

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Eberhard Weihe
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Die PAC1-Agonisten und PACAP- Rezeptoren in murinen und humanen kleinzelligen Bronchialkarzinom Zelllinien

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Norman Kalmbach
aus Mödling/NÖ
Marburg, 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
09.07.2014

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Prof. Dr. Helmut Schäfer
Referent:	Prof. Dr. Eberhard Weihe
1. Korreferent:	Prof. Dr. Frank Czubayko

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Neuropeptide	6
1.1.1	Das Neuropeptid PACAP und weitere Agonisten und Antagonisten der PACAP-Rezeptoren	6
1.1.2	Maxadilan, der einzige endogene spezifische PAC1-Agonist	8
1.1.3	VIP, Agonist der VPAC1- und VPAC2-Rezeptoren	8
1.1.4	Antagonisten der PAC1-Rezeptoren	8
1.2	PACAP-Rezeptoren sind eine Subfamilie G-Protein-gekoppelter Rezeptoren	9
1.3	PACAP und seine Rezeptoren in Bronchialkarzinomen	16
1.3.1	Bronchialkarzinome	17
1.3.2	Histologische und molekulare Unterschiede in Bronchialkarzinomen	17
1.3.3	Murine und humane Zelllinien unterschiedlicher kleinzelliger Bronchialkarzinome	18
1.3.4	PACAP und seine Rezeptoren in Bronchialkarzinomen	19
1.3.5	Der Hedgehog-Wachstumssignalweg im kleinzelligen Bronchialkarzinom mit Bezug zur PACAP-Signaltransduktion	20
1.3.6	PACAP-Signaltransduktion und der Phosphoinositid-3-Kinase-Weg	21
1.3.7	Zielgene der PACAP Signalkaskade: Stathmin 1 und Stanniocalcin 1	21
1.4	Zielsetzung der Arbeit	23
2	Material und Methoden	25
2.1	Material	25
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	25
2.1.2	Chemikalien	30
2.1.3	Puffer und Lösungen	31
2.1.4	Enzyme	36
2.1.5	Nukleotide	36
2.1.6	Oligonukleotide (Primer)	37
2.1.7	Kits	41
2.1.8	Computer-Software, Internetseiten	41
2.1.9	Puffer und Medien	41
2.2	Methoden	42
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	42
2.2.2	RNA-Extraktion aus Gewebe	45
2.2.3	Mikrobiologische Methoden	50

2.2.4	Histologische Methoden	54
2.2.5	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (QPCR).....	60
2.2.6	Statistische Auswertung	62
2.2.7	Zellkultur	62
3	Ergebnisse.....	65
3.1	Detektion der PACAP-Rezeptorgenexpression in LLC1-Zellen und subkutanen LLC1-Transplantaten.....	65
3.2	Differenzierung der Expression von PAC1-Splicevarianten in LLC1-Zellen und sc LLC1-Tumor.....	66
3.3	Expressionsprofil des VIP-/PACAP-Systems und der putativen PACAP-abhängigen Zielgene Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 in der Mauslunge mit LLC1-Tumoren: Einfluss von transgener NGF-Überexpression.....	68
3.4	Expressionsmuster von PACAP, VIP und der PACAP-Rezeptoren und der Expression von PACAP und VIP in der Haut und Lunge nach LLC1-Tumortransfer	70
3.5	Funktionalität des PAC1-Rezeptors in der LLC1-Zelllinie.....	72
3.6	Einfluss des PAC1-spezifischen Liganden Maxadilan und der nonselektiven PACAP-/VIP-Rezeptorliganden PACAP38 und PACAP27 auf die Proliferationsrate von LLC1-Zellen	74
3.7	Einfluss des PAC1-spezifischen Liganden Maxadilan und der nonselektiven PACAP-/VIP-Rezeptorliganden PACAP38 und PACAP27 auf die Gentranskription von PAC1, Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 in LLC1-Zellen.....	76
3.8	Expressionsprofil des VIP-/PACAP-Systems und der putativen PACAP-Zielgene Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 in humanen SCLC-Zelllinien mehrerer kleinzelliger Bronchialkarzinome	82
3.9	Expressionsprofil des VIP-/PACAP-Systems und der putativen PACAP Zielgene Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 in verschiedenen humanen kleinzelligen Bronchialkarzinomen	86
3.10	Detektion der PAC1-Splicevarianten in cDNA-Bibliotheken verschiedener humaner kleinzelliger Bronchialkarzinome	88
3.11	Einfluss von PAC1-Agonisten auf die Zellproliferation der humanen kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinie NCI-H82	89
3.12	Einfluss von PAC1-Agonisten auf die Apoptose von NCI-H82-Zellen unter Applikation des Zytostatikums Cis-Platin	91
4	Diskussion	93
4.1	Bedeutung funktioneller Expression von PAC1 im kleinzelligen Bronchialkarzinom.....	94
4.1.1	Selektive Expression von PAC1 in LLC1-Zellen	94
4.1.2	Evidenz für ein reziprokes Expressionsprofil des PAC1-Rezeptors und seines Liganden PACAP in humanen Zelllinien des kleinzelligen Bronchialkarzinoms	97
4.2	Evidenz für eine PAC1 Aktivierung in LLC1-Zellen	99

4.3	Evidenz für eine transkriptionelle Rückkopplungshemmung von PAC1 durch selektive und nonselektive PAC1-Agonisten?	102
4.4	PAC1 Abhängigkeit der Proliferationsrate von LLC1-Zellen.....	102
4.4.1	Fehlender Einfluss von PAC1-Agonisten auf die Apoptoserate von NCI-H82-Zellen	103
4.5	PACAP-abhängige Regulation von Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 auf Transkriptionsebene.....	104
4.5.1	Die PAC1 Zielgene in humanen Zelllinien und Biopsien des kleinzelligen Bronchialkarzinoms	105
4.6	Ausblick: Bedeutung von PAC1 als Ziel für die Tumorbildgebung und als diagnostischer und prognostischer Marker	106
5	Anhang	108
5.1	Abkürzungsverzeichnis	108
5.2	Abbildungsverzeichnis.....	113
5.3	Literaturverzeichnis	117
5.4	Danksagung	135
5.5	Verzeichnis akademischer Lehrer	136
5.6	Fördergelder.....	136

Für meinen Sohn Leonidas

Zusammenfassung

Die pleiotropen Neuropeptide PACAP (pituitary adenylate cyclase activating peptide) und VIP (vasoactive intestinal polypeptide) sind Mitglieder der VIP/PACAP/Glucagon/Secretin-Superfamilie und wirken über G-Proteingekoppelte-Rezeptoren. PACAP wirkt auf den PAC1-Rezeptor und wie VIP auf VPAC1 und VPAC2. Der Nachweis pharmakologischer Wirkungen von Agonisten und Antagonisten der VIP-/PACAP-Familie auf Bronchialkarzinomzelllinien durch Terry Moody lieferte erste Evidenzen, dass Bronchialkarzinomzellen funktionelle VIP-/PACAP-Rezeptoren exprimieren. Allerdings wurde das differentielle PAC1-, VPAC1- und VPAC2-Rezeptorprofil von Bronchialkarzinomzellen bisher noch nicht entschlüsselt.

Deshalb setzte sich die vorliegende Arbeit zum Ziel, die mRNA-Expressionsprofile der PAC1-, VPAC1- und VPAC2-Rezeptoren inklusive der PAC1-Splicevarianten in der murinen kleinzelligen Lewis-lung-carcinoma-1- (LLC1)-Zelllinie und deren subkutanen und pulmonalen Transplantaten sowie in verschiedenen humanen kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien und -karzinomen zu differenzieren.

Darüber hinaus sollten die Funktionalität des PAC1-Rezeptors in der LLC1-Zelllinie und die Wirkung von PAC1-Agonisten auf die Proliferation bzw. Apoptoserate in der humanen kleinzelligen NCI-H82-Bronchialkarzinom-Zelllinie getestet werden. Ein weiteres Ziel war, die Expression der tumorrelevanten PAC1-Zielgene Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 in der murinen und den humanen Zelllinien und im humanen kleinzelligen Bronchialkarzinom zu bestimmen und den Einfluss PAC1-spezifischer Liganden auf ihre Expression zu erfassen. Folgende wesentliche neue Erkenntnisse wurden erzielt. Es gelang, die RNA-Expressionsprofile von PAC1, VPAC1 und VPAC2 und aller bekannten PAC1-Splicevarianten in der murinen LLC1-Tumorzelllinie und ihren subkutanen und pulmonalen Transplantaten sowie im humanen kleinzelligen Bronchialkarzinom zu differenzieren. Zwei Gruppen humaner Zelllinien kleinzelliger Bronchialkarzinome mit reziproker Abundanz von PAC1 und PACAP mRNA wurden differenziert. In Gruppe 1 war PAC1 hoch exprimiert und PACAP nicht detektierbar, in Gruppe 2 war PAC1 niedrig und PACAP hoch exprimiert.

Mithilfe einer FRET-(Förster Resonanz Energie Transfer)-Messung konnte eine funktionell relevante Aktivierung des PAC1-Rezeptors in LLC1-Zellen durch subnanomolare Konzentrationen von PACAP38 nachgewiesen werden, welche die Synthese von cAMP induzierte und zur Freisetzung von Ca^{2+} führte. Während die PAC1-Rezeptoraktivierung in der murinen LLC1-Zelllinie zu einer mäßigen Reduktion der Proliferationsrate führte, resultierte eine PAC1-Rezeptoraktivierung in der humanen NCI-H82-Zelllinie nur in einer marginalen Änderung der Proliferationsrate ohne nachweisbare Änderung der durch CisPt induzierten Apoptoserate. Die PAC1-Liganden Maxadilan, PACAP38 und PACAP27 schienen in LLC1-Zellen eine Rückkopplungshemmung der Expression des PAC1-Rezeptors auf mRNA-Niveau zu verursachen.

Die murine LLC1-Zelllinie und das murine pulmonale LLC1-Transplantat wiesen mRNA-Koexpression des PAC1-Rezeptors und seiner putativen Zielgene Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 auf. Hingegen war das mRNA Koexpressionsmuster von PAC1 und seinen putativen Zielgenen Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 in humanen kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien und kleinzelligen Bronchialkarzinomen heterogen. Eine eindeutige Regulation der Transkription der genannten Zielgene durch eine PAC1-Rezeptoraktivierung konnte weder für die murine noch für die humanen kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinie(n) nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse lassen folgende Schlussfolgerungen zu. Da PAC1 und seine putativen Zielgene Stathmin 1 und Stanniocalcin 1 in murinen und humanen Zelllinien kleinzelliger Bronchialkarzinome in der Regel stark exprimiert sind, eignen sie sich sowohl in der präklinischen als auch klinischen Forschung als Bio- bzw. Tumormarker. Zum einen bietet sich an, Maxadilan-PET-Liganden zu entwickeln und für die diagnostische bzw. prognostische Tumorbildgebung einzusetzen. Zum anderen könnten PAC1-Rezeptoren auf kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen für „Drug-targeting“ genutzt werden. Angesichts heterogener Ko-Expressionsmuster von PAC1-Rezeptoren und seinen beiden putativen Zielgenen Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 in humanen kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien liegt es nahe, das jeweilige kombinatorische Expressionsprofil von PAC1, PACAP, Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 in Tumorbiopsien, Metastasen und Blutproben als Biomarker zur diagnostischen und prognostischen Differenzierung der Malignität von Bronchialkarzinomen im

Patienten zu nutzen. Insgesamt offerieren die hier erzielten Ergebnisse einen Beitrag für neue translationale Ansätze in der personalisierten Krebsmedizin.

Schlüsselworte: kleinzelliges Bronchialkarzinom, kleinzellige Bronchialkarzinomzelllinien, LLC1-Zelllinie, PACAP, PAC1, VPAC1, VPAC2, PAC1-Splicevarianten, Stanniocalcin 1, Stathmin 1, Genexpression, Maxadilan

Summary

The pleiotropic neuropeptides PACAP (pituitary adenylate cyclase activating peptide) and VIP (vasoactive intestinal polypeptide) are members of the VIP/PACAP/glucagon/secretin superfamily and function via G-protein coupled receptors. PACAP acts on the PAC1 receptor and like VIP on VPAC1 and VPAC2 receptors. Pharmacological effects of agonists and antagonists of the VIP-/PACAP-family on lung cancer cell lines shown by Terry Moody provided first evidence that lung cancer cell lines express functional VIP-/PACAP receptors. However the differential PAC1, VPAC1 and VPAC2 receptor profiles of lung cancer cells have not yet been deciphered.

Therefore, it was the aim of this thesis to differentiate the mRNA expression profiles of PAC1 and its splice variants, as well as that of VPAC1 and VPAC2 in the murine small cell Lewis-lung carcinoma-1-(LLC1) cell line and its subcutaneous and pulmonary transplants as well as in different human small cell lung cancer cell lines and carcinomas. In addition, the functionality of the PAC1-receptor in the LLC1 cell line and the effect of PAC1 agonists on proliferation and apoptosis in the human small cell lung cancer cell line NCI-H82 should be tested. Another objective was to determine the expression of the tumor relevant PAC1 target genes stanniocalcin 1 und stathmin 1 in the murine and human cell lines and in human small cell lung cancer and to detect the influence of PAC1-specific ligands on their expression. The following major new findings were obtained. The expression profile of PAC1, VPAC1 and VPAC2 and all known PAC1 splice variants in the murine LLC1-tumor cell line and its subcutaneous and pulmonary transplants and human small cell lung cancer cell lines was successfully differentiated. Two groups of human cell lines of small cell lung cancer featuring reciprocal abundance of PAC1 and PACAP mRNA could be differentiated. In group 1, PAC1 showed high and PACAP not detectable mRNA expression levels while in group 2 PAC1 expression was low and that of PACAP high.

Using a FRET (Förster resonance energy transfer) experimental setup a functionally relevant activation of the PAC1 receptor in LLC1 cells by subnanomolar concentrations of PACAP38 was detected, which induced the synthesis of cAMP and the release of Ca^{2+} . While the PAC1 receptor activation

in the murine LLC1 cell line resulted in a modest reduction of the proliferation rate, the PAC1 receptor activation in the human NCI-H82 cell line resulted only in a marginal change of the rate of proliferation without detectable change of the CisPt-induced apoptosis rate. The selective PAC1 ligand maxadilan, PACAP38 and PACAP27 seemed to cause a feedback inhibition of the expression of PAC1 receptor at the mRNA level in LLC1 cells.

The murine LLC1-cell line and the murine pulmonary LLC1 graft exhibited mRNA coexpression of PAC1 receptor and its putative target genes stanniocalcin 1 und stathmin 1. In contrast, mRNA coexpression patterns of PAC1, stanniocalcin 1 und stathmin 1 were heterogeneous in human small cell lung cancer cell lines and small cell lung cancer biopsies. Neither in the murine nor in the human small cell lung cancer cell line(s) evidence for transcriptional regulation of these two PAC1 target genes could be obtained.

The results imply the following conclusions. Because PAC1 and its putative target genes stanniocalcin 1 und stathmin 1 are generally highly expressed in murine and human small cell lung cancer cell lines are, they are suitable biomarkers and tumor markers in both preclinical and clinical cancer research. Thus, the development of maxadilan PET ligands for prognostic and prognostic tumor imaging is a new perspective.

PAC1 receptors on small cell bronchial carcinoma could serve for "drug targeting". In the light of the heterogeneous coexpression patterns of PAC1-receptors, stanniocalcin 1 und stathmin 1 in human small cell lung cancer cell lines, combinatorial expression profiling of PAC1, PACAP, stanniocalcin 1 and stathmin 1 in tumor biopsies, metastases and blood samples is a new biomarking approach for diagnostic and prognostic differentiation of malignancy of lung cancers and their metastases in the clinics and preclinical research. Overall, the results obtained here offer a contribution to new translational approaches in personalized cancer medicine.

Keywords : small cell lung cancer , small-cell lung carcinoma cell lines, LLC1 cell line , PACAP, PAC1, VPAC1, VPAC2, PAC1 splice variants, stanniocalcin 1, stathmin 1, gene expression, Maxadilan

1 Einleitung

1.1 Neuropeptide

Neuropeptide sind eine große Gruppe unterschiedlicher interzellulärer Signalmoleküle im Nervensystem vieler Spezies, von den Nematoden bis zum Menschen. Die Länge liegt zwischen drei und über 100 Aminosäuren. Biologisch aktive Neuropeptide werden durch proteolytische Spaltung, z. B. durch Prohormonkonvertasen aus größeren Vorläuferpeptiden erstellt. Diese sogenannten Prepropeptide bestehen zusätzlich zu den biologisch aktiven gereiften Peptiden aus einem Signalpeptid und möglicherweise einem oder mehreren Platzhalterpeptiden. Neuropeptide können als Neuromodulatoren oder Neurotransmitter und sogar als Hormone funktionieren. Neuropeptide werden aufgrund ihrer ähnlichen Struktur oder Funktion zu Familien oder Superfamilien zusammengefasst. Viele von Ihnen sind durch Tandemduplikation einzelner Gene oder durch Verdoppelung ganzer Gene lokal oder interchromosomal entstanden (Larhammar D. 2009).

1.1.1 Das Neuropeptid PACAP und weitere Agonisten und Antagonisten der PACAP-Rezeptoren

PACAP (pituitary adenylate cyclase activating peptide) ist ein Neuropeptid, dessen Sequenz 1989 von Akira Arimura und seinen Mitarbeitern entschlüsselt wurde. (Miyata et al. 1989). Dabei konnte gezeigt werden, dass PACAP ein 38 Aminosäuren umfassendes Peptid ist, das C-terminal amidiert ist. Zusätzlich konnte ein 27 Aminosäuren enthaltendes Peptid isoliert werden, das mit den N-terminalen 27 Aminosäuren von PACAP38 übereinstimmt (Miyata et al. 1990). Die Sequenz von PACAP27 ist zu 68 % mit der Sequenz des vasoaktiven intestinalen Peptids (VIP) identisch. Dadurch wurde PACAP als Mitglied der VIP-Secretin-GHRH-Glucagon-Superfamilie identifiziert (Rosselin et al. 1982; Campbell and Scanes 1992; Segre and Goldring 1993). Die humane cDNA codiert für ein 176 Aminosäuren umfassendes Preproprotein, das ein 24 Aminosäuren langes Signalpeptid beinhaltet (Hosoya et al. 1992). Die Analyse der cDNA unterschiedlicher Spezies hat die Existenz eines 29 Aminosäuren

beinhaltenden Peptids enthüllt. Dieses ist C- und N-terminal von basischen Aminosäuren abgegrenzt und stromaufwärts von PACAP38 lokalisiert. Das Peptid hat Ähnlichkeit mit PACAP27 und wird PACAP-related peptide (PRP) genannt siehe **Abbildung 1.1.** (Ogi et al. 1990; Hoyle, 1998). Seine physiologische Rolle ist bis heute unbekannt.

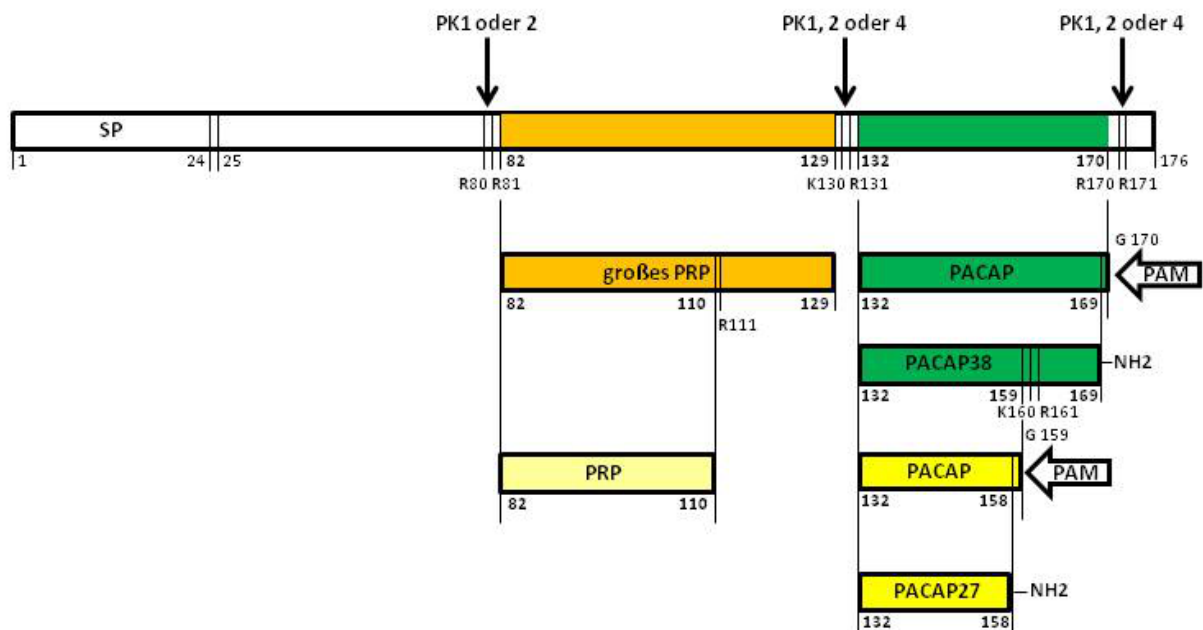


Abbildung 1.1. Schema des humanen Prepropeptids von PACAP und dessen posttranslationaler Prozessierung. Art und Locus jeder Hydrolysierungs- und Amidierungsreaktion ist spezifisch. PK-1, -2 oder -4: Prohormon-Konvertase-1,-2 oder-4; PAM: peptidyl glycin α -amidating monooxygenase; SP: Signalpeptid PRP: PACAP related peptide (Schema modifiziert nach Vaudry et al., 2009).

PACAP38 im Blutplasma hat eine biologische Halbwertszeit zwischen zwei und zehn Minuten (Zhu et al. 2003; Li et al. 2007). Bei PACAP27 hingegen wurde eine biologische Halbwertszeit von mehr als zwei Stunden in humanem Plasma gemessen (Bourgault et al. 2008). PACAP und seine Rezeptoren sind in vielen Arealen des zentralen Nervensystems (ZNS) präsent (Ghatei et al. 1993; Hannibal et al. 2002). Sie sind jedoch auch in den peripheren Organen und in weiten Teilen des Immunsystems exprimiert. PACAP-Peptide werden in Nervenfasern der Luftwege exprimiert, die Bündel glatter Muskulatur und Blutgefäße in der Trachea sowie in den Bronchiolen der Lunge innervieren (Cardell et al. 1991; Hauser-Kronberger et al. 1996; Shigyo et al. 1998). Im Immunsystem wird PACAP in Lymphgeweben wie Thymus und Milz, aber auch in peritonealen Makrophagen und T-Zellen exprimiert (Gaytan et al.; 1994, Abad et al. 2002; Pozo et al. 1997). PACAP38 ist im Vergleich mit PACAP27

sowohl im Gehirn als auch in den peripheren Organen bei weitem das stärker exprimierte Peptid. Der Anteil von PACAP27 zu PACAP38 ist jedoch von Organ zu Organ unterschiedlich (Arimura et al. 1991).

PACAP ist auch in vielen Neoplasien präsent und trägt im Falle von hypophysären Adenomen ebenfalls zur Tumorpromotion bei. Diese Beobachtung basiert darauf, dass hypophysäre Zellen auf cAMP-Stimulation mit Proliferation reagieren (Vaudry et al. 2009).

1.1.2 Maxadilan, der einzige endogene spezifische PAC1-Agonist

Maxadilan ist ein 61 AS Vasodilator-Peptid, das 1991 aus den Speicheldrüsen der neuweltlichen Sandfliege (*Lutzomyia longipalpis*) isoliert wurde (Lerner et al. 1991). 1996 wurde festgestellt, dass dieser hochpotente Vasodilator (500-fache Potenz von Calcitonin gene related peptide [CGRP]) nicht an den CGRP-, Amylin- oder Adrenomedullin-Rezeptor bindet, sondern selektiv an PAC1. Um dieselbe Zeit wurde festgestellt, dass PACAP und Maxadilan, das keinerlei Sequenzhomologie zu PACAP oder VIP vorweist, nahezu die gleiche Affinität zu PAC1 haben (Moro und Lerner 1997).

