3 Auswirkungen natürlicher und synthetischer LXR-Agonisten auf die ABCA1-Expression

3.3.1 Zugabe der LXR-Agonisten

Es wurden nach einer Splittung von 1:20 zwei 6-Well-Platten mit je 500µl Zellsuspensat pro Well ausplattiert. Die Zellen wurden am nächsten Tag in der Früh serumfrei gesetzt. Nach sechs Stunden wurden, verbunden mit einem neuerlichen Mediumwechsel (-FCS; 2ml/Well), die Substanzen dazupipettiert.

KONZENTRATION	SUBSTANZ
10µM	To901317
1µM	S1P
1µM	24-Hydroxy-Cholesterin
1µM	25-Hydroxy-Cholesterin

Tab. 4 Für die Proliferationsbestimmung verwendete Konzentrationen von S1P, sowie synthetischer und natürlicher LXR-Agonisten

3.3.2 Proteinisolation

Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen geerntet.

Die Zellschichten wurden zuerst zweimal mit je 1 ml PBS-Puffer pro Well gewaschen. Anschließend wurden je Well 40µl des mit je 1µl der Proteaseinhibitoren, Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin, versetzten Ripa-Puffers und PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid), einer Verdünnung von 1:100 entsprechend, dazupipettiert. Die Zellen wurden dann mittels Zell-Scraper von der Wachstumsfläche abgelöst, in Eppi-Reaktionsgefäße überführt und anschließend für 10 Minuten auf Eis gestellt. Danach wurden die Zellsuspensionen für 10 Minuten bei 4°C mit 15.000 rpm zentrifugiert. Nach Überführung von je 35µl des Überstandes/Zelllysats in ein anderes Eppi-Reaktionsgefäß

und der Zugabe des Probenpuffers im Verhältnis 1:1 wurden die Proben bei -20°C weggefroren.

3.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford

3.3.3.1 Allgemeines

Um ein gleichmäßiges Auftragen der Proben zu gewährleisten, muss vor der Elektrophorese deren Proteingehalt bestimmt werden. Die Methode nach Bradford basiert auf einer Komplexbildung des Säurefarbstoffs Coomassie-Brillantblau mit Proteinen, die bei niedrigem pH zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 zu 595nm führt. Nach Anfertigung einer Eichkurve kann auf den Proteingehalt der Proben rückgeschlossen werden.

3.3.3.2 Durchführung

Nach 1:5-facher Verdünnung mit Reinstwasser wurde je 1 ml des „BIO RAD Protein Assays“ zu den Zellysatlösungen dazupipettiert und nach 20 Minuten die Absorption mittels Photometer bei 595nm bestimmt.

3.3.4 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

3.3.4.1 Allgemeines

Die Elektrophorese ist ein Verfahren zur Trennung eines Substanzgemisches. Das Prinzip beruht auf der Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Für den Grad der Auftrennung ist dabei neben der angelegten Spannung, der Dauer und dem verwendeten Medium, vor allem die Größe und die Ladung der Teilchen entscheidend.

Prinzipiell kann die Gemischauftrennung in vertikalen oder horizontalen Systemen und in unterschiedlichen Medien erfolgen. Der Vorteil stabilisierender Matrices, also beispielsweise Gelen, gegenüber Lösungen besteht in ihrer antikonvulsiven Wirkung, die eine unvollständige Auftrennung im Sinne einer Dispersion verhindert.

Ein in der Proteinanalytik übliches Verfahren stellt die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese dar. Die Abkürzung SDS steht für das Detergenz Natriumdodecylsulfat

(SDS=Sodium Dodecyl Sulfate), welches durch die Überdeckung der Proteinpolaritäten zur Bildung negativ geladener Oberflächenstrukturen führt. Zusätzlich bewirkt SDS eine Auflösung der sekundären und tertiären Proteinstrukturen und neben der Streckung der Moleküle die Formung typischer ellipsoider Aminosäureketten. Die zusätzlich dem Probenpuffer zugesetzte, reduzierend wirkende Verbindung, Mercaptoethanol spaltet Disulfidbrücken. Diese Denaturierungen bewirken die Angleichung der Ladungsdichten der Moleküle, was dazu führt, dass für die Auftrennung nur noch deren Gewicht entscheidend ist. Die Polyacrylamidgele, die sich durch ihre hohe Stabilität auszeichnen und chemisch inert sind, befinden sich während der Elektrophorese in einer ionischen Pufferlösung. Die Totalacrylamidkonzentration und der Grad der Vernetzung bestimmen die Porengröße des Gels. Die Acrylamidkonzentration eines Gels, also die Größe der „Siebporen“, wird abhängig vom Molekulargewicht der gesuchten beziehungsweise nachzuweisenden Proteine gewählt. Um eine bessere Trennung zu erreichen kann die diskontinuierliche Elektrophorese verwendet werden. Bei dieser erfolgt durch Einsatz eines Sammelgels, vor der eigentlichen Auftrennung der Proteine im Trenngel, eine Aufkonzentrierung der Proben.

Im vertikalen System wird das Gel üblicherweise zwischen zwei Glasplatten hergestellt. Während der Produktion werden mit Hilfe eines Kamms, der als Platzhalter fungiert, Geltaschen für die Auftragung der Proben geschaffen.

3.3.4.2 Durchführung

Für den Nachweis des ATP-Bindungskassetten-Transporters A1 wurde aufgrund seines Molekulargewichts von 220 kD ein 7% Acrylamid-Trenngel angefertigt. Die Proben wurden mit der Hamilton-Spritze entsprechend eines Proteingehalts von 40 µg aufgetragen. Als Standard fungierte der „Protein Marker Page Ruler“. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 130 Volt für zirka 90 Minuten.

3.3.5 Western Blot

3.3.5.1 Allgemeines

Diese Technik wird verwendet, um die aufgetrennten Proteine aus dem Gel für anschließende analytische Schritte zu gewinnen. Dabei werden diese unter dem Einfluss

eines senkrecht zum Gel angelegten elektrischen Feldes von der Polyacrylamidmatrix auf eine so genannte Blotmembran transferiert. Anschließend können die Proteine direkt auf der Membran nachgewiesen werden. Beim Tankblotting werden das Gel und die Membran zwischen zwei Filterpapieren und zwei Schwämmen in eine Kassette eingebaut. Nachdem die Kassette senkrecht in die Kammer gesteckt und der Behälter mit Blotpuffer aufgefüllt worden ist, kann das elektrische Feld angelegt werden. Da im Laufe des Blottings der Ohmsche Widerstand konstant steigt und dies mit einer enormen Wärmeentwicklung einhergeht, muss für eine effiziente Kühlung der Kammer während des Blottingvorganges gesorgt werden.

Für das Blotten können verschiedene Membranen, die sich aufgrund ihrer hydrophilen Oberflächeneigenschaften unterscheiden, verwendet werden.

3.3.5.2 Durchführung

Es wurde eine an das Gel angepasste 9*7cm große Polyvinylidenfluorid-Membran verwendet. Das Blotten erfolgte nach Anlegen einer konstanten Stromstärke von 150 mA für 120 Minuten.

3.3.6 Detektion der Immunreaktion

3.3.6.1 Durchführung

Die Blockade unspezifischer Verbindungen erfolgte durch Inkubation der Membran mit einer 10%-Milchlösung für zwei Stunden.

Anschließend wurde die Membran bei 4°C über Nacht mit dem, 1:1000 in 10%-Milchlösung verdünntem, Anti-ABCA1-Antikörper inkubiert.

Danach wurde die Membran für 20 Minuten mit Waschpuffer gewaschen.

Als Zweitantikörper wurde ein „Goat anti Rabbit“-Antikörper, in einer Verdünnung von 1:1000 in 5%-Milchlösung, verwendet. Die Inkubation erfolgte für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran für zwei Stunden wieder mit Waschpuffer gewaschen.

Die Visualisierung der Immunreaktion erfolgte mit dem ECL+ Western Blotting Detection System.

Als Ladekontrolle diente Actin.

3.3.7 Proliferationsbestimmung nach Zugabe pharmakologischer Antagonisten von ABCA1 und Zugabe von Sphingosin-1-Phosphat

Zuerst wurden in zwei 12-Well-Platten je 40.000 Zellen pro Well ausgesät. Nach 48 Stunden wurden die Zellen serumfrei gesetzt. Sechs Stunden später erfolgte, verbunden mit einem Mediumwechsel (D-MEM, -FCS, +P/S), die Zugabe der pharmakologischen ABCA1-Antagonisten, entsprechend der in der Tabelle angeführten Konzentrationen, sowie des Sphingosin-1-Phosphats in einer Konzentration von 1µM.

KONZENTRATION	SUBSTANZEN/WELL
	C
	VC1 (PBS)
	VC2 (DMSO)
	C+S1P
200µM	Glyburid
	Glyburid+S1P
400µM	DIDS
	DIDS+S1P

Tab. 5 Für die Proliferationsbestimmung verwendete Konzentrationen pharmakologischer Antagonisten des ATP-Bindungskassetten-Transporters A1

Sphingosin-1-Phosphat (1µM) wurde zweimal dazupipettiert. Die erste Zugabe erfolgte gemeinsam mit der Zugabe der Substanzen, die zweite nach 24 Stunden. Die Zellzahlbestimmung wurde 72 Stunden nach der ersten Sphingosin-1-Phosphat-Applikation bestimmt.

4 Ergebnisse – Resultate

4.1 Ziele der Arbeit

Die Ziele der vorliegenden Diplomarbeit waren wie folgt:

- 1) die proliferationsstimulierende Wirkung von Sphingosin-1-Phosphat zu untersuchen,
- 2) die Auswirkungen von pharmakologischen Inhibitoren der endogenen Sphingolipidbiosynthese auf das Proliferationsverhalten zu identifizieren,
- 3) das Expressionsmuster von ABCA1 unter Kontrollbedingungen und in der Gegenwart von LXR-Liganden zu quantifizieren, und
- 4) die Auswirkungen von pharmakologischen ABCA1-Inhibitoren auf das Proliferationsverhalten von humanen Glioblastomzellen aufzuklären.

4.2 S1P stimuliert die Proliferation von U87 Zellen

In ersten Vorversuchen wurden experimentelle Bedingungen identifiziert unter denen ein möglichst ausgeprägter Effekt von S1P auf die Proliferation von U87 Zellen eintritt.

Während dieser Experimente wurden die Zellen entweder direkt nach dem Wechsel in serumfreies Medium oder 2 Tage nach Kultivierung in serumfreiem Medium mittels S1P, das jeden Tag frisch zugesetzt worden ist, in ihrem Wachstum stimuliert.

Auch die Auswirkungen des Lösungsvermittlers für S1P (BSA/PBS) wurden untersucht (Vehikelkontrollen).