1.1.3 VIP, Agonist der VPAC1- und VPAC2-Rezeptoren

Viktor Mutt und Mitarbeiter wiesen 1970 ein Peptid in der Lunge nach, das später dann aus dem Dünndarm isoliert wurde und heute unter dem Namen vasoaktives intestinales Peptid (VIP) bekannt ist (Said und Mutt 1970). VIP ist ein 28 AS langes Peptid, dessen Aminosäuresequenz zu 71 % PACAP sequenzhomolg ist (Dickson und Finlayson 2009).

1.1.4 Antagonisten der PAC1-Rezeptoren

Die einzigen bisher bekannten PACAP-Antagonisten sind die N-terminal verkürzten PACAP(6-27) und PACAP(6-38). Beide binden zwar hochaffin an den PAC1-Rezeptor, aktivieren diesen jedoch nicht (kompetitive Antagonisten) (Gourlet et al. 1991; Robberecht et al. 1992).

1.2 PACAP-Rezeptoren sind eine Subfamilie G-Protein-gekoppelter-Rezeptoren

Fünf unterschiedliche transmembrane Rezeptortypen konnten bisher identifiziert werden: Ionenkanäle, Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, Rezeptor-Serin-/Threonin-Kinasen, Zelladhäsionsrezeptoren und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (G-protein coupled receptor [GPCR]). G-Protein-gekoppelte Rezeptoren oder auch 7-Transmembran-Rezeptoren (7-TM-Rezeptor) sind die größte Familie transmembraner Rezeptoren. Diese vermitteln die meisten zellulären Antworten, sowohl auf Hormone und Neurotransmitter als auch während der Detektion von optischen, gustatorischen sowie olfaktorischen Sinneseindrücken (Uings und Farrow 2000).

Der Name 7-TM-Rezeptor geht zurück auf die grundsätzlichsste Eigenschaft dieser Membranproteine. Diese ist charakterisiert durch sieben α -helikale transmembrane Segmente, die durch alternierende intrazelluläre und extrazelluläre Schleifen-Regionen verbunden sind. An den C- und N-Termini dieser Aminosäurepolymere befindet sich zusätzlich je eine extra- bzw. intrazelluläre Domäne. Diese Domänen haben jeweils Einfluss auf die Affinität zu dem entsprechenden Liganden oder die Signaltransduktion. In Vertebraten sind die GPCRs gemeinhin in fünf Familien unterteilt: Rhodopsin (Familie A), Sekretin (Familie B), Glutamat (Familie C), Adhäsion und Frizzled/Taste2 (siehe **Abbildung 1.2**) Obwohl G-Protein-gekoppelte Rezeptoren innerhalb jeder dieser Familien viele gemeinsame Strukturmerkmale haben, hat jeder einzelne dieser 7-TM-Rezeptoren einzigartige Merkmale. Diese sind verantwortlich dafür, dass in der Signaltransduktion sowohl viele G-Protein-abhängige als auch -unabhängige Signalwege und komplexe regulatorische Prozesse durch die unterschiedlichen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren reguliert werden. Ein heterotrimeres G-Protein steht am Anfang der Signalkaskade, die von einem aktivierten G-Protein-gekoppelten Rezeptor ausgeht. Zusätzlich zu den drei Untereinheiten sind mehrere andere Proteine direkt an der 7-Transmembranrezeptor-Signalkaskade beteiligt (Musnier et al. 2010; Rosenbaum et al. 2009; Woehler und Ponimaskin 2009). Die PACAP-

Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, deren Signaltransduktion im Folgenden näher beleuchtet wird (Ohtaki et al., 1990).

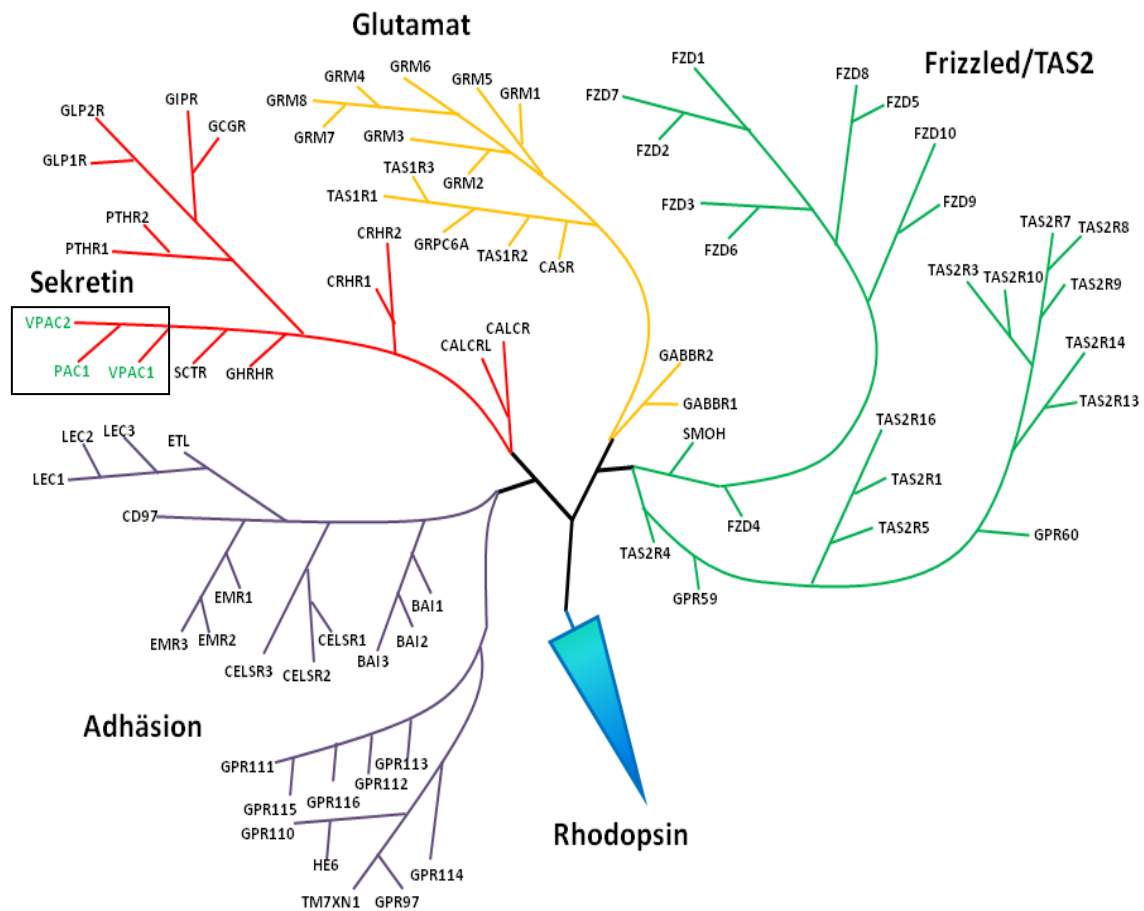


Abbildung 1.2 Phylogenetische Verwandtschaft der PACAP-Rezeptoren im Zusammenhang mit den fünf GPCR-Familien (TM I–TM VII) im humanen Genom (Fredriksson et al. 2003). Die Rhodopsin-Familie ist nicht mit abgebildet. In Grün sind die drei PACAP-Rezeptoren hervorgehoben.

Der Unterschied zwischen den PAC1-Rezeptoren und den VPAC-Rezeptoren 1 und 2 besteht einerseits in der Affinität der Liganden, dem vasoaktiven intestinalen Peptid (VIP) und PACAP, zu dem jeweiligen Rezeptor und andererseits in der Aktivierung unterschiedlicher Signalwege dieser Rezeptoren mit unterschiedlichen Effektoren. Während PACAP mit hoher Affinität an den PAC1-Rezeptor bindet, hat VIP eine sehr niedrige Affinität für den PAC1-Rezeptor. An die VPAC1- und VPAC2-Rezeptoren binden die Liganden VIP und PACAP jedoch mit gleicher Affinität (Vaudry et al. 2009). Die Ursache für die unterschiedliche Bindungsaffinität der Liganden zu den Rezeptoren liegt in den unterschiedlichen Bindungsmotiven. Diese konnten auf der Basis ihrer

relativen Affinitäten zu VIP und PACAP identifiziert werden. Rezeptoren, die das Typ-I-Bindungsmotiv enthalten (PAC1-Rezeptoren), wurden ursprünglich in dem hypophysären Vorderlappen und dem Hypothalamus identifiziert. Zu PAC1 haben PACAP27 und PACAP38 eine sehr hohe Affinität ($K_d \approx 0,5 \text{ nM}$), aber VIP eine sehr viel niedrigere ($K_d > 500 \text{ nM}$) (Cauvin et al. 1990; Cauvin et al. 1991; Gottschall et al. 1990; Lam et al. 1990; Suda et al. 1992). Rezeptoren, deren Bindungsmotiv dem Typ II zugeordnet werden (VPAC1- und VPAC2-Rezeptoren), sind in den peripheren Organen, zu denen auch die Lunge zählt weit verbreitet. Zu VPAC1 und VPAC2 haben sowohl PACAP als auch VIP eine gleich hohe Affinität ($K_d \approx 1 \text{ nM}$) (Gottschall et al. 1990; Lam et al. 1990). Die Expression aller drei PACAP-Rezeptoren ist jedoch nicht zellspezifisch. In vielen Geweben werden unterschiedliche Kombinationen der drei Rezeptoren exprimiert (Tatsuno et al. 1990; Robberecht et al. 1991; Nguyen et al. 1993). Das Expressionsmuster der PACAP-Rezeptoren ist in der Lunge jedoch noch weitgehend unbekannt. Die PACAP-Rezeptoren erhöhen die intrazelluläre cAMP-Konzentration ($[cAMP]_i$) und stimulieren zusätzlich noch weitere sekundäre Botenstoffe wie IP_3 , DAG und Ca^{2+} (siehe **Abbildung 1.3**) (Dickson et al. 2006; McCulloch et al. 2000).

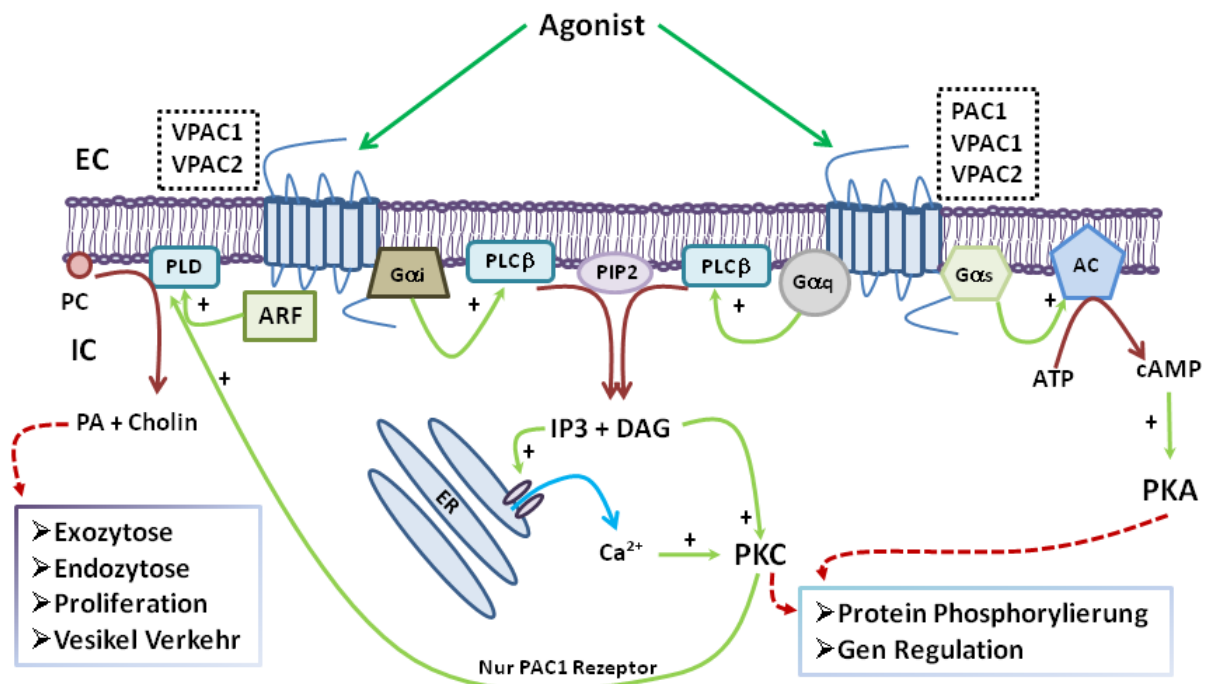


Abbildung 1.3 Intrazelluläre PAC1/VPAC1/VPAC2-Signalwege: Die Abbildung stellt die Hauptsignalwege von VPAC1 und -2 sowie von PAC1 über heterotrimeren G-Proteine dar. Alle PACAP-Rezeptoren aktivieren G α_s sowie G α_q , während VPAC1 und VPAC2 auch G α_i aktivieren. Die Phospholipase D (PLD) wird über PAC1 und die Proteinkinase C (PKC) aktiviert, während VPAC1 und VPAC2 die PLD zusätzlich über ARF aktivieren können. PLC β : Phospholipase C β ; AC: Adenylatzyklase; G α_i : inhibitorisches G-Protein; G α_s : cAMP-Synthese stimulierendes G-Protein; G α_q : Phospholipase C stimulierendes G-Protein; PIP $_2$: Phosphoinositol-4,5-bisphosphat; IP $_3$: Inositol-1,4,5-triphosphat; PKA: Proteinkinase A; ATP: Adenosin-3,5-triphosphat; cAMP: zyklisches Adenosin-3,5-monophosphat; PC: Phosphatidylcholin; PA: Phospholipid; ARF: (Schema nach [Dickson and Finlayson 2009]).

Für den PAC1-Rezeptor wurden bisher 20 Splicevarianten in unterschiedlichen Spezies nachgewiesen (Blechmann und Levkovitz, 2013) siehe auch **Tabelle 1.1**. Allerdings sind die Spezies- und Zellspezifischen Expressionsmuster noch unklar (L. Eiden; Bethesda, USA NIMH; persönliche Kommunikation). Von den 20 Splicevarianten konnten bis zu elf innerhalb einer Spezies (*Rattus norvegicus*) nachgewiesen werden. Im Menschen ist die Anzahl der Splicevarianten noch nicht genau bestimmt und reicht von vier bis zu elf Splicevarianten (Blechman und Levkovitz 2013; Dickson und Finlayson 2009). Im Folgenden werden die Funktionen der wichtigsten PAC1-Splicevarianten näher beleuchtet. Die bisher beschriebenen Splicevarianten unterscheiden sich in einer intrazellulären Schleife oder in der N-terminalen Region (Dautzenberg et al. 1999). Die Splicevarianten in der intrazellulären Schleife konzentrieren sich zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne. Dies ist die dritte intrazelluläre Schleife (Spengler et al. 1993). Zuerst konnten die

Splicevarianten PAC1 null, hip, hop1, hop2 und hiphop1 nachgewiesen werden, etwas später dann hiphop2 (Journot et al. 1995). Die genannten Splicevarianten wurden aus cDNA-Bibliotheken unterschiedlicher neuronaler Gewebe der Ratte nachgewiesen. Das Exon 14, das für die hip-Variante kodiert, umfasst genau wie das Exon 15, das für die hop1-Variante kodiert, 28 Aminosäuren. Die hop2-Variante wird ebenfalls durch das Exon 15 codiert, umfasst jedoch ein Codon weniger und ist damit 27 Aminosäuren lang. Es konnte gezeigt werden, dass die hip-Variante im Vergleich zur null-Variante des Rezeptors für einen etwas schwächeren $[cAMP]_i$ -Anstieg bei Aktivierung durch PACAP charakteristisch ist, ohne dass eine PLC-Aktivierung stattfindet. Während VIP den Anstieg des $[cAMP]_i$ etwas potenter aktiviert, hat die hop1-Variante eine etwas schwächere Affinität zu VIP. Es lassen sich hingegen keine Unterschiede in der Aktivität feststellen, wenn PACAP den Rezeptor aktiviert. Letzteres wurde auch für die hop2-Variante festgestellt. Die hiphop1- und hiphop2-Varianten aktivieren beide die PLC nur reduziert (Spengler et al. 1993; Lutz et al. 2006). Zusätzlich gibt es noch einige exotische Splicevarianten, die bisher nur bei Fröschen (*Rana ridibunda*) und in Zebrafischen (*Danio rerio*) nachgewiesen wurden (Alexandre et al. 2002; Fradinger et al. 2005).

Die Splicevarianten des N-Terminus von PAC1 werden 3a, short (s) und very short (vs) genannt. Die Varianten 3a (24 Aminosäuren länger als die null-Variante) und vs (57 Aminosäuren-Deletion, Exons 4 bis -6) konnten in cDNA-Bibliotheken von unterschiedlichen Rattengeweben nachgewiesen werden, während die s-Variante (21 Aminosäuren kürzer, Exon 5 und -6) in einer murinen cDNA-Bibliothek eines fötalen Gehirns entdeckt wurde. Die 3a-Variante vermittelt eine geringfügig gesenkte Aktivierung sowohl der Adenylatzyklase als auch der PLC. Während die s-Variante eine schwache Präferenz für PACAP27 aufweist, hat die vs-Variante eine reduzierte Affinität zu PACAP. PACAP wird jedoch durch die vs-Variante weiterhin vor VIP präferiert (Dautzenberg et al. 1999; Pantaloni et al. 1996; Daniel et al. 2001). Die verbleibende Splicevariante wird PAC1-short-hop1 (shop1) genannt. Diese Splicevariante setzt sich aus der Kombination der oben genannten Varianten zusammen. Für diese Splicevariante konnte gezeigt werden, dass die PACAP27-Aktivierung stärker ausfällt als die durch PACAP38 ausgelöste (vgl. **Abbildung 1.4**) (Braas und May 1999; Lutz et al. 2006).

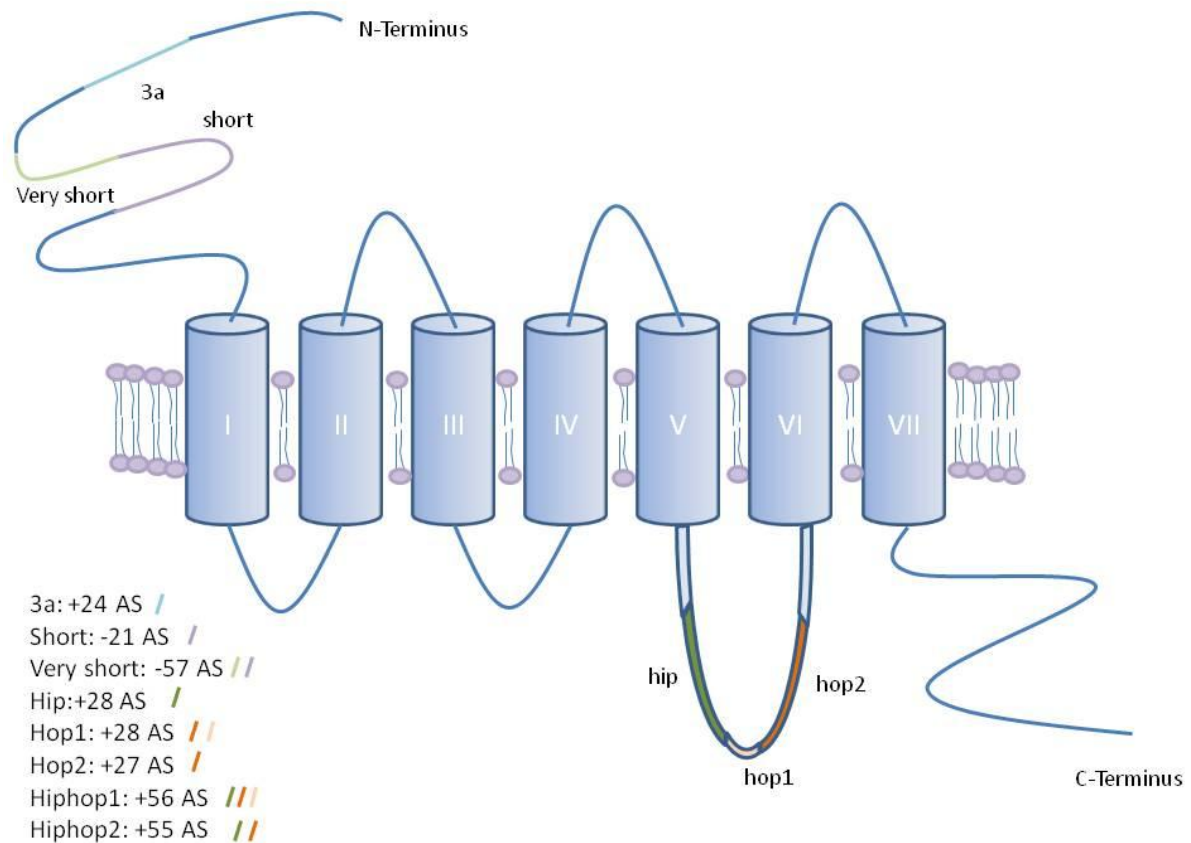


Abbildung 1.4 Die wichtigsten Splicevarianten des PAC1-Rezeptors. Die Anzahl der Aminosäuren, die eine Splicevariante mehr oder weniger haben, bezieht sich auf die PAC-null-Splicevariante. Die very-short-Splicevariante beinhaltet das Stück der short-Variante. Zusätzlich zu den dargestellten Splicevarianten gibt es eine short/hop1-Splicevariante und mehrere Splicevarianten in anderen Arten wie Zebrafisch und Krallenfrosch (modifiziert nach Dickson und Finlayson 2009).

Die Expression fast aller PAC1-Splicevarianten ist im Gehirn nachweisbar. PAC1 null und PAC1 hop sind die am stärksten exprimierten Splicevarianten des PAC1-Rezeptors (Spengler et al. 1993; Zhou et al. 2000). Die s-Variante wurde in Nebenniere, Thalamus und Hypothalamus nachgewiesen, während hip im Bulbus olfaktorius und dem Hippocampus detektiert wurde (Pantaloni et al. 1996; Chatterjee et al. 1996). Das komplette Expressionsprofil der PAC1-Splicevarianten ist jedoch noch nicht abschließend untersucht worden. Über die Verteilung der PAC1-Splicevarianten in Tumoren ist noch sehr wenig bekannt. Der Kenntnisstand über sämtliche bis heute bekannten PAC1-Splicevarianten ist in **Tabelle 1.1** zusammengefasst.

Tabelle 1.1 Tabelle aller bekannten Splicevarianten von PAC1. Die fett gedruckten Splicevarianten des Menschen waren in der NCBI-Gendatenbank auffindbar. Nach Blechman und Levkovitz 2013 P38=PACAP38, P27=PACAP27, dx=deletion des Exons x

PAC1 Isoform	Spezies	Signaltransduktion	Referenz
null	Ratte, Maus, Mensch , Zebrafisch	Starke Affinität P38≈P27>>VIP Gα _s -aktivierung [cAMP] Anstieg Gα _q -aktivierung PLC-Aktivierung und Freisetzung von Ca ²⁺	Spengler et al. (1993), Wei et al. (1998), Grumolato et al. (2003), Fradinger et al. (2005), Lutz et al. (2006), Ushiyama et al. (2007, 2010), Chafai et al. (2011), Holighaus et al. (2011)
hop1 SV2*	Ratte, Maus, Mensch	Starke Affinität P38≈P27>>VIP Gα _s -aktivierung [cAMP] Anstieg Gα _q -aktivierung PLC-Aktivierung und Freisetzung von Ca ²⁺	Spengler et al. (1993), Pisegna und Wank, 1996, Pisegna et al. (1996), McCulloch et al. (2002), Ronaldson et al. (2002), Mustafa et al. (2007), May et al. (2010), Holighaus et al. (2011)
hop1 novel	Ratte	Starke Affinität P38≈P27>>VIP Keine G-Protein-aktivierung	Abu-Hamdan et al. (2006)
hop2	Ratte, Zebrafisch	Starke Affinität P38≈P27>>VIP Gα _s -aktivierung [cAMP] Anstieg Keine Gα _q -aktivierung	Spengler et al. (1993), Cavallaro et al. (1995), Wei et al. (1998), Grimaldi und Cavallaro (1999), Pilzer und Gozes (2006b)
hip SV1*	Ratte, Mensch	Niedrige Affinität P38≈P27>>VIP Schwache Aktivierung Gα _s -aktivierung [cAMP] Anstieg Gα _q -aktivierung PLC-Aktivierung Keine Freisetzung von Ca ²⁺	Spengler et al. (1993), Journot et al. (1995), Pisegna und Wank, 1996, Pisegna et al. (1996), Ronaldson et al. (2002), Germano et al. (2004), Lutz et al. (2006)
hip-hop SV3	Ratte, Mensch	Niedrige Affinität P38≈P27>>VIP Schwache Aktivierung Gα _s -aktivierung [cAMP] Anstieg Gα _q -aktivierung PLC-Aktivierung Keine Freisetzung von Ca ²⁺	Spengler et al. (1993), Pisegna und Wank, 1996, Pisegna et al. (1996), Lu et al. (1998), Abu-Hamdan et al. (2006)
short d5,6	Ratte, Maus, Mensch	Starke Affinität P38≈P27>VIP Schwache Aktivierung Gα _s -aktivierung [cAMP] Anstieg Gα _q -aktivierung PLC-Aktivierung Keine Freisetzung von Ca ²⁺	Pantaloni et al. (1996), Dautzenberg et al. (1999), Lutz et al. (2006), Ushiyama et al. (2007, 2010)
short hop1 d5,6 hop1	Ratte, Maus, Mensch	Starke Affinität P38≈P27>>VIP Gα _s -aktivierung [cAMP] Anstieg Gα _q -aktivierung PLC-Aktivierung und Freisetzung von Ca ²⁺	Dautzenberg et al. (1999), Lutz et al. (2006), Ushiyama et al. (2007, 2010)
d5,6-hip	Mensch	Starke Affinität P38≈VIP Schwache Aktivierung von Gα _s - aktivierung [cAMP] Anstieg Gα _q -aktivierung PLC-Aktivierung Keine Freisetzung von Ca ²	Lutz et al. (2006)
very short d4,5,6	Ratte, Mensch	Niedrige Affinität P38≈P27>VIP Schwache Aktivierung von Gα _s - aktivierung [cAMP] Anstieg	Pantaloni et al. (1996), Dautzenberg et al. (1999), Lutz et al. (2006)
3a	Ratte	Sechsfach erhöhte Affinität zu P38 Schwache Aktivierung von Gα _s - aktivierung [cAMP] Anstieg Schwache Gα _q -aktivierung PLC- Aktivierung Keine Freisetzung von Ca ²	Daniel et al. (2001), Ajpru et al. (2002), Pilzer and Gozes (2006b)

PAC1 Isoform	Spezies	Signaltransduktion	Referenz
Pac-TM4	Ratte	P38≈P27 Schwache Aktivierung der G-Proteine eingeschränkte Freisetzung von Ca ²⁺	Chatterjee et al. (1996), Ajpru et al. (2002)
d5	Mensch	Starke Affinität P38≈P27>VIP Aktivierung von Gα _s -aktivierung [cAMP] Anstieg Schwache Gα _q -aktivierung PLC-Aktivierung Keine Freisetzung von Ca ²⁺	Lutz et al. (2006)
d5hop1	Mensch	Affinität zu PACAP nicht detektierbar Aktivierung von Gα _s -aktivierung [cAMP] Anstieg Schwache Gα _q -aktivierung PLC-Aktivierung Keine Freisetzung von Ca ²⁺	Lutz et al. (2006)
d5hip	Mensch	Affinität P38≥VIP Schwache Aktivierung von Gα _s -aktivierung [cAMP] Anstieg	Lutz et al. (2006)
d5,6,14–17	Mensch	Starke Affinität P38≈P27>VIP Keine Aktivierung der G-Proteine Keine Freisetzung von Ca ²⁺	Lutz et al. (2006)
skip	Zebrafisch	Keine Affinität zu PACAP Keine Aktivierung der G-Proteine Keine Freisetzung von Ca ²⁺	Fradinger et al. (2005)
R25	Frosch	Affinität P38>VIP Aktivierung von Gα _s -aktivierung [cAMP] Anstieg	Alexandre et al. (2002)
R41	Frosch	Affinität P38>VIP Aktivierung von Gα _s -aktivierung [cAMP] Anstieg	Alexandre et al. (2002)
Rmc	Frosch	Affinität P38>VIP Verhindert cAMP-Bildung Gα _i -aktivierung?	Alexandre et al. (2002)

1.3 PACAP und seine Rezeptoren in Bronchialkarzinomen

Bereits vor 20 Jahren haben Terry Moody und seine Mitarbeiter aufgrund ihrer pharmakologischen Studien postuliert, dass Zelllinien vom kleinzelligen Bronchialkarzinom PACAP-Rezeptorbindungsstellen aufweisen (Moody et al. 1993).

1.3.1 Bronchialkarzinome

Bronchialkarzinome gehören zu den malignen Neoplasien, diese sind schnell proliferierend, invasiv, metastasierend, und Mutationen kumulieren vergleichsweise schnell. Die Inzidenz von Bronchialkarzinomen lag 2008 bei 1,6 Mio. weltweit erfasster Neuerkrankungen, das sind 13 % aller Krebsneuerkrankungen. Bronchialkarzinome weisen mit 1,4 Mio. der Krankheit Erlegenen zudem eine sehr hohe Mortalität auf. Das sind 18 % aller Todesfälle, die durch Krebs verursacht wurden. Keine andere Krebsvariante ist für mehr Todesfälle verantwortlich (Jemal et al. 2011). Über 50 histologische Varianten von malignen bronchialen Neoplasien konnten bis 2004 katalogisiert werden (Travis et al. 2006).

1.3.2 Histologische und molekulare Unterschiede in Bronchialkarzinomen

Maligne Neoplasien der Lunge werden grundsätzlich in nicht kleinzellige (70 % bis 90 %) und kleinzellige Karzinome (10 % bis 30 %) unterteilt. Zu den nicht kleinzelligen Karzinomen gehören die großzelligen Bronchialkarzinome, die Adenokarzinome und die Plattenepithelkarzinome. Selten treten auch das Adenoplattenepithelkarzinom und das sarcomatoide Karzinom auf (<http://salerno.uni-muenster.de/data/bl/content/b/bronchia000b.htm>, 23.10.12; <http://www.cancer.org/cancer/lungcancer-non-smallcell/detailedguide/non-small-cell-lung-cancer-what-is-non-small-cell-lung-cancer>, 23.10.12).

Kleinzellige Bronchialkarzinome gehören zu den neuroendokrinen Tumoren der Lunge. Typische histologische Färbungen sind Hämatoxylin- und Eosin-Färbungen. Immunohistochemisch kann ein kleinzelliges Bronchialkarzinom mit Pancytokeratin-Antikörpern nachgewiesen werden (Travis, 2009). Darüber hinaus ist bekannt, dass 70 % bis 80 % aller kleinzelligen Bronchialkarzinome den Thyroidalen Transkriptionsfaktor 1 (TTF-1) exprimieren. Zusätzlich sind Chromogranine, insbesondere Chromogranin A, CD56, Synaptophysin und der Proliferationsmarker Ki-67 typisch für ein kleinzelliges Bronchialkarzinom (Travis et al. 2006). Kleinzellige Bronchialkarzinome exprimieren zu 85 %

wenigstens eines der folgenden Peptide: Gastrin-releasing-peptide, Neuromedin-B und seine Rezeptoren, wie z. B. den Bombesin-Rezeptor 3. Diese Karzinome können auch eines oder mehrere der im Folgenden aufgeführten Neuropeptide exprimieren und gegebenenfalls in großen Mengen sekretieren: Substanz P, PGP 9.5 sowie Somatostatin und den Somatostatin-Rezeptor. Die Sekretion und anschließende Bindung von Somatostatin an seinen Rezeptor führt zur Aktivierung desselben und damit zu einer autokrinen Schleife. Diese stimuliert die Proliferation der malignen Zellen. Darüber hinaus können weitere Proteine des Neuroendokrinen Systems exprimiert werden wie vesikuläre Transporter oder die Tyrosinhydroxylase (Taniwaki et al. 2006; Rubin und de Sauvage 2006; Sriuranpong et al. 2001; Collins et al. 2004).

Das Ausmaß der Expression des PACAP-Systems im kleinzelligen Bronchialkarzinom war zu Beginn dieser Arbeit noch unklar.

1.3.3 Murine und humane Zelllinien unterschiedlicher kleinzelliger Bronchialkarzinome

Aus einem kleinzelligen Bronchialkarzinom der C57/b6-Maus wurde 1951 die erste Zelllinie dieses Tumors von M. R. Lewis etabliert und nach ihm benannt (Lewis lung carcinoma 1; LLC1). LLC1-Zellen wurden verwendet, um Chemotherapeutika zu testen und das Tumor-Wirt-Verhältnis zu erforschen (Bertram und Janik 1980). Die Zelllinie wurde bereits mehrfach für Simulationsmodelle von Lungentumortransplantaten eingesetzt oder zur Bildung subkutaner Tumore, sogenannter LLC1-Transplantate verwendet (Algire et al. 2008; Savai et al. 2009; Sasi et al. 2012).

Die Zelllinien NCI-H60, -H69, -H82, -H146, -H187, -H209 und -H345 sind klassische humane kleinzellige Bronchialkarzinomzelllinien und Varianten dieser klassischen Karzinome. Diese wurden vom National Cancer Institute of USA (NCI) insbesondere entwickelt, um Stoffe (potentielle Chemotherapeutika) auf deren Wirksamkeit als Krebsmedikament zu testen (Patnaik et al. 2012; North et al. 2010; Salido et al. 2009; Salcido et al. 2010; Yenjai und Wanich 2010; Zinn et al. 2013; Moody et al. 2012).

Ausser der NCI-H345 Zelllinie, die von Moody verwendet wurde, wurden die genannten Zelllinien noch nicht auf das PACAP-System untersucht.

1.3.4 PACAP und seine Rezeptoren in Bronchialkarzinomen

PACAP-Rezeptoren konnten sowohl in kleinzelligen Bronchialkarzinomen als auch in nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen nachgewiesen werden (Moody et al. 1993; Moody et al. 1997). Die PACAP-Rezeptor-vermittelten Effekte auf Bronchialkarzinomzellen sind aber weitestgehend ungeklärt. Auch in neoplastischen Zelllinien anderer Gewebe, wie z. B. Brust oder Pankreas, werden Typ-II-PACAP/VIP-Rezeptoren und zum Teil auch Typ-I-PACAP-Rezeptoren exprimiert (Schulz et al. 2004). In der kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinie NCI-H345 stimuliert PACAP die Zellproliferation. Ebenso verhält es sich in neoplastischen Zelllinien anderer Gewebe wie Pankreas sowie undifferenzierten Zellen der Neuralleiste. Diese Zellen werden durch PACAP in subnanomolaren Konzentrationen zur Proliferation, in höheren Konzentrationen jedoch zur Differenzierung angeregt und vor Apoptose geschützt. Kurzzeitige Exposition von LNCaP-Prostatakarzinomzellen mit PACAP stimuliert deren Proliferation, während Langzeitexposition eine Differenzierung zu einem neuroendokrinen Phänotyp zur Folge hat (Moody et al. 1993; Moody et al. 1997; Douziech et al. 1998; Deutsch et al. 1993; Deguil et al. 2007).

In anderen neoplastischen Zellen, wie Kolon-Adenokarzinom- oder T98G-Glioblastomzellen, wirkt PACAP antiproliferativ (Lelievre et al. 1998; Lelievre et al. 1998; Vertongen et al. 1996). In einigen Tumorzellen stammt der antiproliferative Effekt von PACAP daher, dass Hedgehog antagonisiert wird (Waschek et al. 2000; Waschek et al. 2006). In PC12-Zellen inhibiert PACAP ebenfalls die Proliferation, fördert das Zellüberleben, induziert jedoch auch das Neuritenwachstum (Deutsch und Sun 1992; Lazarovici et al. 1998; Vaudry et al. 2002). In einigen Tumorzellen scheint PACAP jedoch auch die Differenzierung oder Zellüberleben zu stimulieren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß PACAP auf Tumorzellen sehr unterschiedliche und sogar paradoxe Wirkungen haben kann, da es in vielen Tumorzelltypen die Proliferation entweder stimuliert oder inhibiert. Dies scheint von der Verschaltung der PACAP-Signaltransduktion mit unterschiedlichen Signalwegen zusammenzuhängen.

1.3.5 Der Hedgehog-Wachstumssignalweg im kleinzelligen Bronchialkarzinom mit Bezug zur PACAP-Signaltransduktion

Die PACAP-Signaltransduktion greift stromabwärts in den Hedgehog-Wachstumssignalweg ein, der mittels eines transmembranen Rezeptors funktioniert. Insgesamt gibt es drei Signalpeptidfamilien, die normalerweise die Stammzell-Selbsterneuerung regulieren. Wenn anomal aktiviert, können sie jedoch neoplastische Proliferation verursachen, was ein frühes Zeichen für Tumorigenese darstellt (Peacock und Watkins 2008; Pardal et al. 2003). Neuroendokrine Zellen sind die ersten identifizierbaren und differenzierten Zellen der sich entwickelnden Lunge, die zugrunde liegenden Regulationen werden durch das Notch-Peptid aktiviert. Es gibt Anzeichen dafür, dass die kleinzelligen Bronchialkarzinome eine große Ähnlichkeit mit Stammzellen in der Lunge haben und ein Expressionsprofil aufweisen, das dem der frühen Lungenentwicklung ähnelt. Die Entwicklung eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms beruht auf Fehlentwicklungen im Notch-Signalweg und der Aktivierung des Hedgehog-Signalwegs, wie er in der frühen Lungenentwicklung üblich ist (Liu et al. 2006; Watkins et al. 2003). Bisher konnte nur gezeigt werden, dass der Hedgehog-Signalweg mit der PAC1-Signalkaskade interagiert (Meyer, 2006).

In dieser Signalpeptidfamilie gibt es beim Menschen drei bekannte Peptide: Sonic Hedgehog (SHh), Indian Hedgehog (IHh) und Desert Hedgehog (DHH). Die Signalkaskade wird aktiviert, wenn ein Ligand an den Patched-1-Rezeptor (Ptch-1), ein Zwölf-Transmembranprotein, bindet. Konstitutiv inhibiert Ptch-1 das Sieben-Transmembranprotein Smoothened (Smo), indem es an Letzteres bindet. Wenn jedoch ein Hh-Ligand an Ptch-1 bindet, diffundiert Smo von Ptch-1 ab, und ist somit aktiviert. Stromabwärts wird dann die Transkription unterschiedlicher Proteine angeregt, zu denen unter anderen auch Ptch-1 gehört.

Die Aktivierung des Hh-Signalwegs findet bei erwachsenen Menschen nicht mehr in signifikantem Umfang statt. Die an der Signaltransduktion beteiligten Proteine sind nur noch sehr niedrig in der basalen Schicht des Bronchialepithels exprimiert. Wird der Hh-Signalweg jedoch aktiviert, führt diese Aktivierung zu einer Expansion der intraepithelialen Zellpopulation (D'Angelo und Pietanza

2010; Watkins et al. 2003; D'Angelo und Pietanza 2010). Daraus folgt direkt die Entwicklung neuroendokriner Zellen.

Im kleinzelligen Bronchialkarzinom ist die Aktivierung des Hh-Signalwegs abhängig von der parakrinen Sekretion von SHh durch benachbarte Zellen (Peacock und Watkins 2008; Watkins et al. 2003). PACAP scheint in einigen Tumorarten die proliferationsfördernde Hedgehog-Signaltransduktion zu antagonisieren (Waschek et al. 2000).

1.3.6 PACAP-Signaltransduktion und der Phosphoinositid-3-Kinase-Weg

Im kleinzelligen Bronchialkarzinom ist der Phosphoinositid-3-Kinase-(PI3K)/AKT/mTOR Signalweg defekt und konstitutiv aktiviert. Dieser Signalweg reguliert zelluläre Funktionen wie Zellproliferation, Zellüberleben, Motilität, Adhäsion und Differentiation. Verantwortlich für diese Aktivierung sind Mutationen in der PI3K und der Tensin-homologen Phosphatase (PTEN), die so ein verstärkt aktiviertes AKT-Enzym bedingen. In 70 % aller kleinzelligen Bronchialkarzinome ist AKT phosphoryliert und die Expression von mTOR, S6K1 und phosphoryliertem 4EBP1 sind vergleichsweise zu Typ-II-Epithelzellen angehoben (Engelman 2009; Liu et al. 2009; Shibata et al. 2009; Fischer et al. 2007). Die PI3K ist mit der PACAP-Signalkaskade über die PLC verbunden, die wie unter beschrieben IP_3 und DAG freisetzt und damit die Aktivität der PKC anregt sowie Ca^{2+} aus zellinternen Speichern freisetzt.

1.3.7 Zielgene der PACAP Signalkaskade: Stathmin 1 und Stanniocalcin 1

Stathmin 1 ist auch unter dem Namen Onkoprotein 18 (Op18) bekannt (Hanash et al. 1988). Es ist ein cytoplasmatisch lokalisiertes kleines Protein von 18 kDa und um abzubauen Tubulin im Cytoplasma höher konzentriert. Zusätzlich erfüllt es auch während der Mitose Aufgaben wie den Abbau der Spindeln des Spindelapparats (Belmont und Mitchison 1996; Küntziger et al. 2001) (Maucuer et al. 1993). Stathmin 1/Op18 ist auch dafür bekannt, die „Katastrophe“, also den Abbau von Tubulin-Polymeren im Cytosol, zu beschleunigen (Gavet et al.

1998). Es wird schon fünf Minuten nach einer Aktivierung durch PACAP in PC12-Zellen phosphoryliert und dadurch gehemmt (Dejda et al. 2010; Hanash et al. 1988). Stathmin 1 ist in verschiedenen Tumorzellen (Mamma CA, Ovarial CA, und Leukämien) stark überexprimiert (Curmi et al. 2000; Price et al.; 2000 Hanash et al. 1988; Maucuer et al. 1993, Belmont und Mitchison 1996, Gavet et al. 1998, Küntziger et al. 2001). Eine Hemmung oder ein Ausschalten von Stathmin 1 führt in Mammakarzinomen mit dominant-negativ mutiertem P53-Gen zum Zellzyklusarrest und macht Stathmin 1 exprimierende Tumoren, anfälliger für Chemotherapeutika wie Paclitaxel und Vinblastin (Alli et al. 2007).

Stanniocalcin 1 wird in vielen Karzinomen überexprimiert, unter anderen dem nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom (Yeung et al. 2012; Du et al. 2011). Stanniocalcin 1 ist ein Peptid, das als homodimeres Glykoprotein autokrin und parakrin wirken kann. Die Expression des Gens von Stanniocalcin 1 wird durch PACAP über einen cAMP-abhängigen, PKA-unabhängigen Signalweg hochreguliert (Chang et al. 1995; Chang et al. 1996; De Niu et al. 2000; Holighaus et al. 2012). Die Expression von Stanniocalcin 1 wird auch durch den Hypoxia-inducible-factor-1 (HIF-1) hochreguliert. Das führt zur Expression des vascular endothelial growth factor (VEGF) und damit zur Vaskularisierung des sezernierenden Gewebes (He et al. 2011). Darüber hinaus wurden für Stanniocalcin 1 proliferationsfördernde-, die Differenzierung beeinflussende und sowohl pro- als auch antiapoptotische Effekte nachgewiesen (Zhang et al. 1998; Daniel und Lange 2009; Wu et al. 2006; Zhang et al. 2000).

Erstaunlicherweise gab eine Literaturrecherche in Pubmed keine Treffer (Stand Oktober 2013), ob Stanniocalcin 1 oder Stathmin 1 im kleinzelligen Bronchialkarzinom exprimiert wird.

Die möglichen Interaktionen des PACAP-Signaltransduktion mit Hedgehog und Phosphoinositid-3-Kinase abhängigen Signalwegen im kleinzelligen Bronchialkarzinom ist in **Abbildung 1.5** schematisch zusammengefasst.

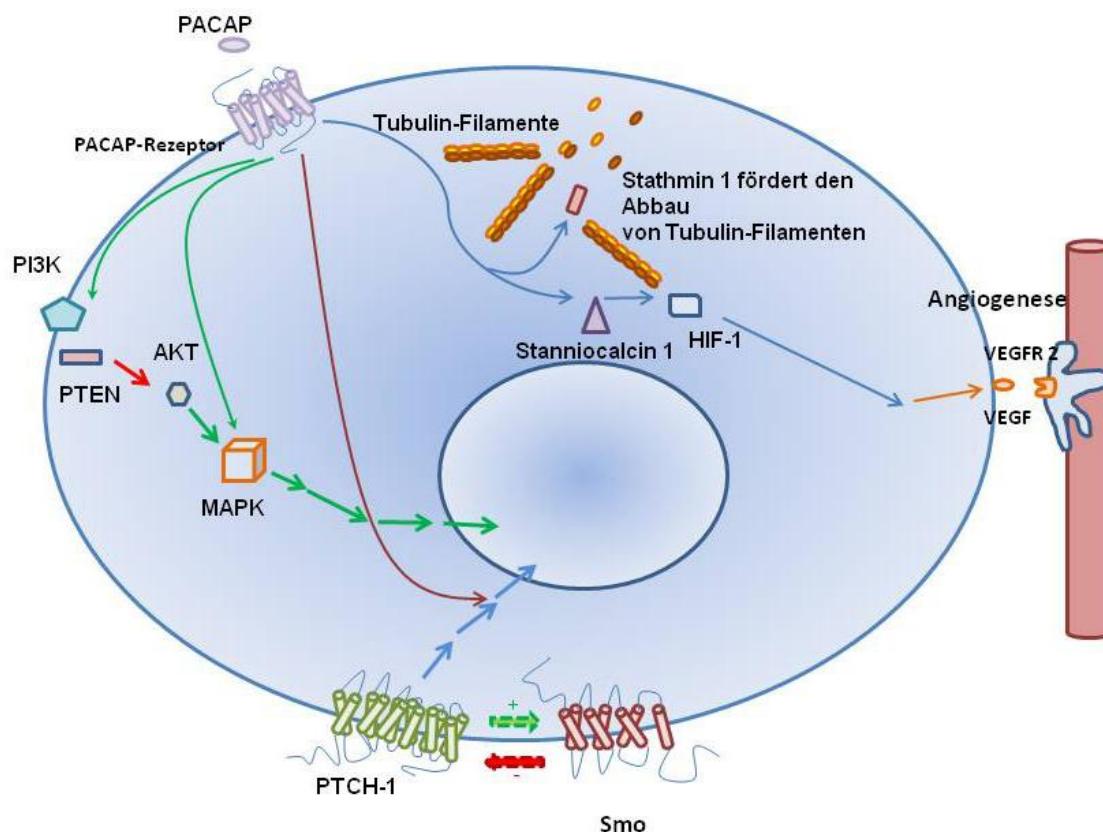


Abbildung 1.5 Schematische Zusammenfassung der im Text beschriebenen Signalwege und Faktoren des kleinzelligen Bronchialkarzinoms, die mit der PACAP-Signaltransduktion auf molekularer Ebene kommunizieren. Referenzen siehe im Text.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Zielsetzung der Arbeit basiert auf frühen Beobachtungen von Terry Moody. Diese Arbeiten lieferten aufgrund pharmakologischer Wirkungen von Agonisten und Antagonisten der VIP-/PACAP-Familie auf Bronchialkarzinomzelllinien erste Evidenzen, dass diese funktionelle VIP-/PACAP-Rezeptoren exprimieren, ohne dass die diesen Wirkungen zugrunde liegenden Rezeptoren (PAC1, VPAC1, VPAC 2) differenziert wurden.