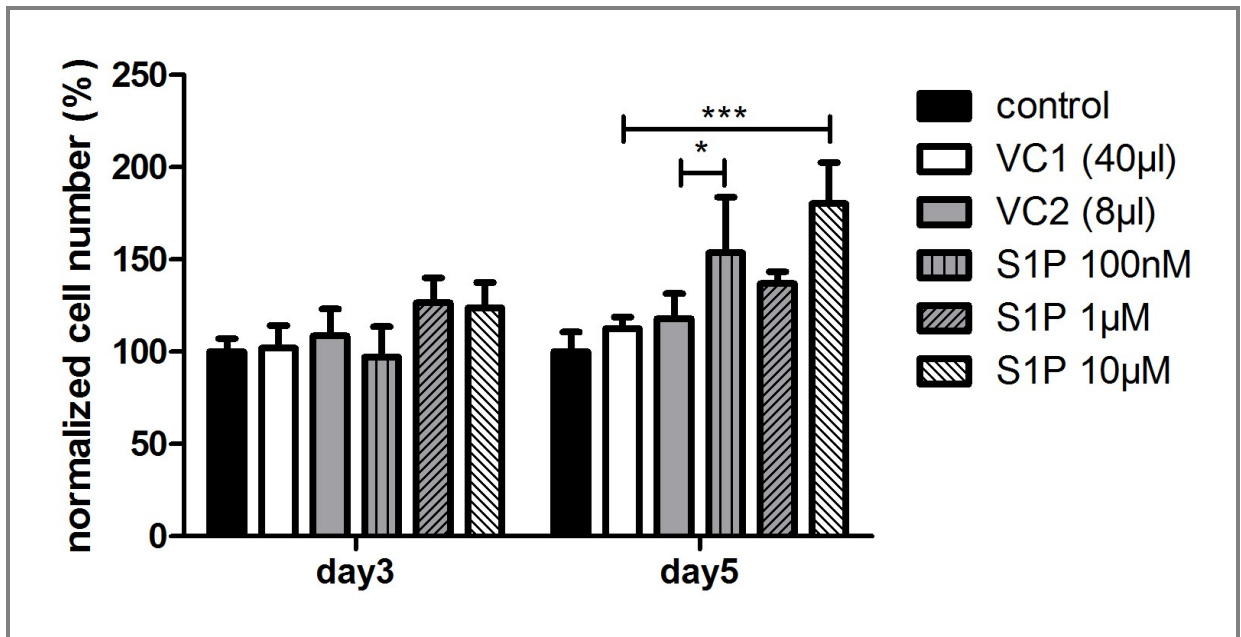


Abb. 11: Einfluss von exogen zugesetztem S1P auf das Zellwachstum von U87 Zellen

Je nach Versuchsanordnung wurden 40.000, 60.000 oder 100.000 Zellen am Tag null auf 12-Well ausplattiert, am nächsten Tag serumfrei gesetzt und dann mit den angegebenen Konzentrationen an BSA-gebundenem S1P stimuliert. S1P wurde alle 24 Stunden zugegeben, 3 bzw. 5 Tage nach dem Ausplattieren wurden die Zellen trypsinisiert und am Cell Counter gezählt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte +/- SD eines repräsentativen Experiments, das in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Die Resultate dieser Untersuchungen ergeben (Abb. 11), dass U87 Zellen durch zweimalige Zugabe von Sphingosin-1-Phosphat direkt nach dem Wechsel in serumfreies Medium und Zellzahlbestimmung am Tag drei, gezählt ab Kultivierung unter serumfreien Bedingungen, nicht zu einer signifikanten Proliferation angeregt werden. Bei der Messung am Tag 5 konnte ein signifikanter 1,5-facher (100 nM S1P) beziehungsweise 1,7-facher (10 µM S1P) Anstieg der Zellzahl festgestellt werden (Abb. 11).

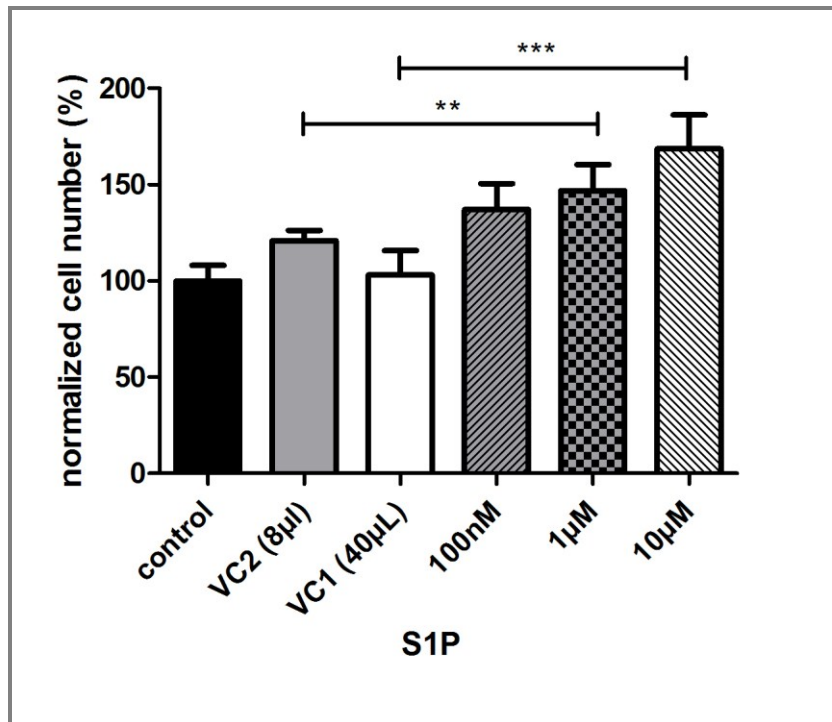


Abb. 12 Einfluss von exogen zugesetztem S1P unter serumfreien Bedingungen auf das Zellwachstum von U87 Zellen

Es wurden 40.000 Zellen am Tag null auf 12-Wellen ausplattiert, 2 Tage serumfrei kultiviert und anschließend mit den angegebenen Konzentrationen an BSA-gebundenem S1P stimuliert. S1P wurde alle 24 Stunden zugegeben. 5 Tage nach dem Ausplattieren wurden die Zellen trypsinisiert und am Cell Counter gezählt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines repräsentativen Experiments, das in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Erfolgte die Zellzahlbestimmung hingegen nach initialer 48-stündiger Inkubation der Zellkulturen in serumfreiem Medium und anschließender zweimaliger Zugabe von S1P, konnte am Tag 5 ein signifikanter 1,5-facher (1 μ M S1P) beziehungsweise 1,7-facher (10 μ M S1P) Anstieg der Zellzahl festgestellt werden (Abb. 12).

4.3 Pharmakologische Antagonisten der Sphingolipidbiosynthese sind potente Inhibitoren der Zellproliferation

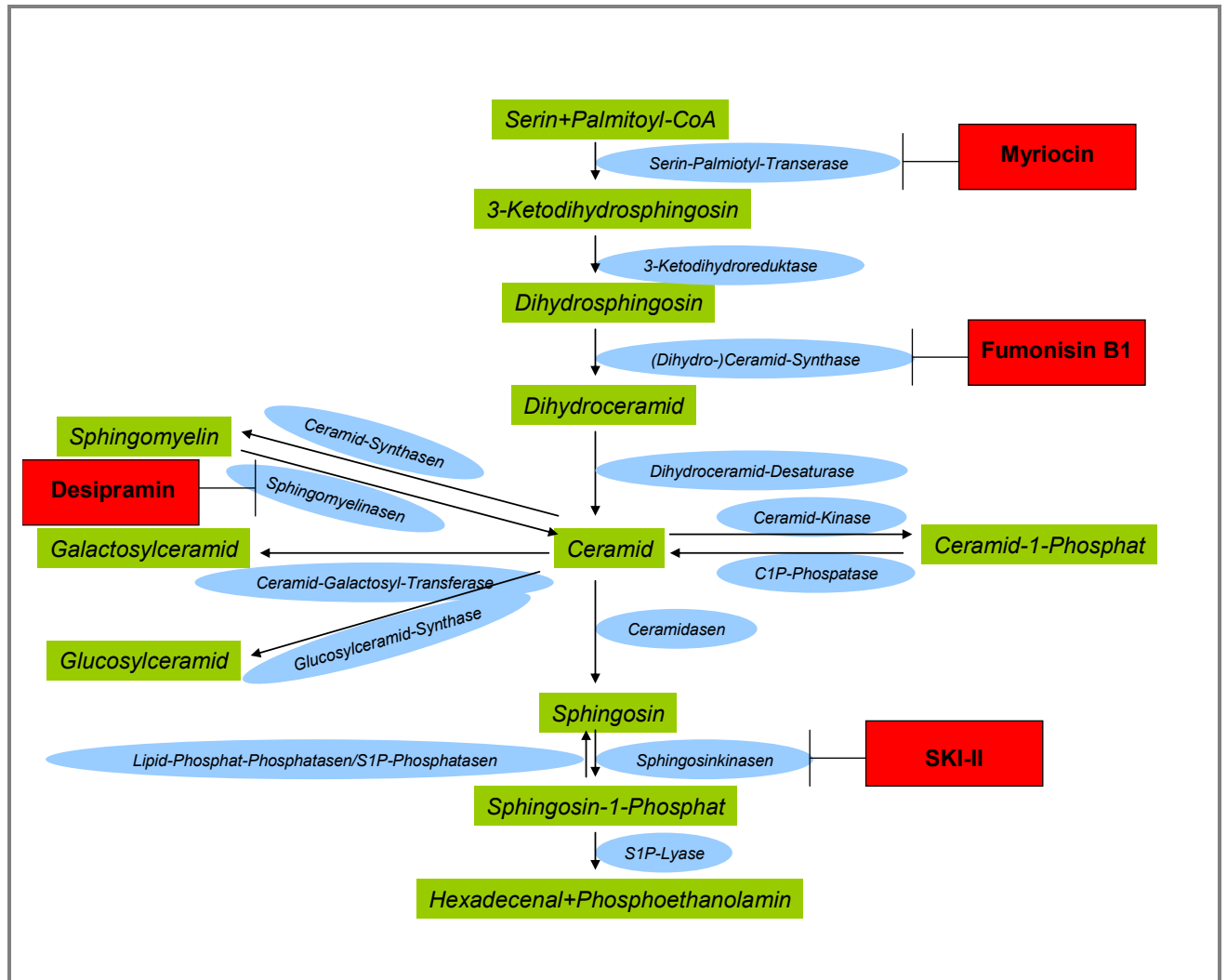


Abb. 13 Schematische Darstellung der Angriffspunkte der Inhibitoren im endogenen Sphingolipidmetabolismus

Um zu untersuchen wie pharmakologische Inhibitoren, die an unterschiedlichen Stellen des S1P-Metabolismus eingreifen, die Proliferationsraten beeinflussen, wurden die Zellzahlen in Ab- und Anwesenheit der einzelnen Antagonisten bestimmt. Dazu wurden 100.000 Zellen ausgesät und unter serumfreien Bedingungen auf 12-Well-Platten kultiviert. Die Zugabe des jeweiligen Inhibitors entsprechend der angegebenen Konzentrationen erfolgte in Verbindung mit einer Erneuerung des serumfreien Mediums. Die Zellzahl wurde nach 72 Stunden bestimmt.

4.3.1 Sphingosinkinase-Inhibitor I-II

In diesen Versuchen zeigt sich deutlich und hochsignifikant die antiproliferative Wirkung des Sphingosinkinase-Inhibitors I-II (SKI-II) (Abb. 14). Bei Verwendung der Substanz in einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ konnte eine Abnahme der Zellzahl um 40% festgestellt werden. Eine Erhöhung der Konzentration führte dazu, dass dieser Effekt noch deutlicher zu Tage trat. Wie in Abb. 14 ersichtlich, wurde die Zellzahl bei Zugabe des Inhibitors in einer Konzentration von $5\mu\text{M}$ um 75% vermindert.