Deshalb setzte sich die vorliegende Arbeit als ein Ziel, die mRNA-Expressionsprofile der PAC1-, VPAC1- und VPAC2-Rezeptoren in murinen LLC1-Tumorzelllinien und ihren subkutanen und pulmonalen Transplantaten sowie in verschiedenen Zelllinien und Gewebeproben des humanen kleinzelligen Bronchialkarzinoms zu differenzieren.

Für den PAC1-Rezeptor wurde dabei eine detaillierte Aufschlüsselung der Expressionsprofile sämtlicher bekannter Splicevarianten angestrebt.

Darüber hinaus sollte die Funktionalität des PAC1-Rezeptors in der LLC1-Zelllinie mithilfe einer Versuchsreihe getestet werden, die sich des physikalischen Phänomens des Förster-Resonanzenergietransfer-(FRET)-Effekts bedient und die durch die PAC1-Rezeptoraktivierung ausgelöste cAMP-Synthese messbar macht. Nach erfolgtem Nachweis der Funktionalität des PAC1-Rezeptors sollten der Einfluss von PAC1-Aktivierung durch PACAP27, PACAP38 und Maxadilan auf die Proliferation in der LLC1-Zelllinie bestimmt werden. Entsprechend sollten in der humanen NCI-H82-Zelllinie die Proliferations- und zusätzlich die Cis-Pt-abhängige Apoptoserate bestimmt werden, um zu erfassen, ob die Aktivierung des PAC1-Rezeptors humane kleinzellige Bronchialkarzinome beeinflussen könnte.

Sowohl in der LLC1-Zelllinie als auch in humanen SCLC-Zellen sollte nach der Expression der tumorrelevanten PAC1-Zielgene Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 und ihrer Beeinflussbarkeit durch den PAC1-spezifischen Liganden Maxadilan und der nonselektiven PACAP-/VIP-Rezeptorliganden PACAP38 und PACAP27 gefahndet werden.

Mit den durch diese Untersuchungen erzielten Ergebnissen sollten neue Einblicke gewonnen werden, inwieweit spezifische PACAP-Rezeptoren und ihre Splicevarianten als neue Targets für eine gezielte pharmakologische Beeinflussung und für die Tumorbildgebung genutzt werden können. Zusätzlich soll ermittelt werden in wie weit kombinierte Genexpressionsprofile des VIP/PACAP-Systems und der PAC1-Zielgene Stathmin 1 und Stanniocalcin 1 als Tumormarker zur Differenzierung, Tumordiagnostik und-prognostik kleinzelliger Bronchialkarzinome im Sinne einer personalisierten Medizin instrumentalisiert werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Zentrifugen

Tischzentrifuge Typ Biofuge pico	Heraeus (Hanau)
Tischzentrifuge Typ Biofuge 13	Heraeus (Hanau)
Universalzentrifuge Typ Multifuge 3 L-R	Heraeus (Hanau)
Vakuumzentrifuge Speedvac	Heraeus (Hanau)
Hochleistungszentrifuge Typ J-26 XP	Beckmann Coulter (Krefeld)
Rotor JA-10	Beckmann Coulter (Krefeld)

Inkubatoren

Begasungs-Brutschrank B 5061 EK	Heraeus (Hanau)
Hybridisierungssofen 400 HY-E	Bachofer (Reutlingen)
Inkubationsofen (42 °C/60 °C)	Heraeus (Hanau)
Schüttelinkubator Certomat H (Melsungen)	B. Braun Biotech International

Elektrophorese

Dokumentationsanlage Gel Doc 1000	BIO-RAD (München)
Thermodrucker Video Copy Processor	Mitsubishi Electric (Tokio, Japan)
Zubehör zur Agarosegelelektrophorese	Kodak Bio Max / Integra Biosciences AG (Fernwald)

Mikroskopie und digitale Bildanalyse

Dunkelfeldbeleuchtung Fiber-Lite 180	Dolan Jenner Industries (Boxborough, MA, USA)
Kaltlichtlampe Highlight 3000	Olympus (Hamburg)
Kamera SPOT RT Slider	Diagnostics Instruments Inc. (Sterling Heights, MI, USA)
MCID Elite™ 7.0 Software	Imaging Research Inc. (St. Catharines, Kanada)

Mikroskop AX70	Olympus (Hamburg)
Mikroskop BX40	Olympus (Hamburg)
Mikroskop IX70	Olympus (Hamburg)
Mikroskop SZH10 research stereo	Olympus (Hamburg)

Autoradiographie

Autoradiographieemulsion NTB-2	Kodak / Integra Biosciences GmbH (Fernwald)
Autoradiographieemulsion Ilford K5	Ilford Ltd (Cheshire, England)
Autoradiographiefilm Kodak BioMax MR	Carestream Health Inc. (Rochester, USA) (früher Kodak Health Group)
Autoradiographiekassetten	MS Laborgeräte (Heidelberg)
Entwickler Developer D-19	Kodak / Integra Biosciences GmbH (Fernwald)
Entwickler Roentoroll 25 KG	Tetenal Photowerk GmbH & Co. (Norderstedt)
Fixierer Fixer	Kodak / Integra Biosciences GmbH (Fernwald)
Fixierer Superfix 25	Tetenal Photowerk GmbH & Co. KG (Norderstedt)
Netzmittel Mirasol 2000 Antistatic	Tetenal Photowerk GmbH & Co. KG (Norderstedt)
¹⁴ C-Radioaktivitätsstandards-Objektträger	ARC Inc. (St. Louis, USA)
Plastikwannen	Neolab (Heidelberg)

Material und Methoden

Sonstige Geräte und Verbrauchsmaterialien

10-ml-Kulturröhrchen	Falcon™,	BD (Franklin Lakes, NY, USA)
15-ml-Schraubverschlussröhrchen		Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
24-Well-Kulturplatten		Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
5-ml-Rundbodenröhrchen		Falcon™, BD (Franklin Lakes, NY, USA)
Analysewaage Typ SBC-33		Scaltec Instruments GmbH (jetzt Denver Instruments, Göttingen)
Autoklav		Integra BioSciences Inc. (Woburn, USA)
Sterilbank (Microflow/Biological Safety C.)		Nunc, Wiesbaden-Biebrich
Corex Zentrifugenröhrchen		Herolab GmbH (Wiesloch)
Deckgläser		Menzel (Braunschweig), ehemals Pharmacia Biotech
Einbettmedium Tissue Tek O.C.T.		Sakura Finetek (Zoeterwoude, Niederlande)
Einmalpasteurpipetten		Greiner bio-one (Frickenhausen)
Eismaschine		Enodis (Herborn)
Elektroporationsküvetten (2 mm)		Equibio Ltd. (Maidstone Kent, England)
Elektroporator Micro Pulser		BIO-RAD (München)
Gene Amp PCR System 9700		Applied Biosystems (Foster City, USA)
Glasgefäße		Schott AG (Mainz)
Heizplatten		IKA Labortechnik (Staufen)
Homogenisator „Pellet pestle“		Sigma Aldrich (Hamburg)
Kanülen 26G ½		HMD Healthcare (Horsham, UK)
Kolbenhubpipetten		Eppendorf (Hamburg), Gilson S.A.S (Frankreich)
Kontaminationsmonitor LB 122		Berthold Technologies (Bad Wildbad)

Kryoröhrchen Cryotubus (Wiesbaden)	Nunc GmbH & Co KG
Kryoschalen Cryomolds	Miles inc. (Elkhart, USA)
Kryostat CM3050S	Leica (Nussloch)
Micro Bio-Spin P30 Columns	BIO-RAD (München)
Objektträger Superfrost	Menzel (Braunschweig)
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging (Menasha, USA)
PCR 96-Well TW-MT-Platte	Biozym (Hamburg)
EU Wide Optical 8-Cap-Strip	Biozym (Hamburg)
Power SybR Green	Applied Biosystems (Carlsbad California USA)
PCR-Gefäße 0,2 ml	BRAND GmbH und CO KG (Wertheim)
Peltier Thermal Cycler PTC-200	BioRad (München) (früher MJ Research)
pH-Meter 766	Knick (Berlin)
Photometer Ultrospec 3000	Amersham Biosciences GmbH (Freiburg), ehemals Pharmacia Biotech
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg) Sarstedt AG & C (Nümbrecht) Gilson S.A.S (Villiers le Bel, Frankreich)
Präparationsbesteck	Aesculap (B.Braun AG, Melsungen)
Präzisionswaage Typ 440-47N	Kern & Sohn GmbH (Balingen- Frommern)
Reaktionsgefäße (0,5, 1,5, 2,0 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Reinstwasseranlage	ELGA Lab Water (Celle)
RNase ERASE	ICN Biomedicals Inc. (Aurora, USA)

Material und Methoden

Spritzen steril, 1 ml

Beckton Dickinson S.A (Madrid,
Spanien)

Szintillationszähler Wallac 1410

Amersham Biosciences GmbH
(Freiburg)

Taumler Polymax 1040

Heidolph Instruments
(Schwabach)

Thermometer

IKA Labortechnik (Staufen)

Trockenschrank

Kindermann (Ochsenfurt)

Vortex Genie 2

Bender & Hohenheim AG
(Zürich, Schweiz)

Vortex VF2 und MS2 Minishaker

IKA Labortechnik (Staufen)

Wasserbad Julabo 5

Julabo (Seelbach)

Wasserbad Typ 3015

GFL (Burgwedel)

2.1.2 Chemikalien

Soweit im Methodenteil nicht anders vermerkt, wurden alle hier nicht im Einzelnen aufgeführten Chemikalien von den Firmen Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Riedel de Haën (Seelze), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Seelze) bezogen.

Acetanhydrid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Agarose MP	Applichem (Darmstadt)
Bacto Agar	Difco (Detroit, USA)
Bacto Tryptone	Difco (Detroit, USA)
Bacto Yeast Extract	Difco (Detroit, USA)
Formamid	BDH (Poole, England)
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
NaOH	Baker (Deventer, Niederlande)
Netzmittel Mirasol2000Antistatic	Tetenal Photowerk GmbH (Norderstedt)
Roti [®] Phenol/C/I (CPI-Reagenz)	Roth (Karlsruhe)
Szintillationsflüssigkeit Lumasafe	Lumac LSC B.V. (Groningen, Niederlande)
TRIzol Reagenz zur RNA-Extraktion	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Ultra Pure <i>E. coli</i> LPS	InvivoGen (San Diego CA, USA)
X-Gal	Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.3 Puffer und Lösungen

Häufig verwendete Puffer und Lösungen

H₂O reinst, UV-behandelt, gereinigt (und autoklaviert)

Wasser ad injectabilia („Braun-Wasser“)

PBS (phosphate-buffered saline)

B.Braun AG, (Melsungen)

6,5 mM Na₂HPO₄

1,5 mM KH₂PO₄

2,5 mM KCl

140 mM NaCl pH 7,25

TE (Tris-EDTA)

10 mM Tris-Base 1 mM

EDTA pH 8,0

Agarosegelelektrophorese

TAE (Tris-Acetat-EDTA)

40 mM Tris-Base

1 mM EDTA

Ethidiumbromid

10 mg/ml Stocklösung: 657,9 µl
ad 10 ml)

in Tropfflasche: 1 Tropfen / 50 ml
Gel

10 × Ladepuffer

30 % Glycerin

0,125 % Bromphenolblau (Bande
bei 300 bp)

0,125 % Xylencyanol FF (Bande
bei 1,2 kb)

(Probenpuffer ggf. nur mit einem
Farbstoff)

Transformation und Kultur von E. coli

LB-Medium

1 % Trypton (10 g/l)
 0,5 % Bacto Yeast Extract (5 g/l)
 1 % NaCl (10 g/l)
 H₂O ad 1 l
 pH auf 7,4 einstellen,
 autoklavieren
 (ggf. 50 µg/ml Ampicillin
 zusetzen LB-Agar 15 g Bacto-
 Agar/l LB-Medium zugeben,
 autoklavieren

Lösung für selektive Agarplatten

LB-Agar plus Zusätze:
 50 µg/ml Ampicillin
 1 mM IPTG
 40 µg/ml X-Gal

SOC-Medium 2 % Bactotryptane
 10 mM NaCl

0,5 % Bacto Yeast Extract
 H₂O ad 950 ml; pH 7,0

einstellen;

autoklavieren
 2,5 mM KCl
 10 mM MgCl₂
 10 mM MgSO₄ × 7 H₂O
 20 mM Glucose (frisch
 zusetzen!)

Material und Methoden

In situ-Hybridisierung

10 × PBS (phosphate-buffered saline)	77 mM Na ₂ HPO ₄ 23 mM NaH ₂ PO ₄ 1,53M NaCl pH einstellen auf 6,75 (1 : 10 verdünnt => pH 7,3–7,4)
4 % PFA	4 % (w/v) Paraformaldehyd in 1 × PBS pH mit HCl auf 7,4–7,3 einstellen 1 Woche brauchbar, Lagerung bei 4 °C
0,4 % Triton	0,4 % (v/v) Triton X-100 in 1 × PBS 1 Monat brauchbar, Lagerung bei 4 °C
Hybridisierungspuffer	10 % (w/v) Dextransulfat 600 mM NaCl 10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA (di-Natriumsalz) 0,05 % (w/v) tRNA 1 × Denhardt's solution 100 µg/ml sonicated salmon sperm DNA 50 % (v/v) Formamid
20×Natriumchlorid, Natriumzitat	3 M NaCl 0,3 M Na ₃ C ₆ H ₅ O _x 2 H ₂ O (Trinatriumcitratdihydrat) konzentrierte HCl ad pH 6,3 (Verdünnung 1 : 10 → pH 7,05)
TEA-Puffer	6,65 ml TEA 493 ml H ₂ O mit konz. HCl (~ 1,5 ml) pH 8,0 einstellen

RNase-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0 500 mM NaCl 1 mM EDTA 20 µg/ml RNase A 1 U/ml RNase T1
--------------	--

Plasmidpräparation

GTE (Glucose-Tris-EDTA)	50 mM Glucose (1%) 25 mM Tris pH 8,0 10 mM EDTA
NaOH/SDS	0,2N NaOH, 1% SDS (frisch ansetzen!)
TES (Tris-EDTA-Natrium)	50 mM Tris, pH 8,0 10 mM EDTA 150 mM NaCl

Histologische Färbelösung

Kresylviolett-Lösung	5 g Kresylviolett 600 ml H ₂ O 60 ml 1 M NaAc 340 ml 1 M Essigsäure im Dunkeln 7 Tage rühren; filtrieren
----------------------	--

Zellkultur-Arbeiten

HBSS	PAA Laboratories GmbH, (Cölbe)
DMEM (+/- Glucose)	PAA Laboratories GmbH, (Cölbe)
Pen/Strep	PAA Laboratories GmbH, (Cölbe)
Glutamin	PAA Laboratories GmbH, (Cölbe)

Material und Methoden

Glucose	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, (Seelze)
FBS (fetales bovines Serum)	PAA Laboratories GmbH, (Cölbe)
Trypsin	Seromed/Biochrom KG, (Berlin)
DNase	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, (Seelze)
Zellsiebe	Fisher Scientific GmbH, (Schwerte)
Primocin	Lonza Cologne GmbH, (Köln)
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, (Cölbe)
T25 Tissue Culture Flask	SARSTEDT AG & Co., (Nümbrecht)
Petrischalen	Falcon/Becton Dickinson Labware, (New Jersey, USA)
Pipetten (5 ml & 10 ml)	SARSTEDT AG & Co., (Nümbrecht)
Pipetten (25 ml)	Falcon, Le Pont De Claix
Automatic-Sarpette	SARSTEDT AG & Co., (Nümbrecht)
Trypsin (Zellernte)	0,05 %/0,02 % EDTA/CMF
Trypsin (Zell-Aufreinigung)	0,25 % /CMF
HBSS+Pen/Strep (100 ml)	100 µg/ml Penicillin/Streptomycin in HBSS-Puffer
	RT/PCR
5xM-MuLV RT Buffer	Fermentas (St. Leon-Rot)
10xPCR Reaction Buffer (15 mM MgCl ₂)	GeneCraft GmbH (Lüdinghausen)
MgCl ₂ (50 mM)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

2.1.4 Enzyme

Ribonuclease Inhibitor	MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
RNA Polymerasen (SP6, T3, T7)	Roche (Basel, Schweiz)
RNase A (10 mg/ml)	Roche (Basel, Schweiz)
RNase-free DNase I	Roche (Basel, Schweiz)
RevertAid™ H minus M-MuLV	MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
BioTherm Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	GeneCraft GmbH (Lüdinghausen)

2.1.5 Nukleotide

ATP, CTP, GTP, UTP	Roche (Mannheim)
dATP, dCTP, dGTP, dUTP	PeqLab Biotechnologie (Erlangen)
	GeneCraft GmbH (Lüdinghausen)
³⁵ S-UTP, ³⁵ S-CTP	GE Healthcare (Chalfont St. Giles, England, früher Amersham Biosciences)
DIG-RNA-Labeling-Mix	Roche (Mannheim)
GeneRuler DNA Ladder Mix	MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Random Primer	Promega (Madison, USA)
	Bioron GmbH (Ludwigshafen)

Plasmide

pcDNA3	Invitrogen (Darmsatdt)
pGEM-T	Promega (Mannheim)
pGEM-T easy	Promega (Mannheim)

2.1.6 Oligonukleotide (Primer)

Die Oligonukleotide wurden unter Verwendung des im Internet frei verfügbaren Programms <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, das Primer3 und BLAST zur Verfügung stellt, generiert. Dafür wurden unter möglichst stringenten Bedingungen Oligonukleotide gesucht, deren GC-Gehalt möglichst nahe an 50 % lag, deren Länge etwa 22 Nukleotide betrug und die eine Schmelztemperatur bei 64 °C hatten.

Es wurden Primer für unterschiedliche Amplikons generiert, zwischen 70 und 200 Nukleotide für QPCR, bis 300 Nukleotide zum qualitativen Nachweis und ca. 1000 Nukleotide für eine mRNA-Sondenmatrize. Die Amplikons zum qualitativen Nachweis sollten möglichst kurz gehalten werden, damit auch mit cDNA von degradierter mRNA noch zuverlässig Analysen durchgeführt werden konnten. Die Sondenmatrizen hingegen sollten lang sein, damit auch dann ein möglichst deutliches Signal generiert wurde, wenn ein Gen nur auf sehr niedrigem Niveau exprimiert wurde.

Primer für eine qualitative PCR

Primer-ID	Sequenz	Produkt-Größe [bp]	Accession Nr
SP6	5'-CGATTTAGGTGACACTATAG-3'	Insertab-hängig	-
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'		
GAPDH F28	5'-CGACCCCTTCATTGACCTCAACTACATG -3'	227	NM_002046.3
GAPDH R28	5'-CCCCGGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'		
PAC1 (1)F	5'-CTTGTGCAGAAGCTGCAGTCCCCAGACATG-3'	303/384/387 /471	NM_007407.3
PAC1 (1)R	5'-CCGGTGCTTGAAGTCCATAGTGAAGTAACGGTTCACCTT-3'		
PAC1 (2)F	5'-TGCCCTGAGGTCTCCGGATCTTCAAC-3'	447/510	NM_007407.3
PAC1 (2)R	5'-AATGAACAGCCAGAAGTAGTTGGACAC-3'		
PAC1 (3)F	5'-AGCCCTTCCCCATTACTTC-3'	485	NM_007407.3
PAC1 (3)R	5'-CACAGCCACACAGTTACAC-3'		
VPAC1 (1)F	5'-ATCTTTCATGTCCTTCATCCTGA-3'	475	NM_011703.4
VPAC1 (1)R	5'-GAGTATGGGCTGCTATCATTCTTC-3'		
VPAC1 (2)F	5'-CCTTCTTCTCTGAGCGGAAGTACTT-3'	453	NM_011703.4
VPAC1 (2)R	5'-CCCTGGAAGGAACCAACACATAAC-3'		
VPAC2 (1)F	5'-GTCAAGGACAGCGTCTACTCC-3'	572	NM_009511.2
VPAC2 (1)R	5'-CCCTGGAAGGAACCAACACATAAC-3'		
VPAC2 (2)F	5'-AGAAGACACAGTTGCTGGGACACA-3'	385	NM_009511.2
VPAC2 (2)R	5'-GCACAGGCCTCGCCATCTTCTTTT-3'		
PAC1 nullF	5'-GGCCCCGTGGTTGGCTCTATAATGG-3'	187/268/271/ 352/355	NM_133511.1 & Z23279.1
PAC1 nullR	5'-GAGAGAAGGCGAATACTGTG-3'		
PAC1 hopF	5'-GGCCCCGTGGTTGGCTCTATAATGG-3'	200	NM_133511.1 & Z23279.1
PAC1 hopR	5'-AGAGTAATGGTGGATAGTTCTGACA-3'		
PAC1 hipF	5'-GGCCCCGTGGTTGGCTCTATAATGG-3'	142	Z23273.1
PAC1 hipR	5'-TGGGGACTCTCAGTCTTAAA-3'		
PAC1 s/vsF	5'-CTCTCCCTGACTGCTCTCCTCC-3'	340/277/169	NM_007407.3
PAC1 s/vsR	5'-CAGCCATCCTCAGTGCAGTTCC-3'		
VPAC1F	5'-TTTGAGGATTTGCGGTGCTGGG-3'	159	NM_011703.4
VPAC1R	5'-ATTCTTCCCAATGTCGGGTGGC-3'		
VPAC2F	5'-ATTCTTCCCAATGTCGGGTGGC-3'	97	NM_009511.2
VPAC2R	5'-TCAGGAAGCTGCACTGCACA-3'		
VIPF	5'-ATGGAAGCCAGAAGCAAGCC-3'	133	NM_011702.2
VIPR	5'-CAAACGGCATCCTGTCTATCC-3'		
PACAPF	5'-CCATGTGTAGCGGAGCAAGG-3'	171	NM_009625.2
PACAPR	5'-CGGGAGGGTCCCAGTCATAG-3'		

Material und Methoden

Primer-ID	Sequenz	Produkt-Größe [bp]	Accession Nr
StaCa1F	5'-TTCCTTGCCATTCGGAGGTGTT-3'	179	NM_009285.3
StaCa1R	5'-AGGCTTCGGACAAGTCTGTTGT-3'		
Stath1F	5'-CCCAGGTCTGTTGGTGCTCAGA-3'	153	NM_019641.4
Stath1R	5'-CGCGCTTCTCCAGCTCTTTCA-3'		
hPACAPF	5'-CTCCAGCGCAGGAACTTGAAGAAG-3'	151	NM_00109973 3.1
hPACAPR	5'-CTGTAGACGCTGCTGTGCATGATTA-3'		
hVIPF	5'-ACCCTTTGAGGGAGCAAATGAACC-3'	250	NM_003381.2
hVIPR	5'-ACGTTTGACTGGTACAGGGTCTTC-3'		
hPAC1F	5'-TGGTCGGAACCCTTCCCTCATT-3'	111	NM_001118.3
hPAC1R	5'-AACCGTGTAGAGGGCCTTCACT-3'		
hPAC1sF	5'-TGTGGGTGAGATGGTCCTGGT-3'	305/242	NM_00119963 5.1
hPAC1sR	5'-TGGTGAGGGTGACGAGGGAT-3'		
hPAC1hopF	5'-TGGTCATCCTTTGTGCGTCCG-3'	871/868/78 7	NM_00119963 5.1
hPAC1hopR	5'-AGACGGGTGTCGGTGTGTTGA-3'		
hPAC1shopF	5'-TGAAGTCCACAGCGAAGTAACGG-3'	1341/1338/ 1257/1194	NM_00119963 5.1
hPAC1shopR	5'-CTGCTCTCCTCCTGCTGCCTAT-3'		
hVPAC1F	5'-TGCCTGGAGCGTTTCTAGCAAG-3'	117	NM_004624.3
hVPAC1R	5'-TTTGCCCTTGATTGGCGTAGGG-3'		
hVPAC2F	5'-GCCTCTCAGGAAGCTGCAC-3'	394	NM_003382.4
hVPAC2R	5'-GGCACACTGTGGTCGTTTGT-3'		
hStanniocalcin 1F	5'-TTCCAAAGGATGATTGCTGAGGTGC-3'	195	NM_003155.2
hStanniocalcin 1R	5'-GCTGTCTCTGATTGTGCTGACTGT-3'		
Stathmin 1F	5'-GAACCGAGAGGCACAAATGGCT-3'	133	NM_00114545 4.1
Stathmin 1R	5'-AAGGGCAGGAACAGAGTGGAGA-3'		

Sonden-Primer

Primer-ID	Sequenz	Produkt-Größe [bp]	Accession Nr
PAC1-SondeF	5'-CCTATGGCTATTGCTATGCACTC-3'	1085	NM_007407.3
PAC1-SondeR	5'-AGAGTAATGGTGGATAGTTCTGACA-3'		
VPAC1-SondeF	5'-GGTGGCCATCCTCTACTGCTTC-3'	1172	NM_011703.4
VPAC1-SondeR	5'-CCTCCCCAGGCTTTTATGTCAG-3'		
VPAC2-SondeF	5'-AGTGCTGCTGGGTTTGACATA-3'	985	NM_009511.2
VPAC2-SondeR	5'-ATAGGCTGTGCCAGAACTAGG-3'		
PACAP-SondeF	5'-AATGACTTGGGGAATTGCTG-3'	517	NM_009625.2
PACAP-SondeR	5'-GCATGAACAGCACTGGAGAA-3'		
VIP-SondeF	5'-GGATGACAGGATGCCGTTTGAAGG-3'	986	NM_011702.2
VIP-SondeR	5'-GGGGATTGCAAAGCCTAATGGGAG-3'		
Stanniocalcin 1 SondeF	5'-CTTAACGTTTGCAGCATCGCCAAG-3'	1354	NM_009285.3
Stanniocalcin 1 SondeR	5'-ACCTGTTGGGTTTTCTGTCAAGT-3'		
Stathmin 1 SondeF	5'-GGTCTGTTGGTGCTCAGAGTGT-3'	825	NM_019641.4
Stathmin 1 SondeR	5'-GCCATTAACCCAGCACACCGAT-3'		

QPCR-Primer

Primer-ID	Sequenz	Produkt-Größe [bp]	Accession Nr
Stathmin 1 QPCR F	5'-CCCAGGTCTGTTGGTGCTCAGA-3'	153	NM_019641.4
Stathmin 1 QPCR R	5'-CGCGCTTCTCCAGCTCTTTCA-3'		
Stanniocalcin 1 QPCR F	5'-TTCCTTGCCATTCGGAGGTGTT-3'	179	NM_009285.3
Stanniocalcin 1 QPCR R	5'-AGGCTTCGGACAAGTCTGTTGT-3'		
PAC1 QPCR F	5'-TATCCACCATTACTCTACGGCTGGC-3'	114	NM_007407.3
PAC1 QPCR R	5'-GTCTTCCCTCTTGCTGACGTTCTC-3'		

Material und Methoden

2.1.7 Kits

NucleoSpin [®] Extract II	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren)
NucleoSpin RNA/Protein	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren)
RNeasy Micro Kit	Qiagen (Hilden)
pGEM [®] -T Vector System I	Promega (Madison, USA)
TSA [™] Biotin System	NEN [®] Life Science Products, Inc. (Boston, USA)

2.1.8 Computer-Software, Internetseiten

SPOT Image Analysis (Version 3.4)	Diagnostics Instruments Inc. (Sterling Heights, MI, USA)
Office Word	Microsoft Redmond (USA)
Office Excel	Microsoft Redmond (USA)
Gimp 2.6	The Gimp Team, http://www.gimp.org/team.html
GraphPad Prism 4.0	GraphPad Software, Inc., La Jolla (USA)
Primer-BLAST (Primerdesign)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/v/tools/primer-blast
Pub Med (Literatur-Recherche)	http://www.pubmed.gov
BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

2.1.9 Puffer und Medien**50 × TAE-Puffer**

Tris Base	146 g
HAc	28,55 ml
0,5 M EDTA	50 ml
ddH ₂ O	ad 500 ml

LB-Medium

Lysogeny <u>B</u> roth-Pulvermedium	25 g
ddH ₂ O	1000 ml

Für LB-Agarplatten wurden 15 g Agar hinzugefügt.

Das LB-Medium wurde durch Autoklavieren sterilisiert. Das Plattenmedium wurde auf 55 °C abgekühlt und ein oder zwei Antibiotika in den üblichen Mengen hinzugefügt, bevor die Platten gegossen wurden.

2.2 Methoden**2.2.1 Molekularbiologische Methoden****2.2.1.1 RT-PCR**

PCR-Reaktion	25 µl
Template-DNA	2 µl
Primer (2 µM)	2 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl
10-fach-PCR-Puffer	2,5 µl
10-fach-dNTPs	2,5 µl
ddH ₂ O	ad 25 µl

95 °C	10 min	} 20–40 Wiederholungen = „PCR-Zyklen“
95 °C	0:30 min	
T _A	0:30 min	
72 °C	X:XX min	
72 °C	10 min	
8 °C	Infinite	

Die Reaktion wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.2.1.2 Insert-PCR

Taq-Polymerase	0,2 µl
10-fach-Puffer	2,5 µl
dNTPs	2,5 µl
Primer (Forward primer +T7 oder SP6 oder T7 und SP6)	2,5 µl
ddH ₂ O	17,3 µl

Fünf Kolonien pro Selektionsplatte wurden mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und in je 50 µl dH₂O resuspendiert. 10 µl einer jeden Zellsuspension wurden mit je 10 µl des 2-fach PCR-Reaktionsansatzes gemischt und wie folgt inkubiert:

95 °C	10 min	} 20–40 Wiederholungen = „PCR-Zyklen“
95 °C	0:30 min	
54 °C	0:30 min	
72 °C	X:XX min	
72 °C	10 min	
8 °C	Infinite	

Die Reaktion wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Anschließend wurde der komplette Reaktionsansatz auf einem horizontalen 1,5%-Agarosegel analysiert.

2.2.1.3 Agarose Gelelektrophorese

Ein Mixtum compositum von Nukleinsäure-Fragmenten verschiedener Größe und Mengen konnte qualitativ und quantitativ mithilfe der Auftrennung in einem Agarosegel untersucht werden. Hierbei machte man sich die negative Ladung der DNA/RNA durch ihre Phosphatgruppen zunutze, die bedingt, dass DNA/RNA-Moleküle in einem elektrischen Feld zur Anode (+-Pol) wandern.

Zur Herstellung eines 1,5%-Agarosegels:

Agarose	0,75 oder 1,5 g
TAE	50 oder 100 ml

Die Suspension wurde in einer Mikrowelle bis zum Sieden erhitzt und die Agarose vollständig gelöst. Der Lösung wurde ein Tropfen Ethidiumbromid entsprechend 10 μ l hinzugefügt, durch Schwenken gemischt in eine Gelkammer entsprechender Größe gefüllt und mit Gelkämmen, die die benötigte Anzahl an Ladetaschen bereitstellten vorbereitet.

Nukleinsäuren wurden, abhängig von ihrer Länge, in einem Gel aufgetrennt, welches aus 0,8 bis 3 % Agarose und 0,5 μ g/ml Ethidium-Bromid in 1x TAE-Puffer besteht. Die Probenvolumina wurden vor dem Auftragen mit einem 6x oder 10x Gel-Ladepuffer mit Bromphenolblau und/oder Xylene Cyanol versetzt. Anschließend wurden 4–10 μ l dieser Proben in die Geltaschen pipettiert und angrenzend ein DNA-Längen-Standard aufgetragen, der DNA-Fragmente mit definierter Länge zum Abschätzen der Proben-Fragmentgröße enthielt.

Elektrophoretisch aufgetrennt wurden die Proben durch eine angelegte Spannung von 8–10 V pro cm Gel-Länge. Ausgewertet wurde das Gel durch Anregung mit UV-Licht und Fotografie der Fluoreszenz.

2.2.1.4 Nukleinsäurekonzentrationsbestimmung im Photometer

Die Konzentration und Reinheit einer Lösung von Nukleinsäuren (DNA wie auch RNA) wurde mithilfe eines Photometers bestimmt, indem die Absorption bei $\lambda = 260$ nm (A_{260}) gemessen wurde. Dies ist möglich, da Nukleinsäuren Licht mit einer Wellenlänge von 260 nm absorbieren und diese Lichtabsorption mit der Konzentration an gelösten Nukleinsäuren zunimmt. Aus dem Lambert-Beerschen Gesetz ergibt sich bei einer 260-nm-Absorption von 1 eine Nukleinsäurekonzentration von:

Material und Methoden

RNA (Einzelstrang): 40 µg/ml

DNA (Doppelstrang): 50 µg/ml

Eine Proteinkontamination wird bei der Ratio von 260/280 überprüft. Die Messungen wurde mit einem Nanodrop ND 1000 durchgeführt.

2.2.2 RNA-Extraktion aus Gewebe

100 mg schockgefrostenes Gewebe wurden abgewogen, gemörsert, mit 1 ml peqGeld Trifast versetzt und in einem Glaspotter homogenisiert. Das Homogenisat wurde in ein Eppendorfgefäß überführt. Zellfragmente wurden durch 10-minütiges zentrifugieren bei 12.000×g (4 °C) sedimentiert. Der Überstand wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 200 µl Chloroform versetzt und durch starkes manuelles Schütteln gemischt, um das Stoffgemisch nach Löslichkeit zu trennen. Durch 15-minütige Zentrifugation bei 12.000 × g (4 °C) entstanden drei Phasen der Lösungsmittel:

unten: wasserunlöslich, Phenol-Chloroform-Phase mit Proteinen

Mitte: weißlich-trübe Interphase mit genomischer DNA

oben: farblose wässrige Phase mit gelöster RNA

Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, und in ein neues 1,5-ml-Eppendorfgefäß überführt. 500 µl Isopropanol wurden zugegeben, 10 min bei RT gefällt und durch Zentrifugation (10 min, 12.000 × g, 4 °C) zu einem RNA-Pellet sedimentiert. Einmal wurde das Pellet mit 1 ml Ethanol (75 %), gewaschen und erneut Zentrifugiert (10 min, 12.000 × g, 4 °C). Der Überstand wurde entfernt und das Pellet kurz luftgetrocknet und in einem Volumen von 20 µl H₂O resuspendiert. Die Konzentration und Reinheit der Suspension wurde mit einem Nanodrop ND 1000 ermittelt und die RNA-Suspension bei -80°C gelagert

2.2.2.1 RNA-Extraktion aus Zelllinien

Nach dem vorsichtigen Abnehmen des Überstandes wurden die Zellen in 1 ml peqGOLD Trifast resuspendiert. Die Zellen wurden aufgebrochen und homogenisiert, indem die Lösung 10-mal mit einer 1-ml-Spritze durch eine 25-Gauge-Kanüle gezogen wurde. Anschließend wurde mit der Sedimentation von großen, unlöslichen Zellfragmenten nach dem Protokoll unter **2.2.2** weiterverfahren.

2.2.2.2 DNA-Behandlung und Phenol-Chloroform-Extraktion zur Entfernung genomischer DNA

Für den DNase-Verdau wurden bis zu 50 µg der durch Extraktion erhaltenen RNA mit H₂O auf ein Volumen von 86 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 10 µl 10xDNase-Puffer und 4 µl DNase I wurden die Proben mit einem Endvolumen von 100 µl für 20–45 min je nach Kontaminationsgrad im Wasserbad bei 37 °C inkubiert.

Dem 100-µl-Probenvolumen wurden 100 µl eines Aqua-Roti-Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (im 25 : 24 : 1) zugesetzt und durch starkes Schütteln extrahiert. Dann wurde die Lösung für 5 min bei maximaler Drehzahl zentrifugiert, die oberste von drei Lösungsmittelphasen wurde abgenommen und in ein ultrareines 1,5-ml-Eppendorfgefäß überführt. Die hydrophobe Phase wurde einmal mit 100 µl ddH₂O, gewaschen und die wässrigen Phasen vereinigt. Diese RNA-Lösung wurde mit 150 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24 : 1) gemischt und durch 2-minütige Zentrifugation (max. Drehzahl) erneut in 3 Phasen aufgetrennt. Die oberste Phase wurde wiederum in ein ultrareines 1,5-ml-Eppendorfgefäß überführt und die hydrophobe Phase mit 50 µl H₂O gewaschen. Diese Schritte wurden ein- bis zweimal wiederholt. Anschließend wurde eine Ethanol-fällung angesetzt.

Die RNA-Lösung (etwa 200 µl) wurde mit 20 µl einer Natriumacetat-Lösung (3 mol/L, pH = 4), 2,5 µl Glykogen (20 mg/ml) und 500 µl kaltem (–20 °C) Ethanol (100 %) versetzt und für mind. 2 h bei –80 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Fällungsansatz 30 min bei maximaler Drehzahl und 4 °C

Material und Methoden

zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 200 µl kaltem (−20 °C) Ethanol (70 %) gewaschen und erneut 15 min (max. Drehz., 4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und das Pellet wurde in ddH₂O resuspendiert (RNA-Konzentration 1 µg/µl).

2.2.2.3 Umschreiben von RNA in DNA (Reverse Transkription)

2 µg einer RNA wurden in ein Reaktionsendvolumen von 20 µl eingesetzt. Der RNA-Lösung wurde 1 µl einer Primermix-Lsg., die aus 0,5 µl Random Hexamer Primern (0,5 µg/µl) und 0,5 µl Oligo-dT Primern (100 µM) bestand zugegeben und mit DEPC behandeltem ultrareinem Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde 10 min bei 70 °C im Thermocycler inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Daraufhin wurden 10 µl eines Reaktionsgemisches zugegeben, welches die zur Reaktion nötigen Enzyme, Desoxyribonukleotitriphosphate (dNTP) und Ionen enthielt. Zur Negativkontrolle wurde von jedem Ansatz eine Reaktion ohne Enzym angefertigt (-RT-Ansatz).

Substanz/Stock-Lsg.	Volumina [µl] für +RT	Volumina [µl] für −RT
5-fach-Reaktionspuffer	4	4
dNTPs (10 µM)	2	2
Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1	-
RNase Inhibitor (40 U/µl)	0,5	0,5
ddH ₂ O	2,5	3,5

Das Gesamtvolumen eines einfachen Ansatzes von 20 µl wurde im Thermocycler mit der folgenden Temperaturabfolge inkubiert:

RT-Programm

25 °C	10 min
42 °C	60 min
70 °C	10 min
8 °C	Infinite

Nach Ablauf der RT wurde das Reaktionsvolumen durch Zugabe von 30 μl ddH₂O auf 50 μl aufgefüllt. Von diesem Ansatz konnte anschließend ein Volumen von 1 bis 4 μl in eine PCR eingesetzt werden. Anschließend wurde eine PCR-Reaktion mit Primern gegen die Sequenz eines Haushaltsgens (GAPDH) getestet, ob auch im Ansatz der –RT amplifizierbare DNA-Sequenzen vorlagen.

2.2.2.4 Ligation von PCR-Fragmenten in den pGEM-T-Vektor

PCR-Produkte der verwendeten Taq-Polymerase wurden in den Transformationsvektor pGEM-T ligiert. Wenn der Vektor in dem optimalen Verhältnis von 1 : 3 mit einem PCR-Produkt, einer DNA Ligase und ihrem entsprechenden Reaktionspuffer zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert wurde, entstand ein Vektor mit Insert. Berechnung der optimalen PCR-Produktmenge für eine Ligation mit 50 ng Vektor:

$$\text{Fragmentmenge [ng]} = \frac{50\text{ng Vektor} * \dots\text{kb Fragmentgröße}}{3,0\text{kb Vektorgröße}} * \frac{3}{1} \text{Ratio (Insert:Vektor)}$$

Das zu ligierende PCR-Produkt war so zu verdünnen, dass die errechnete Menge in 3µl Lösung enthalten war (Fragment-Ziel-Konz. [ng/µl] = Fragment-Menge [ng] / 3µl).

Ligations-Reaktionsansatz:

Substanz / Lösung	Volumen [µl]
2x Rapid Ligations-Puffer	5
pGEM-T Vektor (50 ng)	1
PCR-Produkt (....ng)	3
T4-DANN-Ligase	1
Endvolumen:	10

Die Reaktion wurde in 0,5-ml-Eppendorfgefäßen angesetzt und zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert.

2.2.3 Mikrobiologische Methoden

2.2.3.1 Agarplatten gießen

Um etwa 20 Agarplatten herzustellen, wurde eine Flasche mit 400 ml LB-Agarmedium in der Mikrowelle bis zur kompletten Agarschmelze erhitzt und danach im Wasserbad bis auf 50 °C abgekühlt. Dem abgekühlten Medium wurden nun Ampicillin, IPTG und X-Gal in den folgenden Volumina zugegeben:

Agarzusatz	Stocklösungs-Konzentration	Zugabe-Volumen pro 400 ml Medium	Endkonzentration
Ampicillin	50 mg/ml	400 µl	50 µg/ml
IPTG	1 M	400 µl	1 mM
X-Gal	20 mg/ml	800 µl	40 µg/ml

2.2.3.2 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

TFB1 – Puffer (1 l)

Substanz	Konzentration / Menge
Kaliumacetat (98,45 g/mol)	30 mM / 2,95 g
Calciumchlorid (147,02 g/mol)	10 mM / 1,47 g
Manganchlorid (197,9 g/mol)	50 mM / 9,90 g
Rubidiumchlorid (120,9 g/mol)	100 mM / 12,10 g
Glycerin	15 %

Der pH-Wert wurde mit Essigsäure (1 M) auf 5,8 eingestellt und die Lösung steril filtriert.

TFB2 – Puffer (0,5 l)

Substanz	Konzentration / Menge
MOPS (209,3 g/mol)	10 mM / 1,05 g
Calciumchlorid (147,02 g/mol)	75 mM / 5,5 g

Material und Methoden

Rubidiumchlorid (120,9 g/mol)	10 mM / 0,605 g
Glycerin	15 %

Der pH-Wert wurde mit Kaliumhydroxyd (1 M) auf 6,5 eingestellt und die Lösung steril filtriert. Eine längere Lagerung als 1–2 Wochen bei 4 °C war nicht möglich.

Als Vorbereitung wurde eine Übernacht-Kultur eines E.-coli-Stammes in ca. 2,5 ml LB-Medium in einem Kulturröhrchen im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert. Mit dieser Kultur wurden am nächsten Tag 250 ml LB-Medium (mit 20 mM Magnesiumsulfat) in einem 1-Liter-Erlenmeyer-Kolben mithilfe einer Impföse angeimpft und etwa 3–5 h im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert, bis das Medium durch die Zellvermehrung eine optische Dichte von 0,4 bis 0,7 bei 600 nm hatte. Anschließend wurden die Zellen bei 4500×g und 4 °C über 5 min sedimentiert. Das Pellet wurde in 100 ml eiskaltem TFB1-Puffer resuspendiert, 5 bis 10 min auf Eis inkubiert und anschließend erneut durch eine Zentrifugation mit den gleichen Parametern pelletiert. Dieses Pellet wiederum wurde mit 10 ml eiskaltem TFB2-Puffer resuspendiert und 15–60 min auf Eis inkubiert. Diese TFB2-Zellsuspension wurde in 200 µl Volumen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.2.3.3 Transformation von chemisch kompetenten Zellen

Die nötige Anzahl von Aliquots chemisch kompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 3 µl eines 10-µl-Ligations-Ansatzes zu den Zellen gegeben und diese dann auf Eis für 15 min inkubiert. Eine 45-Sekunden-Inkubation bei 42 °C im Wasserbad und eine zweiminütige Inkubation auf Eis folgten. 1 ml SOC-Medium wurde zu den Zellen gegeben und diese nun für eine Stunde im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 100–200 µl dieser Suspension auf einer Agarplatte gleichmäßig ausgestrichen und für 16h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

2.2.3.4 Blau-Weiß Screening

E.-coli-Zellen können auf den selektierenden Amp.-Agarplatten nur überleben wenn sie eine Resistenz haben. Durch die Anwesenheit eines lacZ-Gens, das durch die Multiple cloning site unterbrochen wird wachsen auf den Platten zwei Arten von E.-coli-Kolonien an:

Blaue Kolonien: Diese erscheinen blau, da ihre Ursprungszelle ein fehlerhaftes und ohne Insert religiertes Plasmid aufgenommen hat, somit das lacZ-Gen ablesen kann und X-Gal abbaut.

Weißer Klone: Sie können X-Gal nicht umsetzen, was bedeutet, dass ihr lacZ-Gen mit großer Wahrscheinlichkeit von einem Insert unterbrochen wird.

Auf diese Weise werden Insert-positive Zellklone durch ausbleibende Blaufärbung markiert.

2.2.3.5 Selektieren und Vermehrung einzelner Insert-positiver Klone

Weißer Bakterienkolonien wurden berührt und in 3 ml LB-Flüssigmedium mit 50 µg/ml Ampicillin suspendiert. Der Rest der an der Impföse haftenden Kolonie-Zellen in 40 µl ddH₂O suspendiert. Über Nacht wurde die Zellsuspension bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag konnten sie durch Zentrifugation sedimentiert und ihre Plasmide extrahiert werden. Gleichzeitig wurde ein kleiner Teil eines Klons als Glycerin-Stock schockgefrostet und bei – 80 °C gelagert. Die Zellsuspension in vorgenannten 40 µl ddH₂O wurde zum Testen der Insertorientierung verwendet.

2.2.3.6 Plasmid-Extraktion mittels Minipräp

Die Plasmidextraktion wurde mit einem Nucleospin Extract II Minipräpkit von Macherey Nagel nach Vorschrift durchgeführt

2.2.3.7 PCR-Insert-Test

Die unter **5.2.2.5** erstellte Zellsuspension wurde in einer PCR zum Test der Orientierung des Inserts verwendet.

Zusammensetzung eines solchen PCR-Ansatzes:

Bestandteil / Stock-Lösung	Volumen [μl]
10 x PCR-Puffer	2,5
dNTP-Mix (10 mM)	0,5
Primer 1 (10 μ M)	1
Primer 2 (10 μ M)	1
Taq-DNA-Polymerase	0,125
H ₂ O	14,875
Gesamtvolumen:	25

Mit der Kombination Forward Primer und SP6- bzw. T7-Primer wird die Orientierung des Inserts im Vektor überprüft und mit der Kombination SP6/T7 im Anschluss auf die PCR auf einem Agarosegel verglichen

PCR-Programm

94 °C	3:00 min	
94 °C	0:45 min	} 35 Zyklen
54 °C	0:45 min	
72 °C	1:30 min	
72 °C	6:00 min	
8 °C	infinite	

2.2.4 Histologische Methoden

2.2.4.1 Herstellung radioaktiv markierter Sonden (³⁵S-UTP)

Die Methode der *In-situ*-Hybridisierung nach Melton und Krieg 1984 dient der Lokalisation und Visualisierung zellulärer mRNA-Moleküle in histologischen Schnitten. Dazu inkubiert man einen zu einer bestimmten zellulären mRNA komplementären und ³⁵S-markierten RNA-Strang auf einem fixierten und quervernetzten Gewebeschnitt, so hybridisiert dieses markierte RNA-Molekül unter den experimentellen Bedingungen mit der komplementären zellulären mRNA. Werden die Gewebsschnitte mit einem Überschuss markierter RNA-Moleküle inkubiert, können auf diese Weise alle hybridisierten zellulären mRNA sichtbar gemacht werden. Diese Methode wurde in dieser Arbeit verwendet.