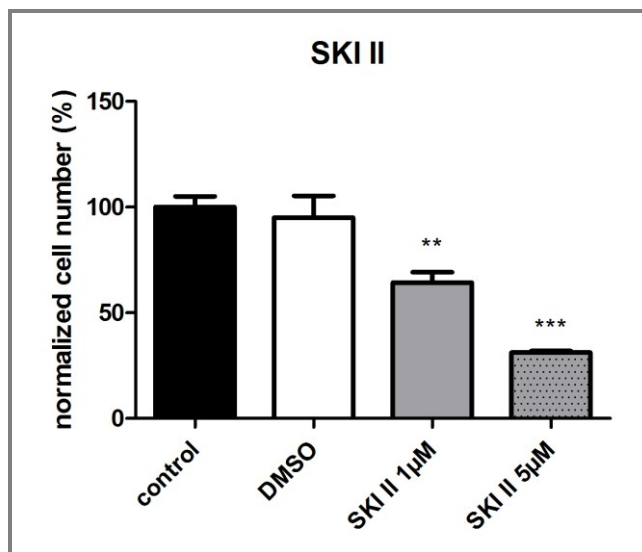


Abb. 14: Einfluss von SK I-II auf das Zellwachstum von U87 Zellen.

100.000 Zellen wurden auf 12-Well ausplattiert, für 24 Stunden serumfrei kultiviert und dann in Gegenwart von SK I-II unter den beschriebenen Bedingungen für 3 Tage inkubiert. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines repräsentativen Experiments, das in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.3.2 Myriocin

Bei Myriocin konnten wir ebenfalls in allen verwendeten Konzentration eine signifikante Abnahme der Zellproliferation feststellen (Abb. 15): Bei Konzentration von $0,1\mu\text{M}$ sank die Zellzahl auf 65% des Ausgangswertes. Eine Inkubation der Zellkulturen mit $1\mu\text{M}$ Myriocin führte zu einer Zellzahl-Reduktion auf 50%. Die Inkubation mit $10\mu\text{M}$ bewirkte eine Abnahme der Zellzahl auf 67% und bei Verwendung von Myriocin in einer Konzentration von $50\mu\text{M}$ reduzierte sich die Zellzahl auf 45% des normalisierten Ausgangswertes.

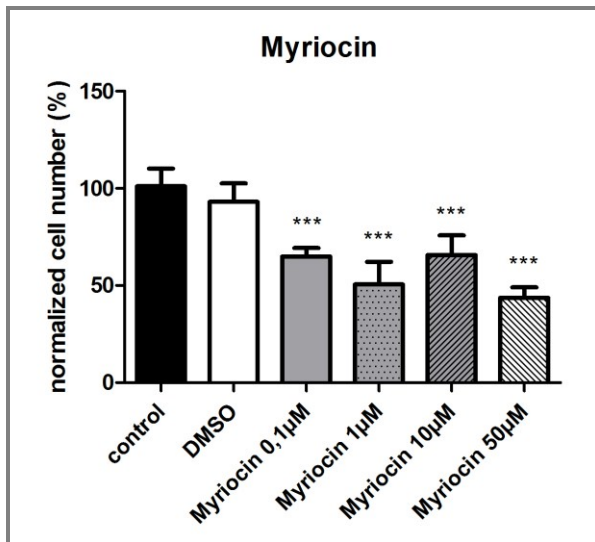


Abb. 15 Einfluss von Myriocin auf das Zellwachstum von U87 Zellen.

100.000 Zellen wurden auf 12-Wellns ausplattiert, für 24 Stunden serumfrei kultiviert und dann in Gegenwart von Myriocin unter den beschriebenen Bedingungen für 3 Tage inkubiert. Die Ergebnisse sind Mittelwerte +/- SD eines repräsentativen Experiments, das in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.3.3 Desipramin

In diesen Versuchen (Abb. 16) zeigt sich, dass Desipramin in einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ keine signifikanten Änderungen der Zellzahl bewirkte. Bei einer Steigerung der Konzentration auf das 5-, beziehungsweise 10-fache ergab sich eine signifikante Reduktion der Zellproliferation: Bei Einsatz der Substanz in einer Konzentration von $5\mu\text{M}$ maßen wir eine Abnahme der Zellzahl um 30%, bei Zugabe von Desipramin in einer Konzentration von $10\mu\text{M}$ eine Abnahme um 60%.

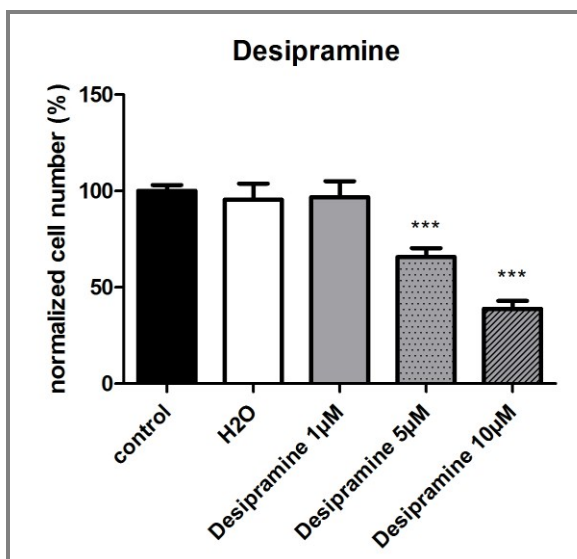


Abb. 16 Einfluss von Desipramin auf das Zellwachstum von U87.

Zellen 100.000 Zellen wurden auf 12-Wells ausplattiert, für 24 Stunden serumfrei kultiviert und dann in Gegenwart von Desipramin unter den beschriebenen Bedingungen für 3 Tage inkubiert. Die Ergebnisse sind Mittelwerte +/- SD eines repräsentativen Experiments, das in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.3.4 Fumonisin B1

Die Resultate dieser Versuche (Abb. 17) zeigen, dass Fumonisin B1 weder in einer Konzentration von $1\mu\text{M}$, noch in einer Konzentration von $5\mu\text{M}$, signifikant die Proliferation beeinflusst. Die Inkubation der Zellkulturen mit dem Inhibitor in einer Konzentration von $10\mu\text{M}$ bewirkte eine Verminderung der Zellzahl auf 78% des Ausgangswertes.

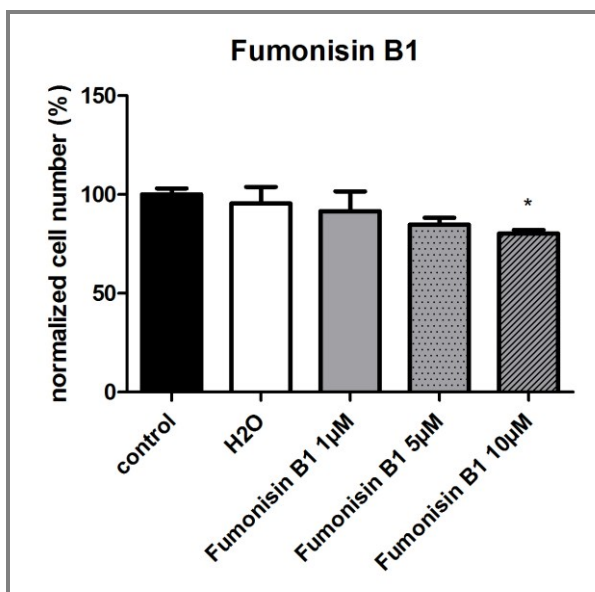


Abb. 17 Einfluss von Fumonisin B1 auf das Zellwachstum von U87 Zellen.

100.000 Zellen wurden auf 12-Wells ausplattiert, für 24 Stunden serumfrei kultiviert und dann in Gegenwart von Fumonisin B1 unter den beschriebenen Bedingungen für 3 Tage inkubiert. Die Ergebnisse sind Mittelwerte +/- SD eines repräsentativen Experiments, das in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.3.5 GW4968

In den Versuchen (Abb. 18) mit dieser Substanz ergab sich bei Einsatz von $1\mu\text{M}$ eine signifikanter Anstieg der Zellzahl um 10%. Auch bei Verwendung von GW4968 in einer Konzentration von $5\mu\text{M}$ zeigte sich ein leichter, nicht signifikanter Anstieg der Zellzahl. Bei Inkubation der Zellkulturen mit GW4968 in einer Konzentration von $10\mu\text{M}$, stellten war eine Abnahme der Zellzahl um 60% zu messen.

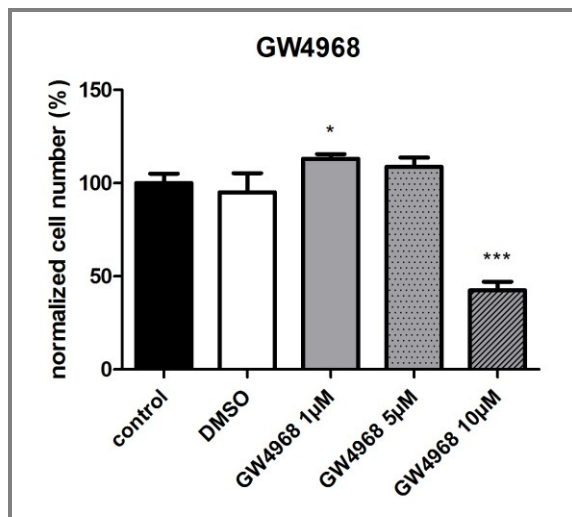


Abb. 18 Einfluss von GW4968 auf das Zellwachstum von U87 Zellen.

100.000 Zellen wurden auf 12-Wellen ausplattiert, für 24 Stunden serumfrei kultiviert und dann in Gegenwart von GW4968 unter den beschriebenen Bedingungen für 3 Tage inkubiert. Die Ergebnisse sind Mittelwerte +/- SD eines repräsentativen Experiments, das in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Die Resultate dieser Inhibitorstudien zeigen, dass die Inhibierung der endogenen Sphingolipidsynthese mit pharmakologischen Antagonisten – teils ausgeprägte, signifikante dosisabhängige – antiproliferative Effekte auf Glioblastomzellen hat. Die ausgeprägtesten Effekte auf das Proliferationsverhalten ergaben sich bei Versuchen mit dem Sphingosinkinase-Inhibitor I-II. Dieser führte in den eingesetzten Konzentrationen zu einer Reduktion des Tumorzellwachstums um 60 (1 μM) und 75 (10 μM)%. (Abb. 14).

4.4 Exogen zugesetztes S1P kann den proliferativen Block der Antagonisten teilweise aufheben

In den oben gezeigten Versuchen stellte sich heraus, dass die alleinige Inkubation der Zellkulturen mit Inhibitoren der endogenen Sphingolipidbiosynthese, zu einer deutlichen Abnahme der Zellproliferation um bis zu 75% führte.

Nun sollte untersucht werden, ob es gelingt, diese Proliferationsblockade durch die Supplementierung der Zellen mit exogen zugesetztem S1P zu umgehen. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich (Abb. 19), dass die dreimalige Zugabe von Sphingosin-1-Phosphat nach Präinkubation der Zellkulturen mit den Inhibitoren einen signifikanten

Anstieg der Zellzahlen, teils sogar über die normalisierte Zellzahl der nicht mit S1P-versetzten Kontrollen hinaus, bewirkte.

Der Sphingosinkinase-Inhibitor I-II bewirkte in der Konzentration von 1 μ M initial eine Reduktion der Zellzahl um 38% des Ausgangswertes. Bei Inkubation der Zellen mit Sphingosin-1-Phosphat zeigte sich eine etwas höhere Zellzahl von 68%. Wie in Abb. 19 ersichtlich konnte der durch 5 μ M SK I-II bewirkte antiproliferative Effekt, der sich in einer Reduktion der Zellzahl um 74% äußerte, durch Sphingosin-1-Phosphat, welches eine Steigerung der Zellzahl auf 36% des Ausgangswertes bewirkte, abgemildert werden.