RNA-Sonden mit einer identischen Basenabfolge wie die der gesuchten mRNA werden als sense-Sonden bezeichnet und die komplementäre Sequenz wird als antisense-Orientierung bezeichnet. Markierte Sonden können mittels In-vitro-Transkription, hergestellt werden. Die in einer Insert-PCR hergestellten DNA-Fragmente dienen bei der Synthese verschiedener RNA-Sonden als Transkriptionsmatrizen. Je nach Insert-Orientierung und gewünschter Sonden-Sequenz (sense/antisense) können beide Stränge des DNA-Fragments einzeln entweder durch eine SP6- oder durch eine T7-RNA-Polymerase in eine Ribonukleotid-Folge umgeschrieben werden. Die hergestellten Sonden hatten in der Regel eine Länge von 800–1200 Nukleotiden.

Etwa 500 ng der DNA-Matrize wurden zusammen mit der Radioaktivität (7,5 µl ³⁵S-UTP) in der Vakuum-Zentrifuge (Speedvac) auf 2,5 µl eingedampft. Anschließend wurden 0,5 µl NTPs (5 mM), 0,5 µl Dithiothreitol (DTT, 100 mM), 0,5 µl 10 × Transkriptions-Puffer, 0,25 µl H₂O, 0,25 µl RNase-Inhibitor und 0,5 µl RNA-Polymerase zugegeben und für 90 min bei 37 °C inkubiert. Die Matrize wurde durch Zugabe von 0,5 µl DNase über 15 min bei 37 °C verdaut. Nach Auffüllen der Ansätze auf 20 µl mit H₂O und Zufügen von 20 µl Natriumbicarbonat (0,2 M; pH 10,2) wurden die Sonden bei 60 °C im Wasserbad über eine vorher berechnete Zeitspanne:

Material und Methoden

$$t = \frac{L_0 - L_f}{k \times L_0 \times L_f}$$

L_0 =Ausgangslänge in kb; L_f = Gewünschte Länge in kb (0,2); $k=0,11$; t =Zeit in Minuten

auf eine durchschnittliche Länge von 200 Nukleotiden hydrolysiert. Der basische pH-Wert wird mithilfe von 2 μ l 10%iger Essigsäure und 28 μ l TRIS-HCl-Puffer (pH 7,4) neutralisiert. Um die Effektivität der Transkription beurteilen zu können, wurde der Einbau des ^{35}S -UTP in die Sonden gemessen. Hierzu wurde 1 μ l dieses Ansatzes in ein Szintillationsröhrchen überführt. Anschließend wurde der restliche Ansatz über Zentrifugation mit einem BioRad-Säulchen von unverbrauchten Nukleotiden aufgereinigt. Danach wurden erneut 1,4 μ l des Ansatzes in ein Szintillationsröhrchen überführt. Durch Vergleich der gemessenen Radioaktivität beider Proben konnte berechnet werden, wie viel der vor der Entfernung freier Nukleotide vorhandenen Radioaktivität noch als freie ^{35}S -UTP-Moleküle vorlag. Durch abschließende Zugabe einer berechneten Menge an DTT, H_2O und Hybridisierungsmix zur Erhöhung der Stringenz wurden die Sonden für das Aufbringen auf Kryoschnitten vorbereitet und konnten anschließend direkt verwendet werden. Die Menge wurde nach dem prozentualen, erfolgreichen Einbau der Radioaktivität in die Sonden berechnet. Die Sonden wurden bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert und konnten bis zu sechs Monate verwendet werden (Halbwertszeit $\text{S}^{35} = 87,5\text{ d}$).

2.2.4.2 Gewebeentnahme/Präparation und Anfertigung von Kryogewebeschnitten

Die Versuchstiere wurden mittels Isofluran/Phorene betäubt und anschließend durch Dekapitierung getötet. Daraufhin wurden die benötigten Organe und Gewebe so schnell wie möglich entnommen, um die Degradierung zellulärer RNA-Moleküle zu verhindern. Je nach Verwendungszweck der Gewebe wurden diese auf unterschiedlichem Wege eingefroren. Gewebe zur RNA-Extraktion wurden in speziellen Kryogefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Gewebe zur Anfertigung von Kryo-Schnitten wurden in Kryoschälchen mit Tissue Tek O.C.T. Medium bedeckt, in Isopenthan bei -50 °C heruntergekühlt und bei Erreichen dieser Temperatur auf Trockeneis bis zur endgültigen Lagerung aufbewahrt. Gelagert wurden alle Gewebeproben bei -70 °C . Von den in Tissue Tek O.C.T. Medium eingefrorenen Geweben werden bei Bedarf im Kryostaten Schnitte mit einer Stärke von $10\text{--}14\text{ }\mu\text{m}$ angefertigt, auf TESAP-beschichtete Objektträger oder spezielle LCM-Objektträger aufgezogen und kurz bei RT getrocknet. Getrocknete Gewebsschnitte wurden entweder direkt prähybridisiert, oder bei -70 °C gelagert.

2.2.4.3 Prähybridisierung von Kryogeschnittenen Geweben

Für die Prähybridisierung wurden die folgenden Inkubationsschritte durchgeführt.

Die bei -70 °C gelagerten Kryoschnitte wurden zu Anfang luftgetrocknet, um den Abbau und Zerfall der Gewebe-RNA zu vermeiden. Danach wurden die Schnitte zur Fixierung in frisches 4%iges PFA/PBS gestellt und eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Das Fixanz wurde durch dreimaliges waschen der Schnitte mit $1 \times$ PBS über 10 min auf einem Magnetprüher entfernt. Anschließend erfolgte die Membran-Permeabilisierung durch 10-minütiges Waschen in einer 0,4%igen Triton-X100/PBS-Lösung. Nach erneutem Waschen in $1 \times$ PBS (5 min) und H_2O (1 min) erfolgt schließlich die Gewebs-Acetylierung. Hierfür wurden die Schnitte zuerst in 500 ml TEA-Puffer (pH 8,0) für eine Minute inkubiert, dem anschließend 1,25 ml Acetanhydrid

Material und Methoden

unter starkem Rühren zugefügt wurde. Nach dieser Zugabe wurden die Schnitte weitere 9 min im TEA-Puffer inkubiert, mit 1x PBS (10 min) und H₂O (1 min) gewaschen und zuletzt in Ethanol (50 % und 70 %, je 30 s) entwässert, 1 min in Chloroform potentiell störende Lipide herausgelöst und abschließend luftgetrocknet. Auf diese Weise behandelte Gewebsschnitte konnten bei -20 °C gelagert und bei Bedarf mit RNA-Sonden hybridisiert werden.

2.2.4.4 Erhöhung der Stringenz (Posthybridisierung)

Nach der Hybridisierung mussten ungebundene, unspezifisch oder nur teilweise gebundene Sonden aus dem Gewebe entfernt werden. Dies wurde durch Waschschrirte mit abnehmender Salz-(SSC)-Konzentration, mit hoher Temperatur und einem RNase-Verdau erreicht. Zuerst wurden die Deckgläschen durch vorsichtiges Abziehen in einem 2xSSC-Puffer entfernt und die Objektträger in frischem 2xSSC gelagert. Anschließend wurden die Objektträger erst 10 min in 2xSSC und dann 15 min in 1xSSC gewaschen. Um nicht hybridisierte RNA-Sonden restlos aus dem Gewebe waschen zu können, wurden die Schnitte bei 37 °C für eine Stunde in einer RNase A-Lsg. inkubiert, wodurch einzelsträngige RNA-Moleküle digestiert werden sollten. Nach dem Verdau wurden die Schnitte mit absteigender SSC-Konzentration gewaschen (1 x SSC: 15 min, 0,5 x SSC: 15 min, 0,2 x SSC: 15 min). Um unspezifisch oder schlecht hybridisierte Bindungen aufzulösen, wurden die Schnitte für eine Stunde in 0,2 x SSC-Puffer bei 60 °C inkubiert, gewaschen (0,2 x SSC: 15 min, H₂O: 15 min) und zuletzt in Ethanol entwässert (50 % und 70 %, je für 1 min). Der Schritt der Entwässerung entfällt für Schnitte, welche mit DIG-Sonden hybridisiert wurden.

2.2.4.5 Signal-Detektion

Um die Signalstärke und die Signalverteilung im gesamten Gewebe beurteilen zu können, wurde vor der eigentlichen und endgültigen Entwicklung der radioaktiv markierten Gewebe-Schnitte ein Röntgenfilm aufgelegt und durch die Strahlung der ³⁵S-Sonden belichtet. Bei der anschließenden Auswertung des entwickelten Filmes konnte abgeschätzt werden, an welchen Stellen des Gewebes die markierte Sonde in welcher Konzentration gebunden hatte und welche Expositionszeit in etwa die zur mikroskopischen Signal-Detektion aufzutragende Emulsion benötigen würde. Die Expositionszeit der Filme auf den Gewebe-Schnitten betrug zwischen 12 und 96 h. Nach dieser Zeit wurde der Film bei Rotlicht in einer Dunkelkammer folgendermaßen entwickelt:

Bad-Lösung	Inkubationszeit
Entwickler	4:00 Minuten
Leitungswasser	0:30 Minuten
Fixierer	10:00 Minuten
Fließendes Leitungswasser	mind. 10:00 Minuten
Netzmittel	0:30 Minuten

Nach Inkubation des Films in den versch. Bad-Lösungen wurde dieser für ca. 15 min zum Trocknen in einen beheizbaren Trockenschrank gehängt und anschließend beschriftet.

2.2.4.6 Aufbringen und Entwicklung von Fotoemulsion auf *in situ* Hybridisierte Gewebeschnitte

Vor dem Auftragen wurde die Emulsion bei 45 °C im Wasserbad in einer Dunkelkammer geschmolzen. Die Gewebeschnitte konnten daraufhin in die flüssige Emulsion getaucht werden, bis der gesamte Schnitt mit Emulsion bedeckt ist. Zum vollständigen Trocknen der Emulsion wurden die Schnitte für etwa 24 h unter Lichtausschluss mit einem Trockenmittel (Silikagelperlen)

Material und Methoden

gelagert. Anschließend wurden die Schnitte gleicher Expositionszeit in einzelne Plastikboxen mit Silikagel Perlen sortiert. Nach einer ausreichenden Expositionszeit wurden immer alle Schnitte einer Box gemeinsam entwickelt. Zum Testen der optimalen Expositionszeit wurden daher einzelne Schnitte einer ganzen Reihe von Präparaten gleicher Signalstärke in separate Boxen sortiert. War die Signalstärken dieser Testboxen zufriedenstellend, wurden auch die restlichen Schnitte der Reihe entwickelt. Zur Entwicklung der belichteten Foto-Emulsion wurden die Objektträger ähnlich den Röntgenfilmen in verschiedenen Bad-Lösungen inkubiert:

Bad-Lösung	Inkubationszeit
Entwickler	4 min
Demineralisiertes H ₂ O	0:30 min
Fixierer	10 min
Fließendes Leitungswasser	mind. 2–3 h

Zur Sichtbarmachung der Gewebsstrukturen und der einzelnen Zellen wurden die Schnitte nach der Entwicklung mit Kresylviolett gegengefärbt. Die gefärbten Gewebeschnitte, wurden anschließend mit Eindeckmedium betropft und eingedeckelt.

2.2.5 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (QPCR)

2.2.5.1 Primerdesign für QPCR

Primer, die für QPCR-Analysen angefertigt wurden, wurden nach möglichst stringenten Kriterien selektiert. So sollten sie weder innerhalb des Oligomers komplementär sein noch zu dem jeweils anderen Oligonukleotid. Zusätzlich durften keine unerwünschten Nukleotidpolymere zu den Primern affin sein, um einer Verfälschung des Analyseresultats vorzubeugen. Für QPCR-Primer ist es sinnvoll, wenn möglich Oligonukleotide zu wählen, die eine Exon/Exon-Grenze überspannen, um Auswirkungen einer Kontamination von genomischer DNA zu minimieren. Zu beachten ist bei der Primerwahl ebenfalls, dass die Amplicons zwischen 70 und 200 Nukleotiden lang sein sollten.

2.2.5.2 Etablierung einer Standardkurve

Zur Validierung der angefertigten Primer wurde erst eine Gradienten-PCR durchgeführt, um sicherzustellen, dass nur eine Bande und keine erkennbare Primerwolke auf dem Agarosegel sichtbar ist. Nach einem positiven Ergebnis wurde die amplifizierte Nukleotidpolymermatrize mithilfe eines Nucleospin Extract II Kits von Macherey-Nagel nach Anleitung aufgereinigt, dabei wurde höchste Beachtung auf Ultrareinheit des Nukleotidpolymers gelegt, um die darauf folgende Standardkurven-Reaktion ohne Störung durch beispielsweise Ethanol durchführen zu können. Die resultierenden Nukleotidlösungen wurden mit einem Nanodrop 2000 gemessen, um die Konzentration zu bestimmen und die Reinheit der Lösung zu validieren. Zwischenzeitlich wurde unter Verwendung eines WebApps (www.bioinformatics.org/sms2/dna_mw.html) das exakte Gewicht eines doppelsträngigen DNA-Produkts bestimmt. Mit der resultierenden Information konnte gemeinsam mit der Konzentration die genaue Anzahl an Molekülen pro μl berechnet werden.

$$\frac{N}{m} * c = \text{Anzahl der Moleküle pro } \mu\text{l}$$

Mit N = Avogadro-Konstante (1/mol), m = Masse eines Mols des Moleküls (g/mol) und c = Konzentration des Polymers (g/ μl). Die Lösung wurde auf eine

Material und Methoden

Amplicon Anzahl von $5 \cdot 10^7$ eingestellt in einer Lösung, die 100 ng/ μ l Träger RNA und dann in dezimalen Größenordnungen absteigend bis auf 5 Moleküle pro μ l verdünnt. Als die Verdünnung abgeschlossen war, konnten die PCRs in der Mikrotiterplatte zusammenpipettiert werden, dabei wurden jeweils von zwei unabhängig voneinander pipettierten Verdünnungsreihen Doppelwerte nach folgendem Protokoll angefertigt:

Power Sybr green-Mix	10 μ l
ddH ₂ O	6 μ l
Primer (1 μ M)	2 μ l
Ampliconverdünnung	2 μ l

Anschließend wurden die Mikrotiterplatten mit Deckelstrips (EU wide optical 8-Cap strip) verschlossen und die PCR mittels eines ABI 7900HT QPCR-Automaten durchgeführt. Dabei wurde jedem Reaktionsraum (well) eine Funktion programmiert, die von Standard mit bekannter Konzentration über eine unbekannte Konzentration des Amplicons bis hin zur Wasserkontrolle reichte. Zusätzlich wurden jeweils noch die Primer zugeordnet, die je in die Reaktionsräume pipettiert wurden. Die Primer-Effizienz konnten dann nach folgender Formel berechnet werden:

$$E = (10^{(-1/m)} - 1) \cdot 100$$

m = Steigung der Ausgleichsgeraden E = Effizienz

Folgende Primerpaare sind mittels einer Standardkurve getestet worden:

PAC1	E = 99,4 %	R ² = 0,9988
Stath1	E = 94,4 %	R ² = 0,9987
StaCa1	E = 96,3 %	R ² = 0,9992

2.2.5.3 Durchführung des Assays

Zur Durchführung eines QPCR-Assays wurden je drei technische Replikate mit je

2 μ g jeder cDNA-Bibliothek aus einer Zellkultur Assay verwendet, dass in dreifachen biologischen Replikaten durchgeführt wurde.

Die Reaktionen wurden nach Anweisung von Power SYBR Green von Applied Biosystems in Mikrotiterplatten pipettiert und mit Deckelstrips (EU wide optical 8-Cap strip) verschlossen. Die PCR wurde mittels eines ABI 7900HT QPCR-Automaten durchgeführt.

2.2.6 Statistische Auswertung

Die mit dem ABI 7900HT QPCR-Automaten gewonnenen Daten wurden in Excel überführt und mit GraphPad Prism4 ausgewertet. Dabei wird ein Two-way Anova Test (Two way analysis of variance) sowie eine Bonferroni Korrektur durchgeführt.

2.2.7 Zellkultur

2.2.7.1 Verwendete Zelllinien

Lewis lung carcinoma (LLC1, murine small cell lung cancer) in DMEM (without Glutamin); 4,5 g/l Glucose 200 mM Glutamin sowie Penizillin und Streptomycin wurden dem Medium noch zugesetzt.

NCI-H60 (humanes kleinzelliges Lungenkarzinom) in RPMI1640 (without Glutamin); 4,5 g/l Glucose 200 mM Glutamin sowie Penizillin und Streptomycin wurden dem Medium noch zugesetzt.

NCI-H69 (humanes kleinzelliges Lungenkarzinom) in RPMI1640 (without Glutamin); 4,5 g/l Glucose 200 mM Glutamin sowie Penizillin und Streptomycin wurden dem Medium noch zugesetzt.

NCI-H146 (humanes kleinzelliges Lungenkarzinom) in RPMI1640 (without Glutamin); 4,5 g/l Glucose 200 mM Glutamin sowie Penizillin und Streptomycin wurden dem Medium noch zugesetzt.

NCI-H187 (humanes kleinzelliges Lungenkarzinom) in RPMI1640 (without Glutamin); 4,5 g/l Glucose 200 mM Glutamin sowie Penizillin und Streptomycin wurden dem Medium noch zugesetzt.

NCI-H209 (humanes kleinzelliges Lungenkarzinom) in RPMI1640 (without Glutamin); 4,5 g/l Glucose 200 mM Glutamin sowie Penizillin und Streptomycin wurden dem Medium noch zugesetzt.

2.2.7.2 Passagieren der Zellen

Die LLC1-Zellen wurden dreimal pro Woche 1 zu 6 passagiert, zwei Tage vor dem Ansatz eines Vitalitätsassays wurden die Zellen erneut 1 zu 4 passagiert. Die NCI-Zelllinien wurden entsprechend ihrer Proliferationsgeschwindigkeit passagiert.

2.2.7.3 Proliferationsassay

Für ein Proliferationsassay wurden 10000 Zellen pro Well auf 12-Well Platten ausgesät, dabei wurden je zehn technische Replikate für jeden experimentellen Ansatz, für den LLC1-Zellen verwendet werden, genutzt. Es wurden unbehandelte Zellen, als Kontrolle und je drei Konzentrationen von PACAP27, PACAP38 und Maxadilan verwendet. Die drei verwendeten Konzentrationen waren 5 nM, 25 nM und 100 nM. Jedes Reaktionsgefäß wurde in den darauf folgenden Tagen im Abstand von 24h fotografiert und in der Folge mithilfe des Programms ImageJ ausgezählt und mit MS Excel ausgewertet. Dabei wurden die Mittelwerte aller Replikate verwendet. Als Fehler wurde die Standardabweichung des Mittelwerts angegeben.

Mit NCI-H82-Zellen wurde das Proliferationsassay, da es sich um Suspensionszellen handelt, mit einer Neubauer Zählkammer gezählt. Dafür wurden 10000 Zellen pro Milliliter in T25 Suspensionszellkulturflaschen ausgesät und alle 24h gezählt, bis eine Plateauphase zu erkennen war. Es wurden für jeden experimentellem Ansatz vier technische Replikate angefertigt und wurde mit Hilfe von MS Excel ausgewertet und die Mittelwerte aller Replikate verwendet. Der angegebene Fehler ist als Standardabweichung des Mittelwerts ermittelt worden.

2.2.7.4 Apoptose-Assay

Dazu wurden Zellen der Zelllinie NCI H82 mit je drei Konzentrationen (5 nM, 25 nM und 100 nM) der PAC1 Liganden PACAP27, PACAP38 und Maxadilan in Medium ausgesät und mit 24 mg/ml CisPt für 24 h bei 37 °C in 12 Well-Platten inkubiert. Die Zellen wurden durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren

vereinzelt, nach Vorschrift mit Hoechst 33258 gefärbt und fixiert. Anschließend wurden die Zellsuspensionen auf Objektträger in einem Volumen von je 10 μ l aufgetropft, kurz nach Augenmaß gewartet, bis das Lösungsmittelvolumen sich durch Verdampfen einengte, und dann mit Eindeckmittel (Fluosafe) und 50x24-mm-Deckgläschen eingedeckt.

Die Zellen wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 350 nm fotografiert und per Hand mit ImageJ gezählt. Mit MS Excel und GraphPad Prism 4.0 werden die Daten ausgewertet. Dabei wurden zur statistischen Auswertung der two-way anova test sowie die Bonferroni Korrektur angewendet.

2.2.7.5 FRET-Assay

Für ein FRET-Assay wurden LLC1-Zellen mit EPAC camps 1 mittels Effectene (Qiagen) transfiziert; nach 24 h wurden die Zellen auf runde Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen passagiert und erneut 24 h inkubiert. Für das Experiment wurden dann auf dem Deckgläschen positiv transfizierte Zellen mittels eines Nikon Eclipse Ti ausgestattet mit einem 100x Apochromat (NA 1,4) in einer Attofluor-Zellkammer identifiziert. PACAP (Phoenix pharmaceuticals) wurde in Wasser auf eine Konzentration von 100 μ mol/l eingestellt, in FRET-Puffer verdünnt und mittels eines Perfusionssystems (Ala Scientific instruments) in das Reaktionsgefäß geleitet, dabei wird eine einzelne Zelle mit dem Liganden umspült. Die Fluoreszenz wurde mit einem Lambda DG4 Ultra high speed wavelength switcher (Sutter) angeregt, indem im 500-ms-Takt bei einer Belichtung von 30 bis 60 ms die fokussierte Zelle illuminiert wurde. Das resultierende durch Fluoreszenz emittierte Licht wurde mit Kaleidagraph aufgezeichnet und mittels MS Excel ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Detektion der PACAP-Rezeptorgenexpression in LLC1-Zellen und subkutanen LLC1-Transplantaten

Zunächst wurden alle Primer in murinen Gehirnextrakten der C57 bl.6-Maus getestet. Wie erwartet konnten für alle PACAP-Rezeptoren Transkripte im Maushirn nachgewiesen werden. In der LLC1-Zelllinie und subkutanen (sc) LLC1-Transplantaten konnten PAC1-Rezeptoren mit drei verschiedenen Primerpaaren nachgewiesen werden. Auch Spuren von VPAC2 mRNA ließen sich in der LLC1-Zelllinie detektieren. VPAC1 Transkripte waren weder in Extrakten der LLC1-Zellen noch deren LLC1-Transplantaten nachweisbar. Beim Vergleich der Zelllinie und den subkutanen Transplantaten zeigt eine leicht unterschiedliche Intensität in den Banden der PAC1-Splicevarianten. VPAC2 konnte in den Transplantaten lediglich mit einem Primerpaar nachgewiesen werden (vgl. **Abb. 3.1 und Tab. 3.1**). Durch Einsatz Splicevarianten-spezifischer Primer konnte der PAC1-Rezeptor in unterschiedlicher Abundanz nachgewiesen werden.

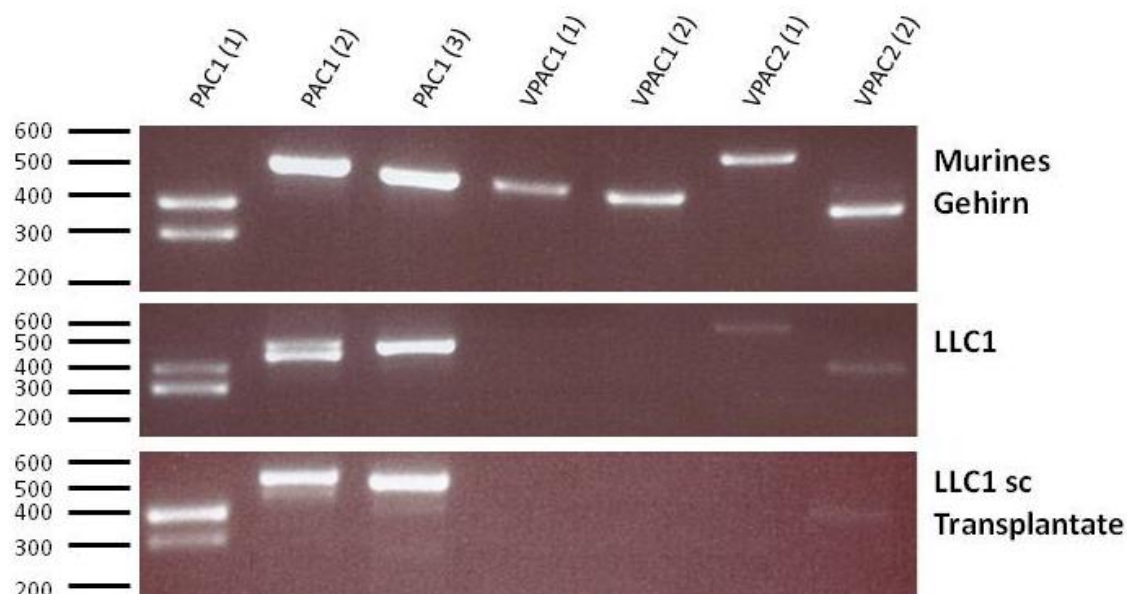


Abbildung 3.1 Nachweis der PACAP-Rezeptorgenexpression auf mRNA-Ebene in LLC1-Zellen und sc-LLC1-Transplantaten mittels RT-PCR. Zur Verifikation wurde eine cDNA-Bibliothek eines murinen Hirns verwendet. Die Analyse erfolgte auf einem 1,2%igen Agarosegel nach einer 35-Zyklus-PCR. Zum Größenvergleich wurde eine DNA-Leiter verwendet. Größe der Amplikons siehe **Tabelle 3.1**

Tabelle 3.1 Tabellarische Zusammenfassung der nachgewiesenen PACAP-Rezeptor-Transkripte in den cDNA-Bibliotheken der LLC1-Zelllinie, der sc LLC1-Transplantate und eines murinen Gehirns in Relation zu den theoretisch detektierbaren Banden.

Primerpaar	Mögliche Banden (bp)	Detektierte Banden LLC1-Zelllinie cDNA (bp)	Detektierte Banden sc LLC1-Transplantate (bp)	Detektierte Banden Maushirn (bp)
PAC1 (1)	303/384/387/471	303/(384/387)	303/(384/387)	303/(384/387)
PAC1 (2)	447/510	447/510	447/510	510
PAC1 (3)	485	485	485	485
VPAC1 (1)	475	-	-	475
VPAC1 (2)	453	-	-	453
VPAC2 (1)	572	572	-	572
VPAC2 (2)	385	385	385	385

3.2 Differenzierung der Expression von PAC1-Splicevarianten in LLC1-Zellen und sc LLC1-Tumor

Im Folgenden wurden die LLC1-Zellen und Tumortransplantate auf das Vorkommen der wichtigsten bekannten PAC1-Splicevarianten untersucht. Alle Ergebnisse sind in **Abb.3.2** illustriert und in **Tabelle 3.2** zusammengefasst.

Zum Nachweis von PAC1-Splicevarianten war auf die null-, die hip-, die hop1/2- sowie hiphop1-/hiphop2-Splicevarianten analysiert worden. Von diesen sechs genannten Splicevarianten konnten drei mit Sicherheit nachgewiesen werden. Da wie unter **1.2** erläutert hop2 eine Aminosäure kürzer ist als hop1, konnten diese Splicevarianten nicht mit den zur Verfügung stehenden Primerpaaren unterschieden werden (**vgl. Abb. 3.2 a) und Tab. 3.2).**

Der Nachweis der PAC1-Splicevariante short (s) konnte ebenfalls sowohl in LLC1-Zellen als auch im sc-LLC1-Transplantat erbracht werden, nicht aber die PAC1-Splicevariante very short (vs) (**vgl. Abb. 3.2 b und Tab. 3.2).**

Ergebnisse

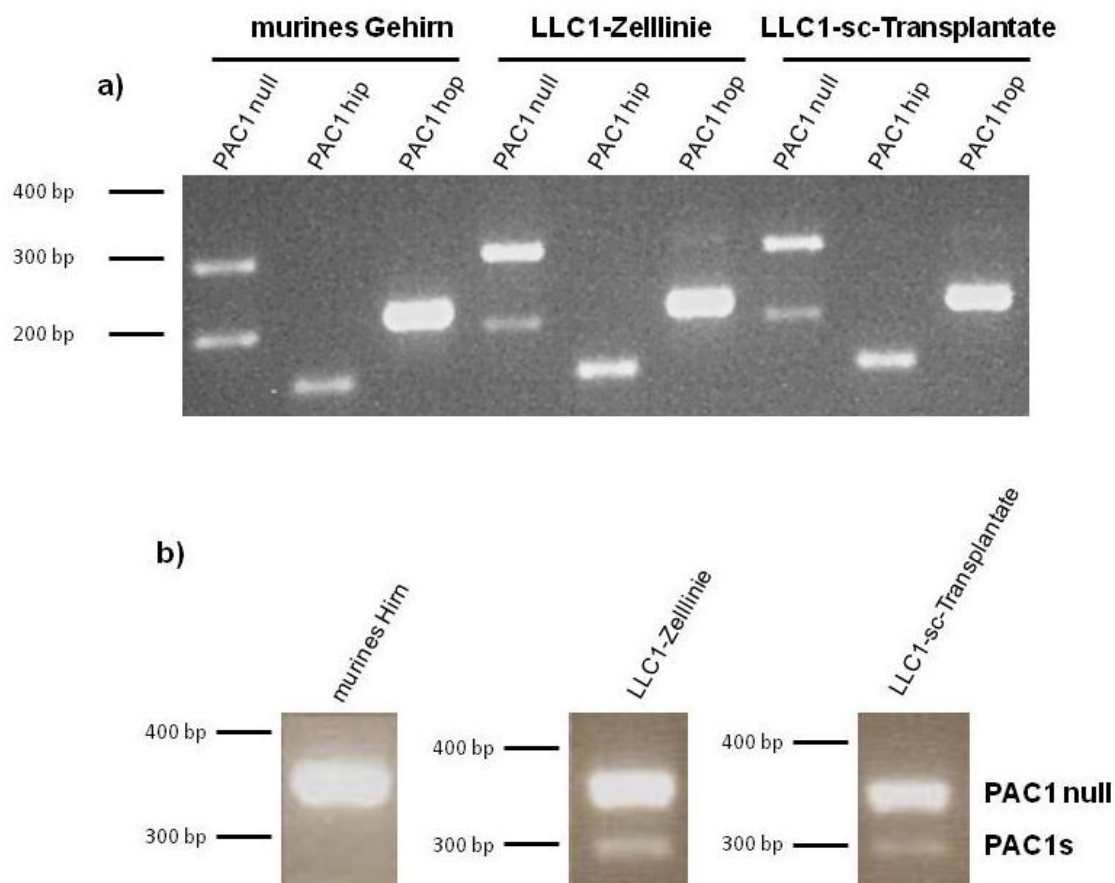


Abbildung 3.2 Nachweis von PAC1-Splicevarianten a) null, hip, hop1/2 und **b)** s. Der Nachweis erfolgte mit cDNA-Bibliotheken der LLC1-Zelllinie und des sc LLC1-Transplantats. Zur Verifikation wurde die cDNA-Bibliothek eines murinen Gesamthirns verwendet. Die Analyse erfolgte auf einem 1,2%igen Agarosegel nach einer 35-Zyklen-PCR. Zum Größenvergleich wurde eine DNA-Leiter verwendet.

Tabelle 3.2 Überblick der theoretisch detektierbaren Banden (Splicevarianten) bezogen auf Abb. 1.4 Die erste Größenangabe entspricht Splicevariante null, die zweite entspricht hop2, die dritte entspricht hip/hop1, die vierte entspricht hiphop2 und die fünfte entspricht hiphop1 bezogen auf das Primerpaar PAC1 null. Für das Primerpaar PAC1s/vs entspricht die erste Größenangabe der Splicevariante null, die zweite der Splicevariante s und die dritte der Splicevariante vs.

Primerpaar	Mögliche Banden (bp)	Detektierte Banden LLC1-Zelllinie cDNA (bp)	Detektierte Banden sc LLC1-Transplantate (bp)	Detektierte Banden murines Hirn (bp)
PAC1 null	187/268/271/352/355	187/271	187/271	187/271
PAC1 hip	200	200	200	200
PAC1 hop	142	142	142	142
PAC1s/vs	350/277/169	350	350/277	350/277

3.3 Expressionsprofil des VIP-/PACAP-Systems und der putativen PACAP-abhängigen Zielgene Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 in der Mauslunge mit LLC1-Tumoren: Einfluss von transgener NGF-Überexpression

In der mRNA einer C57/bl6-Mauslunge mit LLC1-Tumoren im direkten Vergleich mit dem Transkriptom einer wildtyp C57/bl6-Mauslunge ohne Tumor konnten Hinweise auf ein Auftreten von PAC1-Transkripten nachgewiesen werden, die vermutlich originär aus LLC1-Zellen stammen (**vgl. 3.1 und 3.2**). Im Vergleich zum LLC1-Transkriptom konnten zusätzlich eine schwache zusätzliche Bande oberhalb der durch die hop-Splicevarianten-spezifischen Primer und substantielle Banden für VPAC1 und VPAC2 nachgewiesen werden sowie eine sehr schwache Expression von VIP-Transkripten.

Eine Überexpression von nerve growth factor (NGF) führt in der Mauslunge zu einer geringeren Tumorlast von LLC1-Transplantaten (Vortrag K. Seidler).

Das Expressionsmuster des PACAP-Systems in der Lunge der C57/bl6-NGFtg-Maus unterscheidet sich deutlich von dem des Wildtyps: Der PAC1-Rezeptor konnte nur in Spuren detektiert werden. Die Expression von VPAC1 und VPAC2 ist deutlich schwächer und VIP ist nicht detektierbar.

Die Expression der PAC1-Splicevarianten, aber auch von VPAC1 und VPAC2 in der cDNA-Bibliothek der C57/bl6-NGFtg-Maus mit LLC1-Tumoren war auf mRNA-Ebene herunterreguliert. Darüber hinaus waren Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 nur schwach detektierbar (**vgl. Abb. 3.3**).

Ergebnisse

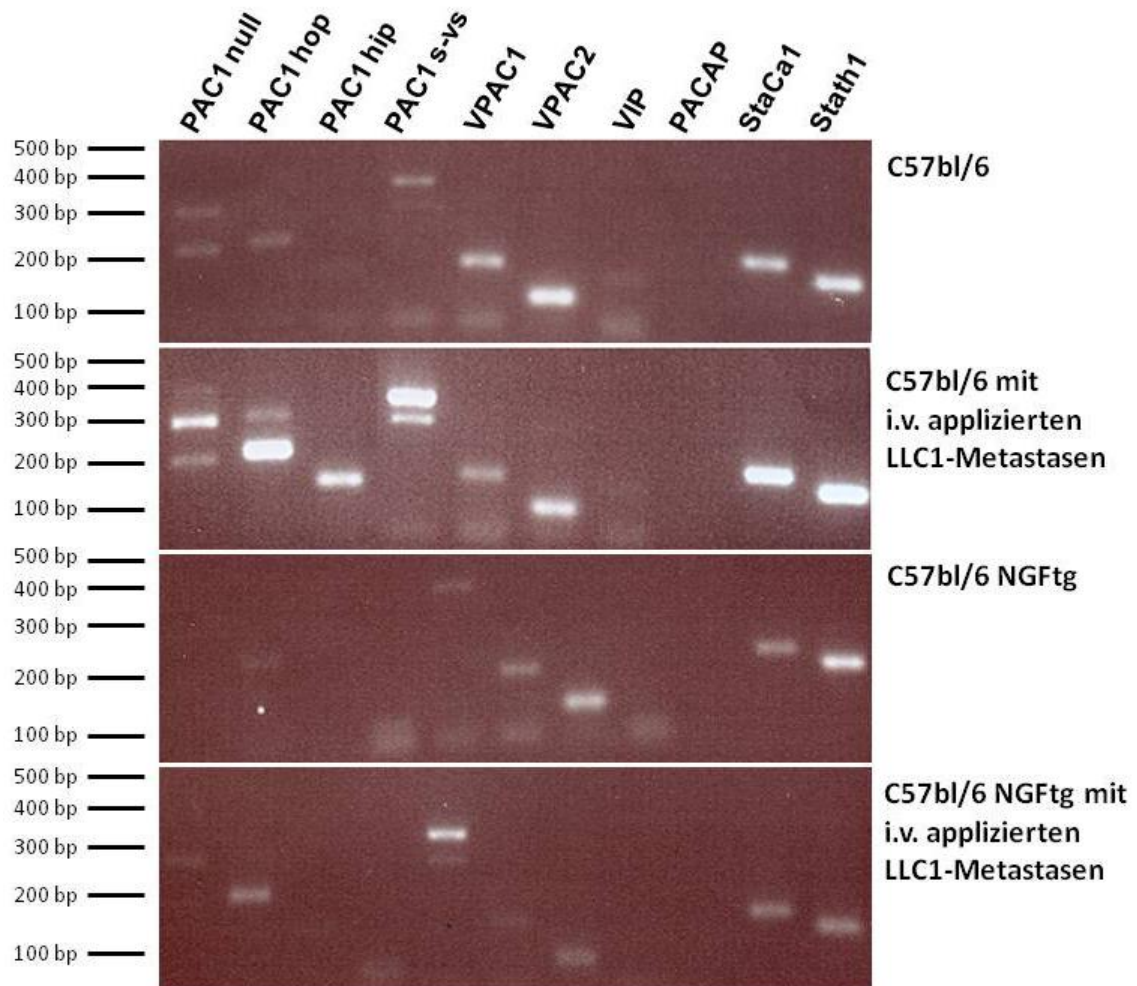


Abbildung 3.3 Nachweis des PACAP/VIP-Systems und PAC1 abhängige Zielgene von PAC1 (Stanniocalcin 1 und Stathmin 1) in jeweils einer Gesamtlungen-cDNA von C57/bl6- und C57/bl6-NGF-transgener Maus, mit und ohne i. v. applizierte LLC1-Tumoren. Die Analyse erfolgte auf einem 1,5%igen Agarosegel nach einer 35-Zyklen-PCR. Zum Größenvergleich wurde ein DNA-Leiter verwendet.

3.4 Expressionsmuster von PACAP, VIP und der PACAP-Rezeptoren und der Expression von PACAP und VIP in der Haut und Lunge nach LLC1-Tumortransfer

Nachdem die mRNA mittels RT-PCR nachgewiesen worden war, sollte mittels radioaktiver *In situ* Hybridisierung (ISH) die Lokalisierung innerhalb der Tumortransplantate analysiert werden.

In Gewebeschnitten eines sc-LLC1-Tumors konnte einzig das Expressionsmuster des PAC1-Rezeptors detektiert werden. Die Signalintensität ist stellenweise schwächer, was vermutlich auf Nicht-Tumorzellen der Tumormikroumgebung oder Gewebenekrosen zurückführbar ist (vgl. Abb. 3.4).

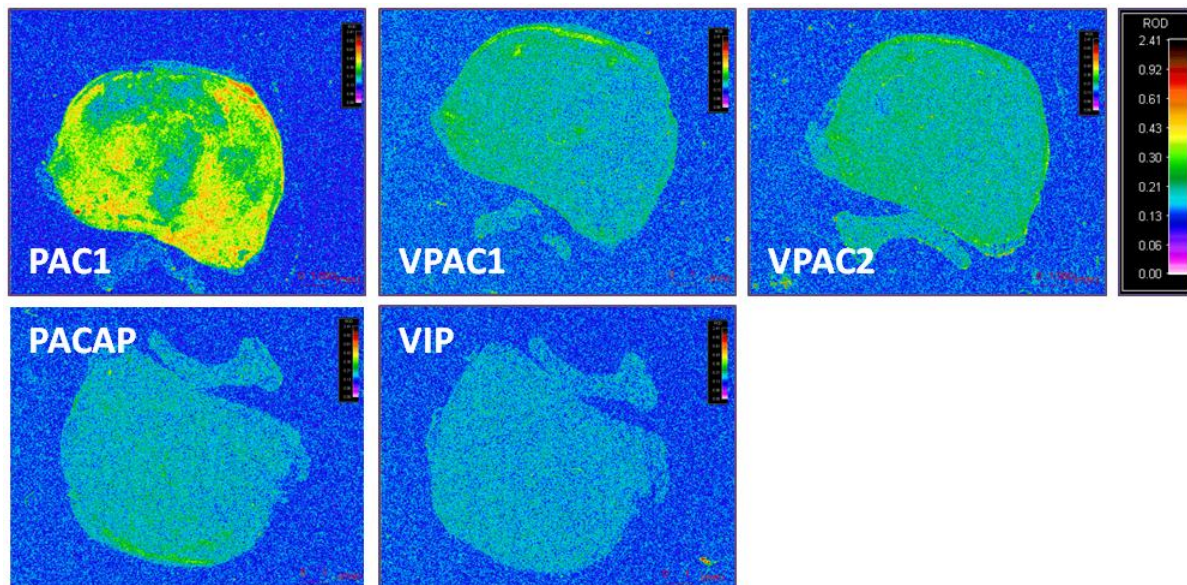


Abbildung 3.4 Expressionsmuster des PACAP-Systems in sc-LLC1-Tumoren mit radioaktiver *in situ*-Hybridisierung auf dem Röntgenfilmautoradiogramm. PAC1 zeigt eine deutliche Expression auf mRNA-Niveau. In den weiteren Gewebeschnitten beruht das Signal jedoch lediglich auf Hintergrund- und Edging-Effekten.

Ergebnisse

Die Transkripte von PAC1, Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 waren in dem Lungentumor der C57/bl6-Maus eindeutig nachweisbar. Besonders deutlich konnten Transkripte von Stathmin 1 nachgewiesen werden. In den Gewebeschnitten des NGFtg-Tiers mit Tumorlast ließen sich Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 nachweisen, zu erkennen ist auch eine starke Überlappung der Expressionsmuster (vgl. Abb. 3.5).

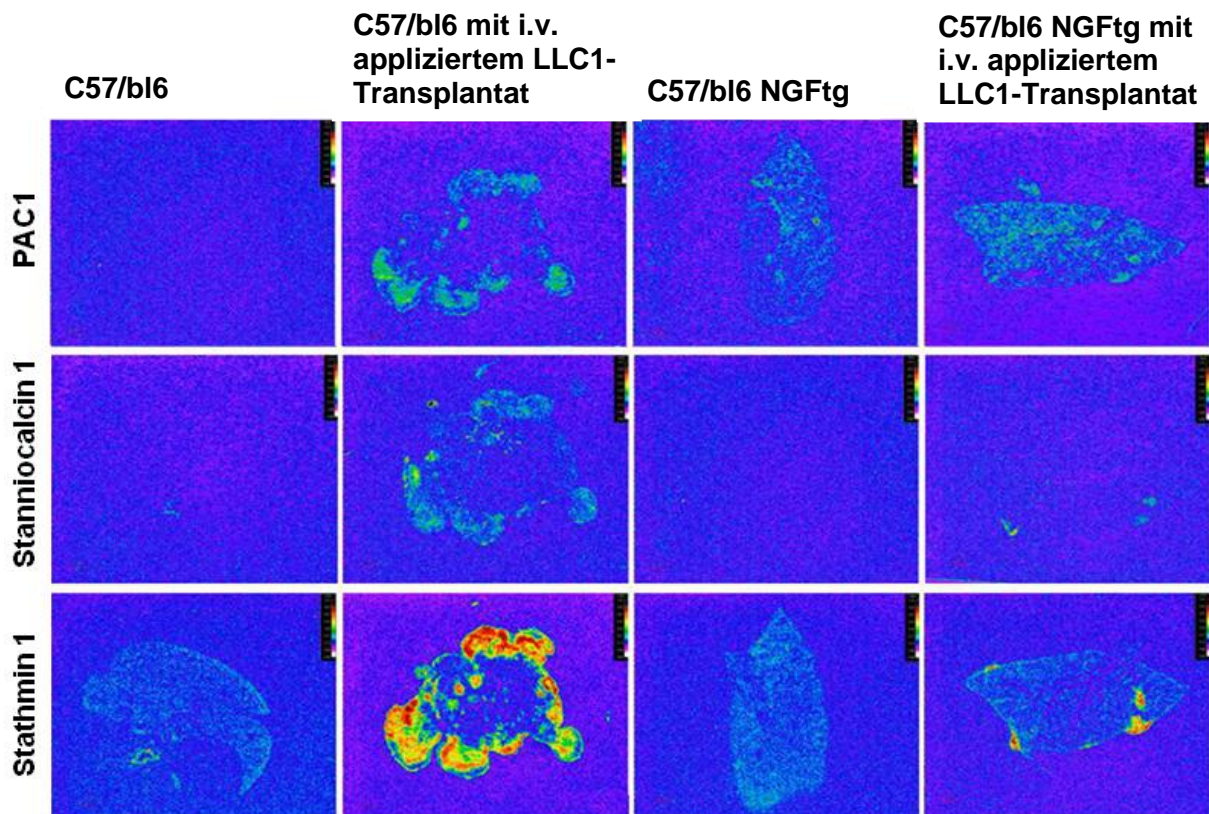


Abbildung 3.5 Expressionsmuster der Transkripte von PAC1, Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 in Lungengewebeschnitten von C57/BL6- und NGFtg-C57/BL6-Mäusen jeweils mit und ohne i. v. applizierte LLC1-Metastasen. Nachweisbar ist jeweils eine verstärkte Expression des untersuchten Transkripts in dem Tumorgewebe. Besonders deutlich zu erkennen bei Stathmin 1. Exposition der Autoradiogramme 24h.

3.5 Funktionalität des PAC1-Rezeptors in der LLC1-Zelllinie

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die LLC1-Zelllinie die PACAP-Rezeptoren und die putativen Zielgene Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 auf mRNA-Niveau exprimiert, sollte der Nachweis der Funktionalität der PACAP-Rezeptoren erbracht werden. Zur Bestimmung funktioneller PACAP-Rezeptoren wurden FRET-Experimente durchgeführt, die den Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration messbar machten. Eine Dosiswirkungskurve von PACAP38 wurde mit den LLC1-Zellen erstellt, indem Konzentrationen von 5, 15, 50, 150 und 500 pM sowie 5 nM PACAP38 verwendet wurden. Die so kalkulierte EC_{50} lag bei ca 60 pM (vgl. Abb. 3.6).