Der Versuch zeigte weiters, dass die durch 100 nM Myriocin bewirkte Hemmung des Zellwachstums mit einer Reduktion der Zellzahl auf 90%, nach dem Zusetzen von S1P aufgehoben wurde, und die Zellzahl auf das 1,2-fache der Kontrollzellzahl anstieg. Myriocin in einer Konzentration von 1 μ M bewirkte eine Abnahme der Zellzahl um 30%. Das exogen zugesetzte Spingosin-1-Phosphat führte zu einer leichten Steigerung der Zellzahl auf das 1,05-fache der Kontrollzellzahl.

Die Versuche mit dem Inhibitor Desipramin in einer Konzentration von 10 μ M zeigten eine signifikante Zellzahl-Reduktion auf 40%. Nach Zugabe von Spingosin-1-Phosphat wiesen die untersuchten Zellkulturen eine Zellzahl auf, die dem 0,62-fachen des Kontrollwertes entsprach.

Die Resultate dieses Versuches ergaben, dass Fumonisin B1 in einer Konzentration von 25 μ M zu einer Abnahme der Zellzahl um 25% führt. Exogen zugesetztes Spingosin-1-Phosphat bewirkte, verglichen mit dem Ausgangswert, eine 1,4-fach erhöhte Zellzahl.

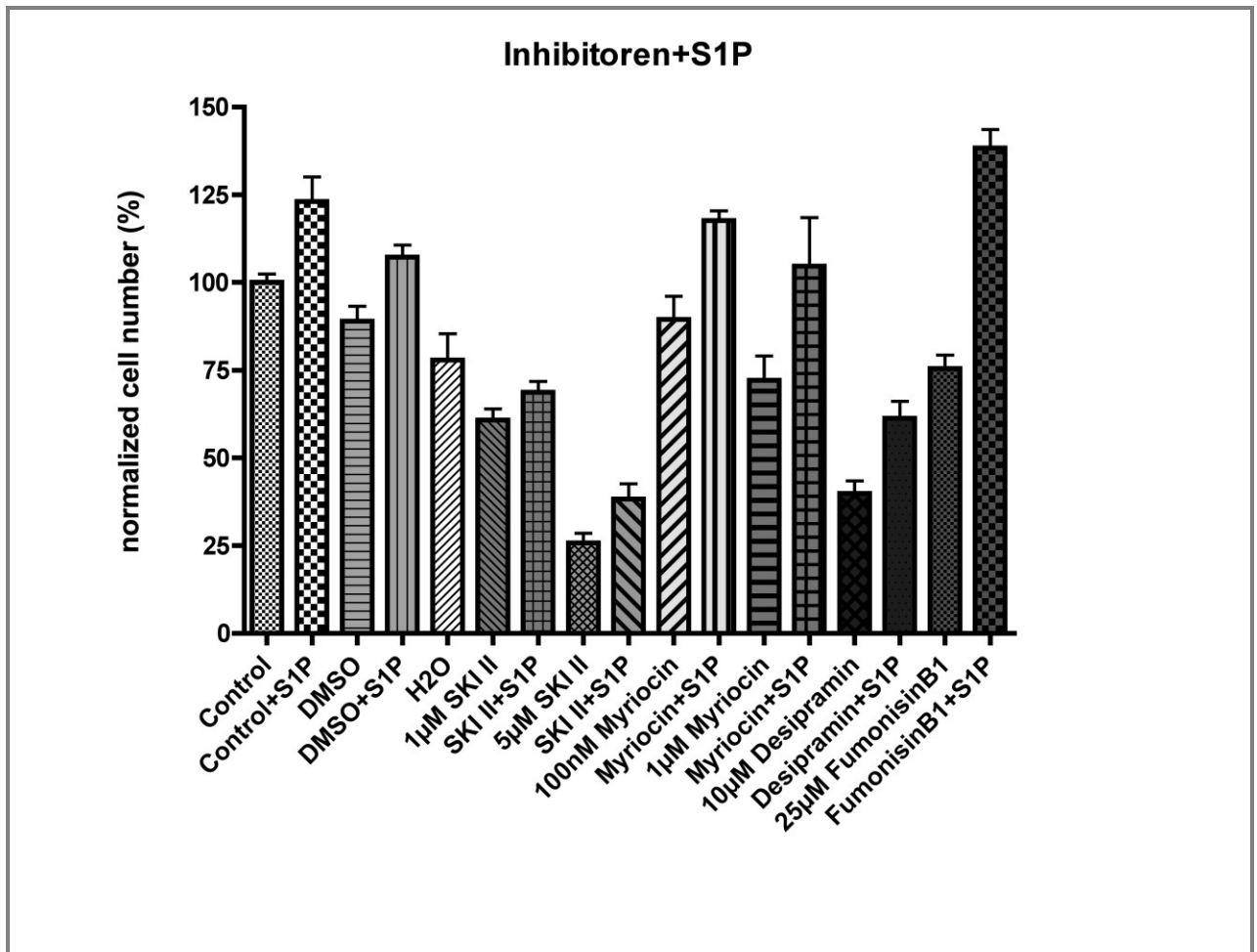


Abb. 19 Einfluss von exogenem S1P auf das Zellwachstum von U87 Zellen in der Gegenwart von pharmakologischen Antagonisten der Sphingolipidbiosynthese.

Kontrollzellen und Inhibitor-behandelte Zellen wurden insgesamt für 3 Tage mit 1µM S1P, welches initial, sowie nach 24 und 48 Stunden zugesetzt worden ist, inkubiert. Anschließend wurde die Zellzahl mit dem Zellcounter- und Analysesystem „Casy TT“ bestimmt. Die Ergebnisse (Mittelwerte +/- SD) stammen aus einem repräsentativen Experiment, das in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde. * p<0,05, ** p<0,01.

4.5 Synthetische und natürliche LXR-Liganden stimulieren die Expression von ABCA1

Wie in der Einleitung angemerkt, wird die Expression von ABCA1 durch LXR Agonisten transkriptionell aufreguliert. In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob U87 Zellen den ATP-Bindungskassetten-Transporter A1 exprimieren und ob dessen Expression durch LXR-Liganden stimuliert werden kann.

Dazu wurden die Zellkulturen 24 Stunden nach der Aussaat in 6-Well-Platten für 6 Stunden serumfrei gesetzt und über Nacht mit den Substanzen, in den entsprechenden

Konzentrationen, inkubiert. Danach erfolgten die Zellyse und anschließend die Lysatauftrennung mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese unter Verwendung eines 7% Acrylamid-Trenngels. Nach dem elektrophoretischen Transfer der Proteine auf eine Polyvinylidenfluoridmembran wurde immunreaktiver ABCA1 mit Anti-ABCA1-Antikörper (1:1000-fach in 10%-Milchlösung verdünnt) detektiert. Als Sekundärantikörper wurde HRP-markierter „Goat anti Rabbit“-Antikörper (1:1000-fach in 5% Milchlösung verdünnt) verwendet. ABCA1 wurde beim erwarteten Molekulargewicht von 220 kDa detektiert. Die Visualisierung der Banden erfolgte mit dem ECL+ Western Blotting System. Actin diente als Ladekontrolle.

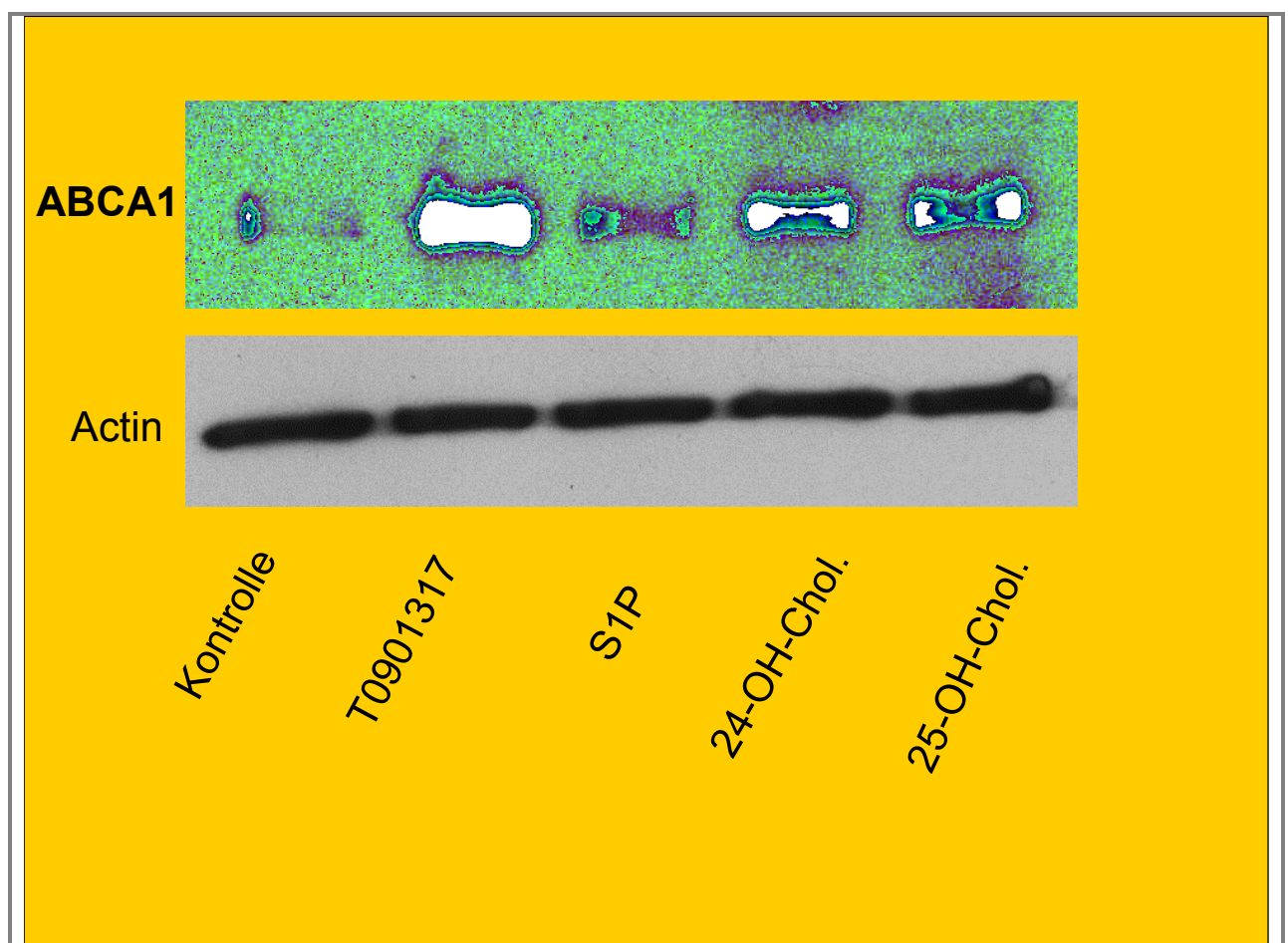


Abb. 20 LXR Agonisten regulieren die Expression von ABCA1 in U87 Zellen.

Die Zellen wurden in Gegenwart von natürlichen (24- und 25-Hydroxycholesterin) und einem synthetischen (T0 901317, 10 μ M) LXR-Agonisten, bzw. 1 μ M S1P vorinkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen lysiert, die Lysate mittels SDS-PAGE (7%) aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und immunreaktiver ABCA1 mittels eines Anti-ABCA1-Antikörpers (Verdünnung 1:1000, 10% Milchlösung) detektiert. Als Sekundärantikörper wurde HRP-markierter „goatXrabbit“-Antikörper (Verdünnung 1:1000, 5% Milchlösung) verwendet. Die Banden wurden mittels ECL+-Reaktion visualisiert.

Die Resultate dieses Versuchs (Abb. 20) ergeben, dass U87 Zellen den ATP-Bindungskassetten-Transporter A1 unter basalen Bedingungen exprimieren.

Sowohl die von uns verwendeten synthetischen als auch die natürlichen LXR-Liganden bewirkten eine Stimulation der Proteinexpression. Der synthetische Ligand T0901317 führte zu einer 22-fachen Erhöhung der Proteinexpression. Bei den natürlichen Liganden, 24- und 25-Hydroxycholesterin, zeigte sich eine Zunahme der Expression um das 9- beziehungsweise 8-fache im Vergleich zur basalen ABCA1-Expression. Bei der Inkubation der Zellkulturen mit dem bioaktiven Phospholipid Sphingosin-1-Phosphat war eine zweifach erhöhte ABCA1-Expression festzustellen.

4.6 Auswirkungen von pharmakologischen Inhibitoren von ABCA1 auf die Proliferation von U87 Zellen

Nach serumfreier Inkubation der in 12-Well-Platten ausgesäten Zellen für sechs Stunden wurden diese für drei Tage mit den pharmakologischen ABCA1-Inhibitoren Glyburide (200 μ M) und DIDS (400 μ M) in der An- und Abwesenheit von Sphingosin-1-Phosphat (1 μ M) kultiviert. Sphingosin-1-Phosphat wurde initial und nach 24 beziehungsweise 48 Stunden zugesetzt. 3 Tage nach Behandlung der Zellen mit den Substanzen wurde die Zellzahl bestimmt.

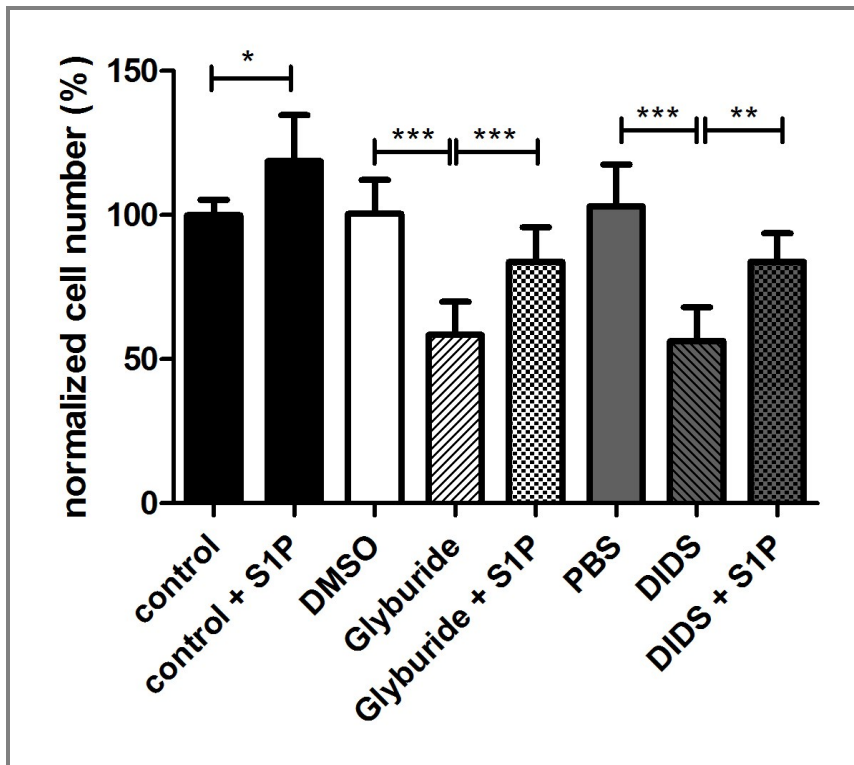


Abb. 21 Einfluss von Glyburide und DIDS auf das Zellwachstum von U87 Zellen.

Kontrollzellen und Inhibitor-behandelte Zellen wurden für 3 Tage in der Gegenwart von 200 μM Glyburide und 400 μM DIDS in der An- und Abwesenheit von exogen zugesetztem S1P (1 μM) kultiviert. Nach 3 Tagen wurden die Zellzahlen mit dem Zellcounter- und Analysesystem „Casy TT“ bestimmt. Die Ergebnisse (Mittelwerte \pm SD) stammen aus einem repräsentativen Experiment, das in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ *** $p < 0.001$.

Die Resultate dieses Versuchs zeigen einen deutlichen antiproliferativen Effekt der ABCA1-Antagonisten bei U87 Zellen. Wie in Abb. 21 ersichtlich bewirkte Glyburide eine signifikante Abnahme der Zellzahl um 40%. Mit Sphingosin-1-Phosphat war eine Abmilderung dieses Effektes, resultierend in einer signifikanten Steigerung der Zellzahl auf 80% des Ausgangswertes festzustellen.

Auch DIDS führte zu einer signifikante Reduktion der Zellzahl um 40% und auch hier zeigte sich bei Kultivierung der Zellkulturen mit exogen zugesetztem Sphingosin-1-Phosphat eine Abnahme der antiproliferativen Wirkung des ABCA1-Antagonisten auf die Zellzahl. Nach Zugabe von Sphingosin-1-Phosphat war eine auf das 0,8-fache des Vehikelkontrollwertes verminderte Zellzahl zu messen.

5 Diskussion

Das Glioblastoma Multiforme gilt als der häufigste primäre Tumor des zentralen Nervensystems bei Erwachsenen. Trotz maximaler Ausschöpfung des multimodalen Therapieansatzes, der Operation, Radiatio und Chemotherapie mit Temozolamid umfasst, liegt die mittlere Überlebenszeit bei diesen Patienten nach Diagnosestellung bei 15 Monaten.⁴² Diese geringe Überlebensrate ist auf die typischen Eigenschaften dieses Malignoms, die eine ausgeprägte Proliferation und die Neigung zur diffusen Infiltration umfassen, zurückzuführen.⁴³

Als eine der Ursachen für diese und eine Vielzahl weiterer typischer Eigenschaften maligner Zellen konnte ein dysregulierter Sphingolipidmetabolismus gefunden werden.

Sphingosin-1-Phosphat reguliert nicht nur die zelluläre Proliferation, die Migration und das Überleben, sondern beeinflusst darüber hinaus beispielsweise auch die Angiogenese, die Inflammation und vaskuläre Permeabilität.^{44, 45, 46} Diese Effekte von S1P werden über die fünf, an der Zelloberfläche lokalisierten, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren S1PR1 – S1PR5 vermittelt. Die Rezeptor-Liganden-Bindung führt zu einer Aktivierung spezifischer Signalmoleküle mitogener und antiapoptotischer Signaltransduktionswege, die von zentraler Bedeutung für die Tumorbilogie sind.^{8, 47}

Es zeigte sich, dass ein Überwiegen des Lysophospholipids Sphingosin-1-Phosphat im Sphingolipid-Rheostat-Modell in der Tumorgenese einen Überlebensvorteil der malignen Zellen bewirkt.⁴⁸

Aus bereits vorliegenden, publizierten Arbeiten ist bekannt, dass die spezifischen Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren S1PR1, S1PR2, S1PR3 und S1PR5 und Sphingosin-1-Phosphat metabolisierende Enzyme in Glioblastomzelllinien, unter anderem auch von den U87 Zellen, exprimiert werden.^{49, 50, 51} Forschungsergebnisse zeigen, dass die für die Tumorgenese beim Glioblastom entscheidenden Faktoren, wie Wachstum, Migration und Invasion, durch Sphingosin-1-Phosphat mittels Inside-Out- beziehungsweise Outside-In-Signalling reguliert werden.¹⁶

Basierend auf diesen Erfahrungen war es Ziel dieser Arbeit, die Einflüsse des endogenen Sphingolipidmetabolismus und des Sphingosin-1-Phosphat-Exports auf die Glioblastomzellproliferation zu untersuchen.

Die Resultate der durchgeführten Experimente zeigen deutlich, dass eine Stimulation von U87 Zellen mit exogen zugesetztem Sphingosin-1-Phosphat zu einer signifikanten Erhöhung der Proliferationsraten dieser Zellen führt. Dieses Ergebnis deckt sich mit früheren Forschungsergebnissen, die Sphingosin-1-Phosphat als potentes Glioblastom-Mitogen darstellen und es auch für eine erhöhte Glioblastom-Invasivität verantwortlich machen.^{52, 53, 54, 55, 56} Diese wachstumsfördernde Wirkung erzielt das bioaktive Lysophospholipid vor allem durch S1PR1.⁸ Die Rezeptoraktivierung durch S1P bewirkt nachfolgend eine Aktivierung des Mitogen-aktivierten-Proteinkinase Signalweges, woraus schlussendlich über die Regulation von Cyclin D1 eine Zellzyklusprogression und gesteigerte Proliferation resultieren.⁵⁷

Interessanterweise zeigte sich in unseren Proliferationsstudien (Abb.11, Abb. 12), dass die sofortige Zugabe von Sphingosin-1-Phosphat nach nur sechsständiger serumfreier Präkultivierung der Zellen und Bestimmung der Zellzahl am Tag 3 zu keiner signifikanten Änderung der Zellzahl führt. Wurden die Zellen hingegen für 48 Stunden vor der S1P-Zugabe serumfrei präkultiviert und anschließend wieder am Tag 3 nach S1P-Applikation gezählt, konnte bei Verwendung physiologischer S1P-Konzentrationen eine Proliferationssteigerung festgestellt werden.

Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass ein Zusammenhang zwischen der Dauer der serumfreien Kultivierung und der Stärke des proliferationsfördernden Effekts von S1P besteht. Da die genaue Zusammensetzung des fetalen Kälberserums (FCS) nicht bekannt ist, vermuten wir, dass es neben einer Reihe anderer, teils bekannter Wachstumsfaktoren auch einen gewissen Gehalt an Sphingosin-1-Phosphat aufweist, das den Zellen als zusätzliche Quelle zur Verfügung steht. Diese Vermutung wird von Publikationen unterstützt, die zeigten, dass der S1P-Gehalt in fetalem Kälberserum ca. 150 pmol/mg Protein beträgt.⁵⁸ Diese Resultate lassen vermuten, dass es durch eine serumfreie Zeitspanne von nur sechs Stunden nicht gelingt, die Zellen in einen Zustand des Wachstumsfaktormangels zu bringen und so ihre Sensitivität für das exogen zugesetzte Sphingosin-1-Phosphat zu steigern.

Klinisch experimentelle Studien, die untersuchten, ob ein Zusammenhang zwischen den proliferativen Wirkungen von Sphingosin-1-Phosphat und den Überlebensraten von Glioblastompatienten besteht, ergaben, dass ein hohes Expressionslevel der Sphingosinkinase 1, also des S1P-produzierenden Enzyms, mit einer verminderten Überlebensrate korreliert.⁴⁹ Es konnte aber weder für S1P selbst, noch für einen der fünf spezifischen Rezeptoren, ein Zusammenhang mit den Überlebensraten der Patienten

gefunden werden. Diesen fehlenden Zusammenhang erklärt man sich dadurch, dass die Rezeptoren nicht jeder für sich isoliert wirken, sondern S1P über die verschiedenen Rezeptoren simultane oder additive Effekte auszulösen vermag. Weiters unterscheiden sich die Expressionsraten der S1P-Rezeptoren auch innerhalb der Patientengruppen.⁵⁹

Auch Resultate eines Experiments, in dem die S1P-Wirkungen auf Rezeptorebene beleuchtet worden sind, werfen neue Fragen auf, denn in diesem Versuch zeigte sich, dass auch geringe Expressionslevel des als proliferationsfördernden Rezeptor bekannten S1PR1 die Malignität und Proliferation von Glioblastomzellen zu steigern vermögen.⁵⁰ Dieses Ergebnis zeigt, dass die extrazellulären Wirkmechanismen von S1P doch nicht so eindeutig zu sein scheinen und das dieses Gebiet Gegenstand zukünftiger Forschungsarbeiten sein muss.

Eine weitere Möglichkeit, das Wachstum der Glioblastomzellen zu beeinflussen, besteht in der Inhibierung des endogenen Sphingolipidmetabolismus.

In den Inhibitorstudien konnten wir zeigen (Abb. 14-18), dass alle von uns verwendeten pharmakologischen Antagonisten eine signifikante Proliferationshemmung der U 87 Zellen bewirkten.

Die ausgeprägtesten antiproliferativen Effekte verursachte der Sphingosinkinase-Inhibitor I-II, der zu einer Reduktion der Zellzahl auf 25% des Ausgangswertes führte.

SK I-II hemmt die Sphingosinkinase 1, die sich in inaktiver Form im Cytosol befindet und nach Aktivierung durch ERK1/2-vermittelte Phosphorylierung zur Zellmembran transloziert.

Die ausgeprägte Proliferationshemmung durch den Kinaseinhibitor kann man sich dadurch erklären, dass die nicht-kompetitive Hemmung des Enzyms zu einer sehr spezifischen Blockade der endogenen S1P-Produktion führt. Forschungsergebnisse genetischer Studien zur Identifizierung von Enzymen, die mit dem Krebszellüberleben assoziiert sind, führten zur Einstufung der Sphingosinkinasen 1 und 2 als für das Glioblastomzellüberleben relevant (sogenannte „Überlebenskinasen“).⁶⁰

Dieses Resultat wird durch Ergebnisse anderer Arbeiten bestätigt, die zeigen, dass in Glioblastomzellen häufig eine Überexpression der Sphingosinkinase 1 beobachtet werden kann. Die Überexpression des Enzyms korreliert bei den betroffenen Patienten mit einer Reduktion der mittleren Überlebenszeit von durchschnittlich 357 auf 102 Tage.⁴⁹ Aufgrund dieser Erkenntnisse verwundert es nicht, dass sich die Hemmung dieses für

Glioblastomzellen lebensnotwendigen Enzyms durch den spezifischen Inhibitor SK I-II in unseren Versuchen durch die ausgeprägteste Proliferationshemmung äußerte.

Myriocin, ein aus dem Pilz *Isaria sinclairii* stammendes S1P-Analogon, wird aufgrund seiner antiinflammatorischen Wirkungen in synthetischer Form als Fingolimod in der Behandlung der Multiplen Sklerose eingesetzt. Myriocin blockiert durch Hemmung der im Endoplasmatischen Retikulum lokalisierten und ihre katalytische Aktivität im Cytosol entfaltenden Serin-Palmitoyl-Transferase, den ersten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Sphingolipidmetabolismus.

In den Versuchen mit Myriocin konnten wir eine Abnahme der Zellzahl auf 45% zeigen. Eine von einer anderen Forschungsgruppe durchgeführte Studie, die in-vivo-Versuche mit Myriocin beinhaltete und den Effekt des Inhibitors auf das Melanomwachstum untersuchte, erbrachte ähnliche Ergebnisse: Intradermal oder intraperitoneal appliziertes Myriocin führte im Maus-Modell durch Blockierung der de novo Synthese zu einem deutlich reduzierten Sphingolipidgehalt nicht nur im Serum und der Leber, sondern auch im Tumorgewebe. Diese Inhibierung des endogenen Sphingolipidmetabolismus führte sowohl zu einer verminderten Expression der Cyclin-abhängigen Kinase 25C als auch zu einer gesteigerten Expression von p53 und p21, woraus eine signifikante Suppression des Melanomwachstums resultierte.⁶¹

Ein weiterer Antagonist, der sich im klinischen Einsatz befindet, stellt das trizyklische Antidepressivum Desipramin dar. Das amphiphile Molekül bewirkt eine proteolytische Degradation der lysosomal lokalisierten sauren Sphingomyelinase und blockiert so den Abbau des komplexen Sphingolipids Sphingomyelin zu Ceramid. Die sich im Extrazellärraum befindende Form des Enzyms wird durch den lysosomotropen Inhibitor nicht abgebaut. In unseren Experimenten konnten wir bei Einsatz von Desipramin eine signifikante Abnahme der Zellzahl auf 40% feststellen. Für diesen Inhibitor wird in der Literatur neben der Hemmung des Sphingomyelinastes auch eine Blockade der sauren Ceramidasen mit daraus resultierender Ceramid-Akkumulierung beschrieben.⁶² Die erhöhten Ceramidlevel bewirken durch Apoptose-Induktion ein verbessertes Ansprechen der Tumorzellen auf eine kombinierte Radio-Chemo-Therapie. Klinische Studien, die diese Wirkungen der Substanz untersuchen, werden bereits durchgeführt. Es könnte sich also für das Medikament bald ein neues Einsatzgebiet in der Antitumorthherapie auf tun.⁶³

Durch das Mykotoxin Fumonisin B1, das eine kompetitive Inhibierung der sechs sich im ER-lokalisierten Ceramidsynthasen bewirkt, wird die Synthese von Ceramid im Cytosol gehemmt. Diese Substanz greift somit in den de novo Syntheseweg des Sphingolipidmetabolismus ein.

In unseren Experimenten konnten wir bei Einsatz von Fumonisin B1 eine Reduktion der Zellzahl um etwas mehr als 20% feststellen. Die im Vergleich zu den anderen Inhibitoren eher gering ausgeprägten Effekte auf das Wachstum könnten durch den Einsatz zu niedriger Konzentrationen bedingt sein. Beim Einsatz höherer Konzentration von bis zu 100 μM wird in der Literatur eine Apoptose-Induktion bei Glioblastomzellen beschrieben. Dabei scheinen interessanterweise Zellen glialen Ursprungs sensitiver auf das Toxin zu reagieren als Neuronen.^{64 65}

Als Gründe für die unterschiedlich stark ausgeprägten Wirkungen der eingesetzten Substanzen könnten die unterschiedliche Zellpermeabilität, die unterschiedliche Lokalisation der Enzyme mit ihren katalytischen Einheiten und natürlich auch die unterschiedlich starke Relevanz der blockierten Metabolite für den endogenen Sphingolipidmetabolismus in Frage kommen. Der Sphingomyelin-Weg (der sog. Salvage Pathway) scheint für die Sphingosin-1-Phosphat-Produktion von größerer Bedeutung zu sein als die de novo Synthese (ausgehend von Serin und Palmitoyl-CoA).

Die verschieden stark ausgeprägten proliferationshemmenden Effekte der Inhibitoren könnten möglicherweise auch auf die Wirkung der ORM-Proteine zurückzuführen sein. Bei diesen Proteinen handelt es sich um negative Regulatoren der Sphingolipid-Synthese, die durch Komplexbildung und damit Inaktivierung der Serin-Palmitoyl-Transferase den ersten Schritt der De-Novo-Biosynthese hemmen. Es konnte gezeigt werden, dass die ORM-Proteine ihre inhibitorische Aktivität bei unterbrochener Sphingolipid-Produktion einstellen. Diese Regulatoren spielen also eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Sphingolipidhomöostase.⁶⁶

Meine Untersuchungen haben auch gezeigt (Abb.19), dass exogen zugegebenes Sphingosin-1-Phosphat den proliferativen Block der Antagonisten teilweise aufhebt. Die Wiederherstellung der proliferativen Eigenschaften durch S1P korreliert dabei interessanterweise mit dem Ausmaß der Inhibierung. Beispielsweise führte S1P bei

Verwendung eines potenten Inhibitors, wie SK I-II, nur zu einer Zunahme der Zellzahl auf 40% des Ausgangswertes.

Bei einigen Zelltypen, die dazu in der Lage sind, Sphingosin-1-Phosphat zu produzieren, konnte eine Ausschleusung des bioaktiven Lysophospholipids in den Extrazellulärraum beobachtet werden. Das extrazellulär vorliegende S1P entfaltet seine Wirkungen dann über para- oder autokrine Effekte. Über die Art der in dieses Inside-Out-Signalling involvierten Transportmechanismen besteht noch Unklarheit. Forschungsergebnisse lassen vermuten, dass ATP-Bindungskassetten-Transporter den S1P-Efflux bewerkstelligen könnten. Es konnte beispielsweise in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass Mastzellen S1P via ABCC1 exportieren.⁶⁷ In Astrozyten, also den benignen Vorläuferzellen der Glioblastomzellen, scheint der Subtyp ABCA1 für den S1P-Export verantwortlich zu sein.¹⁷ In der vorliegenden Arbeit konnte ich zeigen (Abb.20), dass U87 Zellen den ATP-Bindungskassettentransporter A1 unter basalen Bedingungen exprimieren und dass die Expression durch Sphingosin-1-Phosphat selbst, sowie durch natürliche und synthetische LXR-Liganden gesteigert wird. Forschungsergebnisse anderer Gruppen legen den Schluss nahe, dass der S1P-Efflux zusätzlich noch über andere Wege erfolgen könnte. So konnte bei Experimenten mit ABCA1-, ABCA7- oder ABCC1-Knockout-Tieren merkwürdigerweise kein veränderter S1P-Plasma-Gehalt festgestellt werden.⁶⁸ Möglicherweise spielt der in Säugetieren vorkommende Typ des Transmembran-Transporters Two of Hearts (Protein Spinster Homolog 2), der in Zebrafischen den S1P-Export bewerkstelligt, auch beim Menschen eine gewisse Rolle.⁶⁹

Nach dem positiven Nachweis der ABCA1-Expression in U87 Zellen untersuchten wir die Auswirkungen pharmakologischer Inhibitoren dieses Transporters auf die Zellproliferation in An- und Abwesenheit von Sphingosin-1-Phosphat. Die Resultate dieser Untersuchungen zeigen (Abb. 21), dass sowohl DIDS als auch Glyburide eine Wachstumsverminderung um 40% bei Glioblastomzellen bewirken und dass exogen zugesetztes Sphingosin-1-Phosphat zu einer Abmilderung dieses Effekts führt.

Der ATPase-Inhibitor DIDS kam ursprünglich als Chlorid-Kanal-Blocker zum Einsatz und wurde beispielsweise zur Identifizierung eines Anionenaustauschproteins von Mastzellen verwendet. In Bezug auf Glioblastome konnte gezeigt werden, dass diese Substanz über eine Regulation der intrazellulären Cl⁻ und K⁺- Flüsse eine deutliche Abnahme der Migration von U 87 Zellen bewirkt.⁷⁰ In den letzten Jahren wurde darüber hinaus bekannt,

dass DIDS auch die Aktivität des ATP-Bindungskassetten-Transporters A1 senkt und somit den apoAI-medierten Cholesterin-Efflux blockiert.⁷¹

Glyburide, ein zur Gruppe der Sulfonylharnstoffe gehörendes orales Antidiabetikum, entfaltet seine Wirkungen über die beiden spezifischen Sulfonylharnstoff-Rezeptoren SUR1 und SUR2. Diese Rezeptoren gehören zur Gruppe der ATP-Bindungskassetten-Transporter. Diese Tatsache führte zu Experimenten, in denen getestet wurde, ob Sulfonylharnstoffe auch mit anderen Rezeptoren dieser Transporterfamilie interagieren. Interessanterweise konnte im Rahmen dieser Studien gezeigt werden, dass Glyburide den ABCA1- und SR-BI-medierten Cholesterin-Efflux hemmt. Diese Erkenntnis führte zur Besorgnis, dass die positiven Wirkungen des insulinsenkenenden Medikaments hinsichtlich des Auftretens kardiovaskulärer Ereignisse durch die Hemmung des Cholesterin-Effluxes zunichte gemacht werden könnten. Durch die Tatsache, dass in diesen Experimenten Glyburide in viel höheren Konzentrationen (100 μ M bis 1 mM) als im therapeutischen Bereich (p.o. C_{\max} 0,17 μ M), eingesetzt worden ist, konnten diese Befürchtungen entkräftet werden.⁷²

Ziel der vorliegenden Arbeit war es einen kleinen Beitrag zum besseren Verständnis der mit dem Sphingolipidmetabolismus assoziierten Tumorbiologie im Glioblastoma Multiforme zu leisten. Es konnte gezeigt werden, dass Sphingosin-1-Phosphat eine Proliferationssteigerung von U 87 Zellen bewirkt, dass der endogene Sphingolipidmetabolismus von enormer Bedeutung für das Zellwachstum ist und dass in dieser Zelllinie das Inside-Out-Signalling über den ATP-Bindungskassetten-Transporter A1 erfolgen könnte.

Die klinische Relevanz der hier vorgestellten Ergebnisse der In-Vitro-Untersuchungen wird natürlich hinsichtlich der experimentellen Bedingungen limitiert. Die Versuche wurden mit der immortalisierten Glioblastomzelllinie U87-MG durchgeführt. Natürlich unterscheidet sich das Verhalten von kultivierten, adhärennten Glioblastomzellen von dem, der sich in einem Tumorgewebe formierten Zellen. Beispielsweise wurden in unserer Versuchsanordnung Stressfaktoren, wie Hypoxie oder katabole Zustände, die in malignem Gewebe im Rahmen der Tumorprogression zwangsläufig auftreten, weitestgehend ausgeschaltet. Ein weiterer Umstand, der bei der Beurteilung der Ergebnisse berücksichtigt werden muss ergibt sich aus der Tatsache, dass mit einer Monokultur gearbeitet worden ist.

Damit werden natürlich nicht die physiologischen Bedingungen, die sich aus der zentralnervösen Umgebung und den Zell-Zell-Interaktionen ergeben, widerspiegelt.

Dennoch kann man mit gewissen Vorbehalten davon ausgehen, dass sich die Tumorzellen in vivo vielleicht ähnlich verhalten wie in unseren In-Vitro-Experimenten und sich so eventuell auch Möglichkeiten ergeben, durch den therapeutischen Einsatz pharmakologischer Inhibitoren des Sphingolipidmetabolismus das Glioblastomwachstum zu hemmen und dadurch vielleicht sogar die Prognose dieser Erkrankung zu verbessern.

Weitere Experimente, die zurzeit im Rahmen dieses Forschungsprojekts durchgeführt werden, befassen sich mit den Fragestellungen, ob S1P zu einer Aktivierung mitogener Signaltransduktionswege führt, ob sich bei einem Knockout von SPTLC1 Auswirkungen auf die Proliferation zeigen oder ob aus einer spezifischen Hemmung einzelner S1PRs auf Transkriptionsebene eine Wachstumshemmung resultiert.

Literaturverzeichnis

- 1 Bartke N, Yusuf AH. Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J Lipid Res.* 2009 Apr;50(Supplement):91-96.
- 2 Ponnusamy S, Meyers-Needham M, Senkal CE, Saddoughi SA, Sentelle D, Selvam SP et al. Sphingolipids and cancer: ceramide and sphingosine-1-phosphate in the regulation of cell death and drug resistance. *Future Oncol.* 2010 Oct;6(10):1603-1624.
- 3 Gault CR, Obeid LM, Hannun YA. An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv Exp Med Biol.* 2010;688:1-23.
- 4 Lesnik P, INSERM Unit 939. Online im Internet: URL: <http://inserm-upmc-u939.fr/content.php?id=24> (Stand: 03.03.2012).
- 5 Fyrst H, Saba JD. An update on sphingosine-1-phosphate and other sphingolipid mediators. *Nat Chem Biol.* 2010 Jul;6(7):489-497.
- 6 Bartke N, Yusuf AH. Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J Lipid Res.* 2009 Apr;50(Supplement):91-96.
- 7 Leong WI, Saba JD. S1P metabolism in cancer and other pathological conditions. *Biochimie.* 2010 Jun;92(6):716-723
- 8 Pyne NJ, Pyne S. Sphingosine 1-phosphate and cancer. *Nature Reviews Cancer.* 2010 Jul;10:489-503.
- 9 Siskind LJ, Mullen TD, Romero Rosales K, Clarke CJ, Hernandez-Corbacho MJ, Edinger AL, et al. The BCL-2 protein BAK is required for long-chain ceramide generation during apoptosis. *J Biol Chem.* 2010 Apr 16;285(16):11818-26.
- 10 Gómez-Muñoz A, Gangoiti P, Granado MH, Arana L, Ouro A. Ceramide 1-Phosphate in Cell Survival and Inflammatory Signaling
- 11 Strub GM, Maceyka M, Hait NC, Milstien S., Spiegel S. Extracellular and intracellular actions of Sphingosine-1-Phosphate. *Adv Exp Med Biol.* 2010;688:141-155.
- 12 Fyrst H, Saba JD. An update on sphingosine-1-phosphate and other sphingolipid mediators. *Nat Chem Biol.* 2010 Jul;6(7):489-497.
- 13 Giussani P, et al. Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase regulates endoplasmic reticulum-to-golgi trafficking of ceramide. *Mol Cell Biol.* 2006 Jul;26:5055–5069

-
- 14 Mechtcheriakova D, et al. FTY720-phosphate is dephosphorylated by lipid phosphate phosphatase 3. *FEBS Lett.* 2007 Jun 26;581:3063–8.
- 15 Zhan X, Desiderio DM. Nitroproteins from a human pituitary adenoma tissue discovered with a nitrotyrosine affinity column and tandem mass spectrometry. *Anal Biochem.* 2006 Jul 15;354:279–89.
- 16 Kim RH, Tabake K, Milstien S, Spiegel S. Export and functions of sphingosine-1-phosphate. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Mar;1791:692-696.
- 17 Sato K, Malchinkhuu E, Horiuchi Y, Mogi C, Tomura H, Tosaka M, et al. Critical role of ABCA1 transporter in sphingosine 1-phosphate release from astrocytes. *J Neurochem.* 2007 Dec;103(6):2610-2619.
- 18 Locher K. The swiss structural biology national center of competence in research. Structure and mechanism of multidrug transporters. Online im Internet: URL: <http://www.structuralbiology.uzh.ch/index.php?q=node/129> (Stand: 03.03. 2012).
- 19 Kawahara A, et al. The sphingolipid transporter spns2 functions in migration of zebrafish myocardial precursors. *Science.* 2009 Jan;323:524–527.
- 20 Guenther GG, Peralta ER, Rosales KR, et al. Ceramide starves cells to death by downregulating nutrient transporter proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008 Nov 11;105:17402–17407.
- 21 Yacoub A, Hamed HA, Allegood J, et al. PERK-dependent regulation of ceramide synthase 6 and thioredoxin play a key role in MDA-7/IL-24-induced killing of primary human glioblastoma multiforme cells. *Cancer Res.* 2010 Feb 1;70:1120–1129.
- 22 Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer.* 2011 May;11(5):325-337.
- 23 Masuhr KF, Neumann M. *Duale Reihe Neurologie.* 6. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2007;S.310-318;323-325.
- 24 Schneider T, Mawrin C, Scherlach C, Skalej M, Firsching R. Gliomas in adults. *Dtsch Arztebl Int.* 2010;107(45):799-808.
- 25 Müller C, Löll C, Bechthold H. *Klinikleitfaden für alle Stationen. Leitsymptome-Krankheitsbilder-Praxistipps.* 3. Auflage. München: Elsevier GmbH Urban & Fischer Verlag; 2008;598-599.
- 26 Lim SK, Llaguno SR, McKay RM, Parada LF. Glioblastoma multiforme: a perspective on recent findings in human cancer and mouse models. *BMB Rep.* 2011 Mar;44(3):158-164.
-

-
- 27 Preusser M, de Ribaupierre S, Wöhrer A, Erridge SC, Hegi M, Weller M, et al. Current concepts and management of glioblastoma. *Ann Neurol*. 2011 Jul;70(1):9-21.
- 28 Böcker W, Denk H, Heitz PU. *Pathologie*. 3. Auflage. Elsevier GmbH Urban & Fischer Verlag; 2004;317-320.
- 29 Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie 2008. Online im Internet: URL: www.neuroonkologie.de/fileadmin/neuroonkologie/pdf/leitlinien2008/Gliome.pdf (Stand: 23.10.2011).
- 30 Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 9 Auflage. München: Elsevier GmbH Urban & Fischer Verlag; 2004;933.
- 31 Lim SK, Llaguno SR, McKay RM, Parada LF. Glioblastoma multiforme: a perspective on recent findings in human cancer and mouse models. *BMB Rep*. 2011 Mar;44(3):158-164.
- 32 Wolf A, Agnihotri S, Guha A. Targeting metabolic remodeling in glioblastoma multiforme. *Oncotarget*. 2010 Nov;1(7):552-562.
- 33 Böcker W, Denk H, Heitz PU. *Pathologie*. 3. Auflage. Elsevier GmbH Urban & Fischer Verlag; 2004;321.
- 34 Radiology teacher. Online im Internet: URL: <http://www.radiologyteacher.com/index.cgi?&nav=view&DatID=1125> (Stand: 04.04.2012)
- 35 Ribosepharm. *Onkologie 2011*. Online im Internet: URL: www.onkologie2011.de/solidetumoren/nerven/gliome-therapie.htm (Stand: 23.10.2011).
- 36 Zhao C, Dahlman-Wright K. Liver X Receptor in cholesterol metabolism. *J Endocrinol*. 2010 Mar;204:233-240.
- 37 Fielding CJ, Fielding PE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res*. 1995 Feb;36(2):211-228.
- 38 Hayashi H. Lipid metabolism and glial lipoproteins in the central nervous system. *Biol Pharm Bull*. 2011 Apr;34(4):453-461.
- 39 Horn F, Moc I, Schneider N, Grillhösl C, Berghold S, Lindenmeier G. *Biochemie des Menschen. Das Lehrbuch für das Medizinstudium*. 3. Auflage. Stuttgart; Thieme, 2005;145-155.
- 40 Stefkova J, Poledne R, Hubacek JA. ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol. Res*. 2004;53:235-243.
-

-
- 41 American Type Culture Collection. Online im Internet: URL:
<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=HTB-14&Template=cellBiology> (Stand: 31.10.2011).
- 42 Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn, et. al.
Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352:987-996.
- 43 Nakada M, Nakada S, Demuth T, Tran NL, Hoelzinger DB, Berens ME. Molecular targets of glioma invasion. *Cell Mol Life Sci.* 2007 Feb;64:458-478.
- 44 Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Feb;9:139-150.
- 45 Maceyka M, Milestien S, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate: the Swiss army knife of sphingolipid signaling. *J Lipid Res.* 2009 Apr;50 Suppl:S272-276.
- 46 Hla T, Venkataraman K, Michaud J. The vascular S1P gradient cellular sources and biological significance. *Biochem Biophys Acta.* 2008 Sep;1781:477-482.
- 47 Lepley D, Paik JH, Hla T, Ferrer F. The G protein-coupled receptor S1P2 regulates Rho/Rho kinase pathway to inhibit tumor cell migration. *Cancer Res.* 2005 May 1;65(9):3788-95.
- 48 Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek PG, Coso OA, Gutkind S, Spiegel S. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature.* 1996 Jun 27;381(6585):800-3.
- 49 Van Brocklyn, JR Jackson, CA Pearl, DK, Kotur MS, Snyder PJ, Prior TJ. Sphingosine kinase-1 expression correlates with poor survival of patients with glioblastoma multiforme: roles of sphingosine kinase isoforms in growth of glioblastoma cell lines. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005 Aug;64:695-705.
- 50 Yoshida Y, Nakada M, Harada T, Tanaka S, Furuta T, Hayashi Y, et al. The expression level of sphingosine-1-phosphate receptor type 1 is related to MIB-1 labeling index and predicts survival of glioblastoma patients. *J Neurooncol.* 2010 May;98:41-47.
- 51 Lepley D, Paik JH, Hla T, Ferrer F. The G protein-coupled receptor S1P2 regulates Rho/Rho kinase pathway to inhibit tumor cell migration. *Cancer Res.* 2005 May 1;65(9):3788-95.
- 52 Van Brocklyn J, Letterle C, Snyder P, Prior T. Sphingosine-1-phosphate stimulates human glioma cell proliferation through Gi-coupled receptors: role of ERK MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase beta. *Cancer Lett.* 2002 Jul;181:195-204.

-
- 53 Van Brocklyn JR, Young N, Roof R. Sphingosine-1-phosphate stimulates motility and invasiveness of human glioblastoma multiforme cells. *Cancer Lett.* 2003 Sep;199:53-60.
- 54 Annabi B, Lachambre MP, Plouffe K, Sartelet H, Beliveau R. Modulation of invasive properties of CD133+ glioblastoma stem cells: a role for MT1-MMP in bioactive lysophospholipid signaling. *Mol Carcinog.* 2009 Oct;48:910-919.
- 55 Young N, Pearl DK, Van Brocklyn JR. Sphingosine-1-phosphate regulates glioblastoma cell invasiveness through the urokinase plasminogen activator system and CCN1/Cyr61. *Mol Cancer Res.* 2009 Jan;7:23-32.
- 56 Bryan L; Paugh BS, Kapitonov D, Wilczynska KM, Alvarez SM, Singh SK, et al. Sphingosine-1-phosphate and interleukin-1 independently regulate plasminogen activator inhibitor-1 and urokinase-type plasminogen activator receptor expression in glioblastoma cells: implications for invasiveness. *Mol Cancer Res.* 2008 Sep;6:1469-1477.
- 57 Galderisi U, Jori FP, Giordano A. Cell cycle regulation and neural differentiation. *Oncogene.* 2003 Aug 11;22(33):5208–5219.
- 58 Min J.K., Yoo H.S., Lee E.Y., Lee W.J., Lee Y.M. Simultaneous quantitative analysis of sphingoid base 1-phosphates in biological samples by o-phthalaldehyde precolumn derivatization after dephosphorylation with alkaline phosphatase. *Anal. Biochem.* 2002;303:167–175.
- 59 Young N, James R, Van Brocklyn JR. 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.* 2007 May 1; 313(8):1615-1627.
- 60 Goidts V, Bageritz J, Puccio L, Nakata S, Zapatka M, Barbus S, et al. RNAi screening in glioma stem-like cells identifies PFKFB4 as a key molecule important for cancer cell survival. *Oncogene.* 2011 Nov 7.
- 61 Lee YS, Choi KM, Lee S, Sin DM, Lim Y, Lee YM, et al. Myriocin, a serine palmitoyltransferase inhibitor, suppresses tumor growth in a murine melanoma model by inhibiting de novo sphingolipid synthesis. *Cancer Biol Ther.* 2012 Jan;13(2):92-100.
- 62 Elojeimy S, Holman DH, Liu X, El-Zawahry A, Villani M, Cheng JC, et al. New insights on the use of desipramine as an inhibitor for acid ceramidase. *FEBS Lett.* 2006 Aug;580(19):4751-4756.
- 63 Holman DH, Turner LS, El-Zawahry A, Elojeimy S, Liu X, Bielawski J, et al. Lysosomotropic acid ceramidase inhibitor induces apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008 Feb;61(2):231-242.

-
- 64 Stockmann-Juvala H, Naarala J, Loikkanen J, Vähäkangas K, Savolainen K. Fumonisin B1-induced apoptosis in neuroblastoma, glioblastoma and hypothalamic cell lines. *Toxicology*. 2006 Aug 15;225(2-3):234-41.
- 65 Osuchowski MF, Sharma RP. Fumonisin B1 induces necrotic cell death in BV-2 cells and murine cultured astrocytes and is antiproliferative in BV-2 cells while N2A cells and primary cortical neurons are resistant. *Neurotoxicology*. 2005 Dec;26(6):981-92.
- 66 Breslow DK, Collins SR, Bodenmiller B, Aebersold R, Simons K, Shevchenko A, et al. Orm family proteins mediate sphingolipid homeostasis. *Nature*. 2010 Feb 25;463(7284):1048-1053.
- 67 Mitra P, Oskeritzian CA, Payne SG, Beaven MA, Milstien S, Spiegel S. Role of ABCB1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 Oct 31;103:16394-16399.
- 68 Lee YM, Venkataraman K, Hwang SI, Han DK, Hla T. A novel method to quantify sphingosine 1-phosphate by immobilized metal affinity chromatography (IMAC). *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2007 Nov;84:154-162.
- 69 Osborne N, Brand-Arzamendi K, Ober EA, Jin SW, Verkade H, Holtzman N, et al. The spinster homolog, two of hearts, is required for sphingosine 1-phosphate signaling in zebrafish. *Curr Biol*. 2008 Dec 9;18:1882-1888.
- 70 Catacuzzeno L, Aiello F, Fioretti B, Sforna L, Castigli E, Ruggieri P, et al. *J Cell Physiol*. Serum-activated K and Cl currents underlay U87-MG glioblastoma cell migration. 2011 Jul;226(7):1926-33.
- 71 Panzenboeck U, Balazs Z, Sovic A, Hrzenjak A, Levak-Frank S, Wintersperger A, et al. ABCA1 and scavenger receptor class B, type I, are modulators of reverse sterol transport at an in vitro blood-brain barrier constituted of porcine brain capillary endothelial cells. *J Biol Chem*. 2002 Nov 8;277(45):42781-42789.
- 72 Terao Y, Ayaori M, Ogura M, Yakushiji E, Uto-Kondo H, Hisada T, et al. Effect of sulfonyleurea agents on reverse cholesterol transport in vitro and vivo. *J Atheroscler Thromb*. 2011 Jun 3;18(6):513-530.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name	Anna Martina Brunner
Adresse	Grassendorf 7, 9556 Liebenfels
e-Mail	anna.brunner@stud.meduni-graz.at
Telefonnummer	0660/5776612
Geburtsdatum	16.07.1988
Geburtsort	St.Veit/Glan
Familienstand	ledig

Ausbildung

Schulbildung

1994-1998	Volksschule Sörg
1998-2006	BG/BRG St.Veit/Glan
	Naturwissenschaftlicher Zweig
01.06.2006	Matura mit ausgezeichnetem Erfolg

Studium

seit Oktober 2006	Diplomstudium Humanmedizin an der Medizinischen Universität Graz
Juli 2007	Beendigung des 1. Abschnittes (1. Diplomprüfung)
Mai 2011	Beendigung des 2. Abschnittes (2. Diplomprüfung)
Juli 2012	Studienabschluss Beendigung des 3. Abschnittes (3. Diplomprüfung)

Famulaturen

03.09.2007-28.09.2007	Chirurgie; KH der BHB St.Veit/Glan
04.08.2008-29.08.2008	Chirurgie; KH der BHB St.Veit/Glan
03.08.2009-28.08.2009	Nuklearmedizin; LKH Klagenfurt
31.08.2009-25.09.2009	Innere Medizin; KH der BHB St.Veit/Glan
28.06.2010-09.07.2010	Kinder- und Jugendheilkunde; LKH Klagenfurt
23.08.2010-10.09.2010	Neurochirurgie; LKH Klagenfurt

Praktika im Rahmen des 6.

Studienjahres

10. 11. 2011 – 15. 12. 2011	Gynäkologie und Geburtshilfe; Heidelberg (3. Fächergruppe)
15. 12. 2012 – 30. 03. 2012	Neurochirurgie; Klagenfurt (1. Fächergruppe)
16. 04. 2012 – 03. 07. 2012	Innere Medizin; St. Veit/Glan (2. Fächergruppe)

Spezielle

Studienmodule/Zusatzausbildungen

Gesundheits- und Medizinökonomie
Case-based Learning in Klinik und Praxis

Der Krebspatient im interdisziplinären
Betreuungskonzept
Kardiologie in der Praxis
Medizinische Parasitologie

Basic Medical Communication I
Basic Medical Communication II
Common Invasive Procedures II

Sonografische Diagnostik in der Akutaufnahme
Radiologische Diagnostik in der Notfall- und
Akutmedizin (Schädel-Hirn-Trauma)

***Praktika/studienbegleitende
Tätigkeiten/zusätzliche
Qualifikationen***

04.09.2006-22.09.2006

SummerSchool GEN-AU; Institut für Zellbiologie,
Histologie und Embryologie, Medizinische
Universität Graz

2007

Sanitäterin beim Roten Kreuz, St.Veit/Glan

01.08.2011-04.11.2011

Im Rahmen der Diplomarbeit: Mitarbeit in der
Forschungsgruppe Sattler;
Institut für Molekularbiologie und Biochemie,
Medizinische Universität Graz

22.11.2011

Praktikum am Institut für Pathologie bei Prof.
Kommoss in Mannheim mit Einblick in
Zytopathologie, Makropathologie,
Schnellschnittdiagnostik, Histopathologie,
Immunhistochemie, Konsiliartätigkeit

Weitere Interessen und Aktivitäten

Ausdauersport

Laufen:
Graz-Marathon 2010 (6. beim Viertelmarathon in
der Gesamtwertung)
Grazer Silvesterlauf 2010 (2. in der Gesamtwertung)
Businesslauf Graz (4. in der Staffel-Wertung)
Salzburg-Marathon (1. in der Staffel-Wertung)
Graz Marathon 2011 (14. beim Halbmarathon in der
Gesamtwertung)

Triathlon

Fremdsprachen

Englisch in Wort und Schrift

(Basic Medical Communication I,
Basic Medical Communication II)

EDV-Kenntnisse

Erfahrung mit den Betriebssystemen Microsoft
Win2000; XP; Vista; Windows 7; Apple OS X
Leopard
versiert im Umgang mit Microsoft Office
Grundkenntnisse in Prism und SPSS