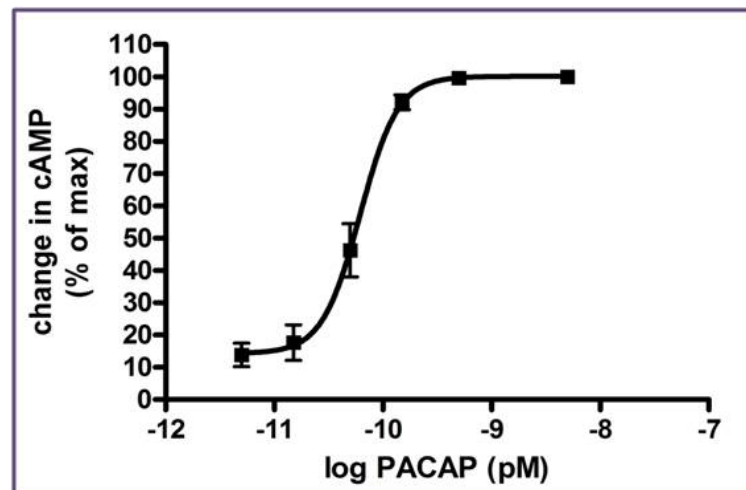
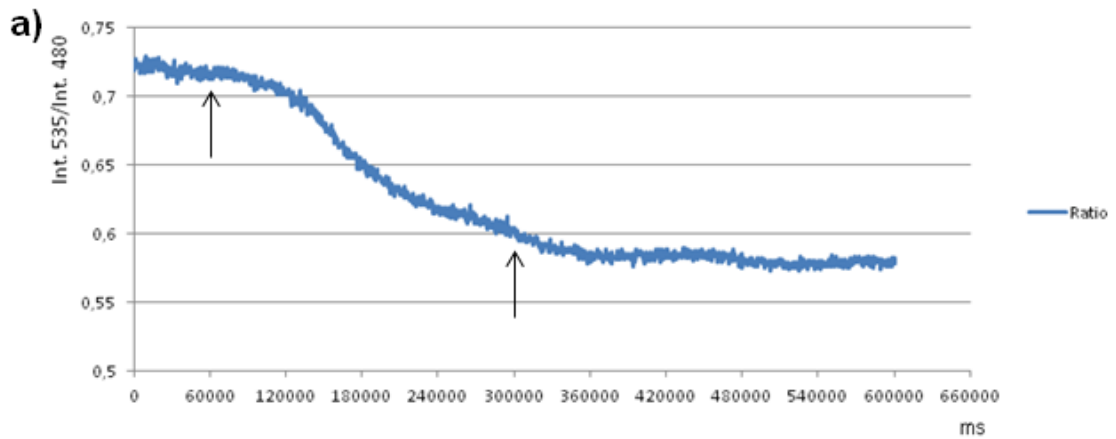


Abbildung 3.6 Dosiswirkungskurve von PACAP38 auf die murine Zelllinie LLC1. Auf der Ordinate ist die Veränderung der cAMP-Konzentration in Prozent der Maximaländerung aufgetragen und auf der dekadisch logarithmisch skalierten Abszisse die Konzentration von PACAP38.

Im Zuge der Messung der Daten zur Errechnung der Dosiswirkungskurve fiel auf, dass während des routinemäßig durchgeführten Waschens mit FRET-Puffer die Fluoreszenz-Ratio nicht wieder anstieg. Dieser Effekt wurde reproduziert, indem mit 50 pM PACAP38 stimuliert wurde und dann für fünf Minuten mit FRET-Puffer gespült. Es bestätigte sich die Vermutung, dass eine persistierende Aktivierung der PACAP-Rezeptoren vorlag. Zum Vergleich wurde mit Isoprenalin die cAMP-Synthese aktiviert, durch ein Auswaschen fiel innerhalb weniger Sekunden die cAMP-Konzentration wieder auf den Ausgangswert ab (vgl. Abb. 3.7).

Ergebnisse

PACAP38



Isoprenalin

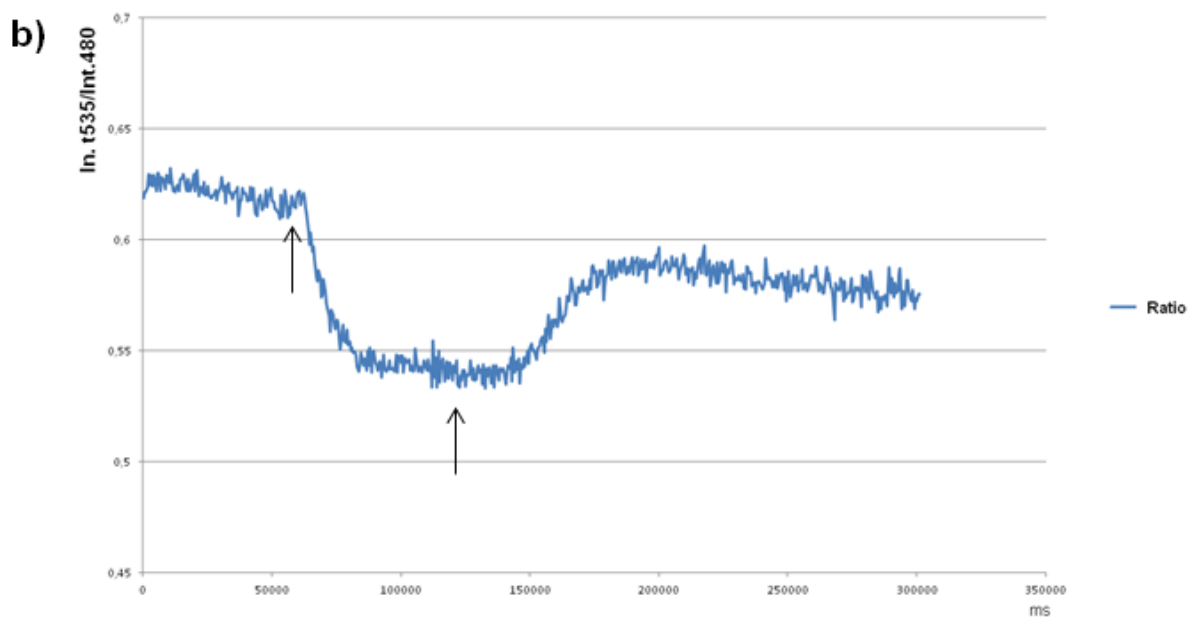


Abbildung 3.7 FRET-Messung nach Aktivierung von PAC1 durch PACAP38 und Isoprenalin. a) Die Fluoreszenz-Ratio sinkt nach Gabe des PACAP38 enthaltenden FRET-Puffers ab, normalisiert sich jedoch nicht mehr während der Spülung mit reinem FRET-Puffer. b) Die Ratio sinkt nach Gabe eines Isoprenalin enthaltenden Puffers schnell ab und erholt sich mit der Spülung durch reinen FRET-Puffer. Die Pfeile markieren jeweils den Pufferwechsel.

3.6 Einfluss des PAC1-spezifischen Liganden Maxadilan und der nonselektiven PACAP-/VIP-Rezeptorliganden PACAP38 und PACAP27 auf die Proliferationsrate von LLC1-Zellen

Um zu überprüfen, ob PAC1-Liganden die Proliferationsrate von LLC1-Zellen ändern, wurde die Proliferation nach Applikation unterschiedlicher Konzentrationen von PACAP27, PACAP38 und Maxadilan mit Computergestützter Auszählung gemessen (siehe Abb. 3.8). Die drei Konzentrationen der PAC1-Liganden wurden so gewählt, dass jeweils zusätzliche Einflüsse von sekundären Botenstoffen analysiert werden konnten. 5 nM der Liganden maximiert die cAMP-Antwort, 25 nM liefert die maximale Ca^{2+} -Mobilisierung und 100 nM der Liganden bewirkt eine maximale IP_3 -Antwort (mündl. Mitteilung T. Moody).

Die Auswertung der einzelnen Proliferationskurven ergab, dass die unbehandelten LLC1-Zellen die stärkste Proliferation zeigten und ca. einen Tag früher als alle PACAP27-Ansätze in eine Plateauphase übergangen. Die Proliferation der LLC1-Zellen mit den Konzentrationen 5 nM und 25 nM PACAP27 verliefen identisch, während die Proliferation der LLC1-Zellen mit 100 nM PACAP27 am stärksten gehemmt wurde. Diese Zellen erreichten erst ca. einen Tag später die Plateauphase. Der Einfluss von PACAP38 auf die Proliferation von LLC1-Zellen unterschied sich lediglich geringfügig von dem mit PACAP27. Die LLC1-Zellen mit 100 nM PACAP38 erreichten die Plateauphase wieder als Letzte, der Unterschied zu den niedrigeren Konzentrationen von PACAP38 war aber geringer. Mit Maxadilan konnte ebenfalls ein deutlicher Unterschied im Proliferationsverhalten der LLC1-Zellen nachgewiesen werden. Allerdings wurde die Zellteilung durch 25 nM und 100 nM am stärksten verzögert (**vgl. Abb. 3.8**).

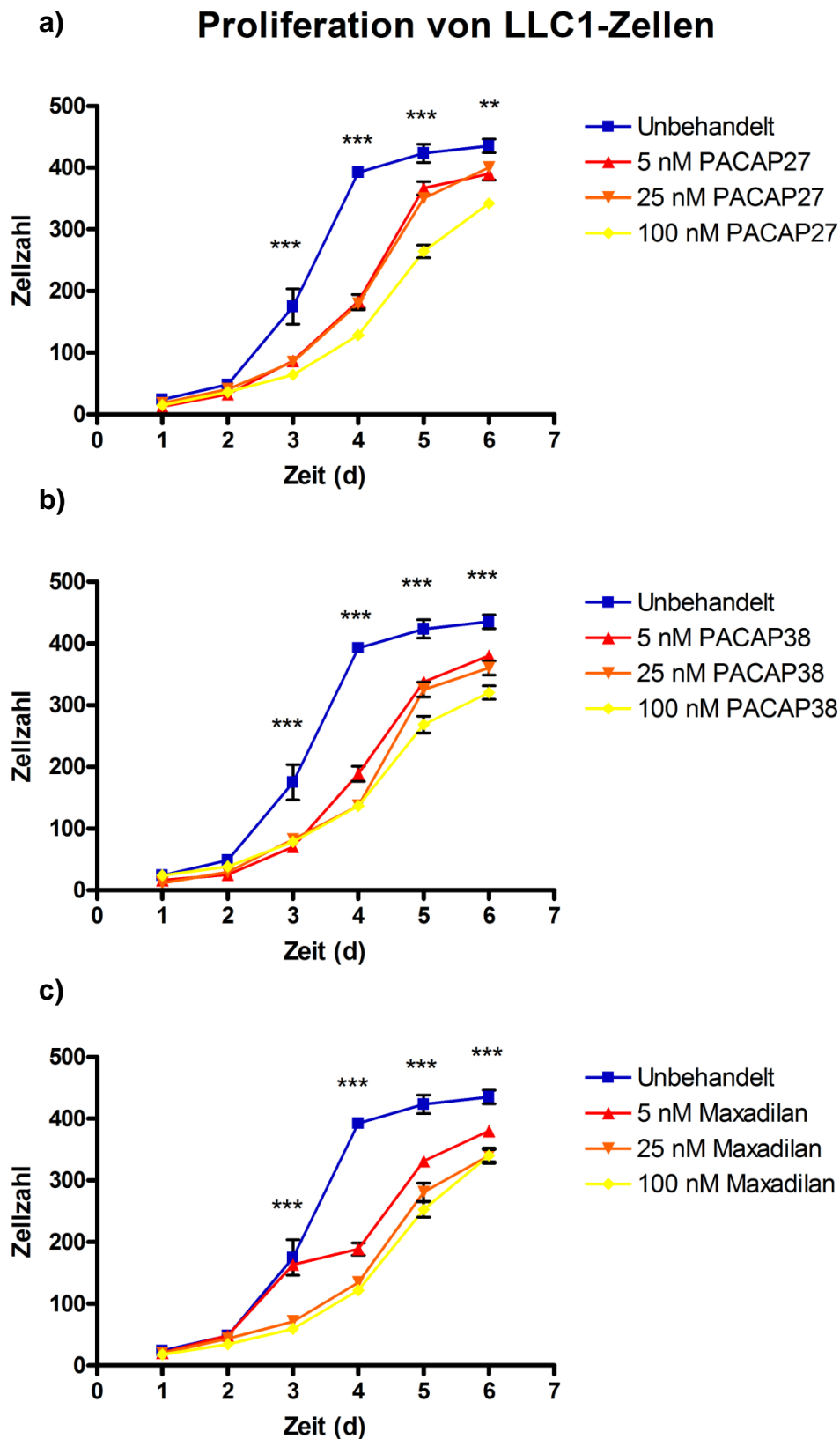


Abbildung 3.8 Nachweis einer Proliferationshemmung durch PAC1-Agonisten. Für das Experiment wurden je zehn technische Replikate von drei unterschiedlichen Konzentrationen (5 nM, 25 nM und 100 nM) der Liganden **a)** PACAP27, **b)** PACAP38 und **c)** Maxadilan verwendet sowie unbehandelte Zellen zum Vergleich der Proliferationsgeschwindigkeit. Die Ordinate gibt die Zellzahl an, während auf der Abszisse die Zeit in Tagen aufgetragen ist. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts. ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,0001$

3.7 Einfluss des PAC1-spezifischen Liganden Maxadilan und der nonselektiven PACAP-/VIP-Rezeptorliganden PACAP38 und PACAP27 auf die Gentranskription von PAC1, Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 in LLC1-Zellen

Zur Analyse der Wirkung von PACAP-Liganden auf die Expression von PAC1, Stathmin 1 und Stanniocalcin 1 wurde eine qPCR-Analyse mit den drei PAC1-Agonisten PACAP27, PACAP38 und Maxadilan durchgeführt. Dazu wurden je drei Konzentrationen (5 nM, 25 nM und 100 nM) der Liganden eingesetzt, die in drei biologischen Replikaten angesetzt wurden. Nach sechs Stunden Stimulation wurden die Zellen geerntet und die RNA mit der Trizolmethode extrahiert. Aus 2 µg RNA wurde dann je eine cDNA-Bibliothek erstellt, die als Matrize für die QPCR-Reaktion diente. Diese Reaktionen wurden mit Power SYBR Green von Applied Biosystems durchgeführt. Die Analyse wurde als absolute QPCR durchgeführt.

Für alle drei eingesetzten Liganden (PACAP27, PACAP38 und Maxadilan) konnte ein Rückgang von PAC1 auf mRNA-Niveau unabhängig von der eingesetzten Konzentration nachgewiesen werden (**vgl. Tabelle 3.3 und Abbildung 3.9**).

	Unbehandelt	5 nM	25 nM	100 nM
PACAP27	3250±792	1250±318	1750±239	1250±406
PACAP38	3250±792	1550±202	1590±186	1450±271
Maxadilan	3250±792	1530±101	1640±248	1350±209

Tabelle 3.3 Nachgewiesene Anzahl der Transkripte von PAC1.

Ergebnisse

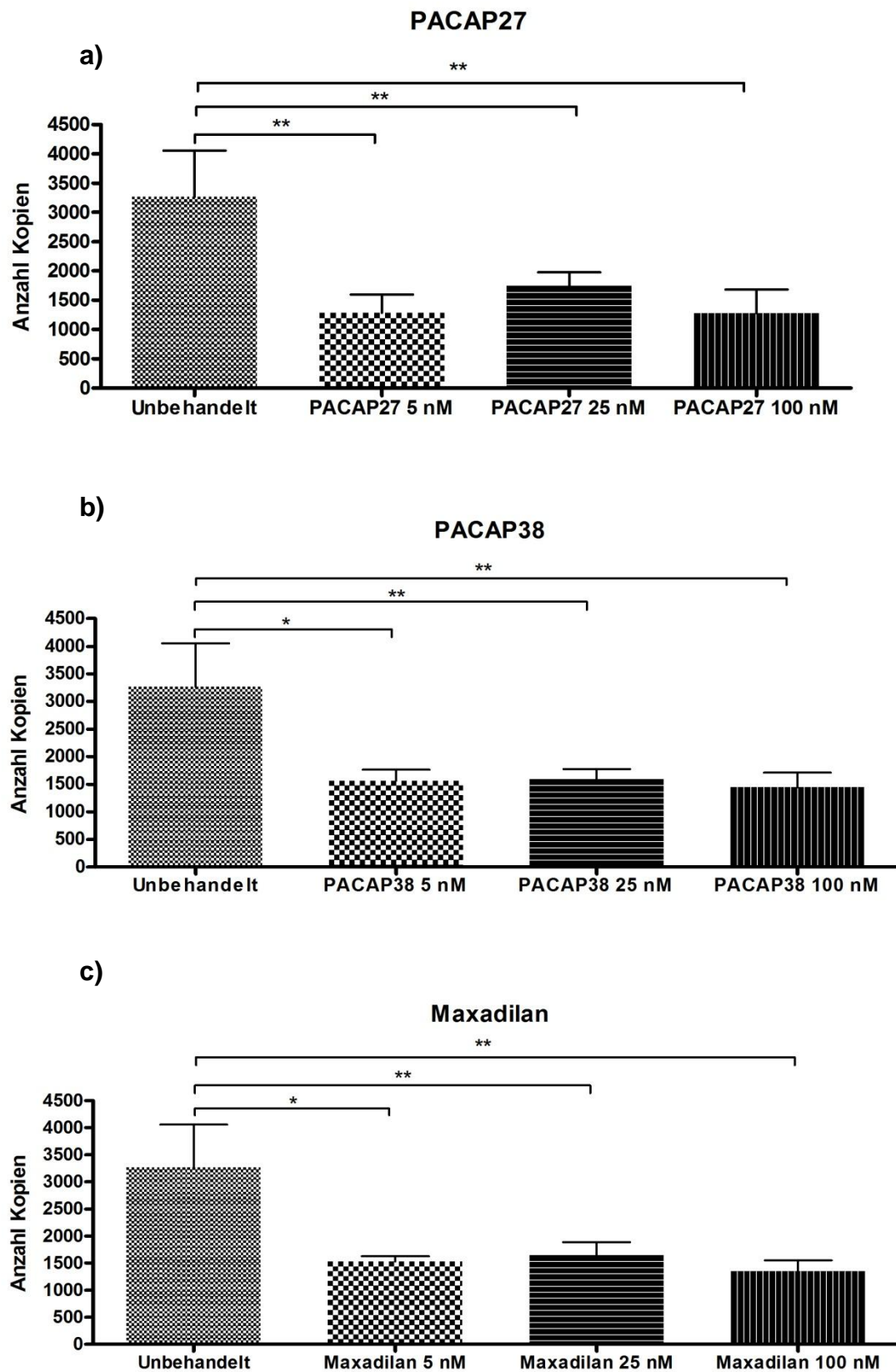


Abbildung 3.9 Säulendiagramm zum Nachweis eines Expressionsrückgangs des PAC1-Rezeptors. Als Matrizen wurden die cDNA-Bibliotheken der mit a) PACAP27, b) PACAP38 und c) Maxadilan behandelten LLC1-Zellen verwendet. Die Liganden wurden in den Konzentrationen 5 nM, 25 nM und 100 nM eingesetzt. Analyse auf Regulation der PAC1-Transkripte. Signifikant nach Two Way Anova und Bonferoni ** = $P < 0,01$; * = $P < 0,05$

Die QPCR-Analyse der cDNA-Bibliotheken für Transkripte von Stathmin 1 resultierte insbesondere in den Zellkulturansätzen, die mit PACAP38 behandelt worden sind, in einer leichten Zunahme an Stathmin-1-mRNA. Allerdings konnten keine statistischen Signifikanzen festgestellt werden (**vgl. Tabelle 3.4 und Abbildung 3.10**).

	Unbehandelt	5 nM	25 nM	100 nM
PACAP27	134000±23762	120.000±17580	173.000±13000	156.000±24299
PACAP38	134000±23762	145.000±13946	177.000±35895	150.000±18266
Maxadilan	134000±23762	138.000±41462	142.000±17513	161.000±30819

Tabelle 3.4 Nachgewiesene Anzahl der Transkripte von Stathmin 1.

Ergebnisse

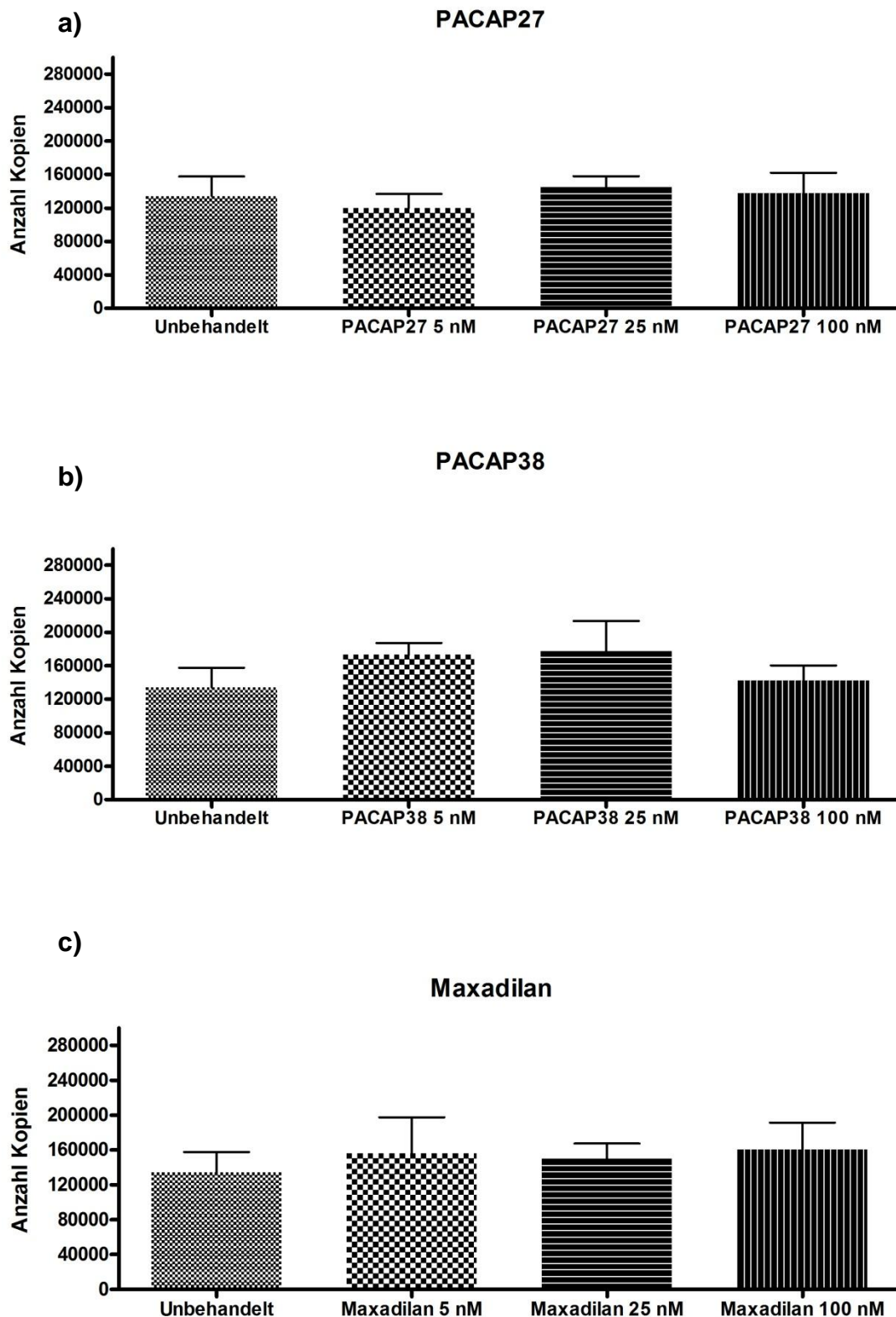


Abbildung 3.10 Säulendiagramm zur Analyse einer transkriptionellen Regulation von Stathmin 1. Als Matrize wurden die cDNA-Bibliotheken der mit **a) PACAP27**, **b) PACAP38** und **c) Maxadilan** behandelten LLC1-Zellen verwendet. Die drei PAC1-Agonisten wurden in den Konzentrationen 5 nM, 25 nM und 100 nM eingesetzt. Signifikant nach Two Way Anova und Bonferoni.

Die QPCR-Analyse des Transkriptoms von LLC1-Zellen auf eine Regulation der Stanniocalcin-1-Transkripte zeigte eine durchweg höhere Kopienzahl bei den niedrigeren (5 nM) und mittleren (25 nM) Konzentrationen der eingesetzten Liganden. Statistisch signifikant war aber nur die Erhöhung der Kopienzahl der mit 5 nM PACAP38 behandelten Zellen ($P < 0,01$). Dies gilt sowohl im Vergleich mit den unbehandelten Zellen als auch im Vergleich mit den Zellen, die mit einer höheren Konzentration des jeweiligen Liganden behandelt wurden (**vgl. Tabelle 3.5 und Abbildung 3.11**).

	Unbehandelt	5 nM	25 nM	100 nM
PACAP27	506±152	830±368	650±256	430±220
PACAP38	506±152	1700±346	800±327	650±230
Maxadilan	506±152	760±265	580±166	590±181

Tabelle 3.5 Nachgewiesene Anzahl der Transkripte von Stanniocalcin 1

Ergebnisse

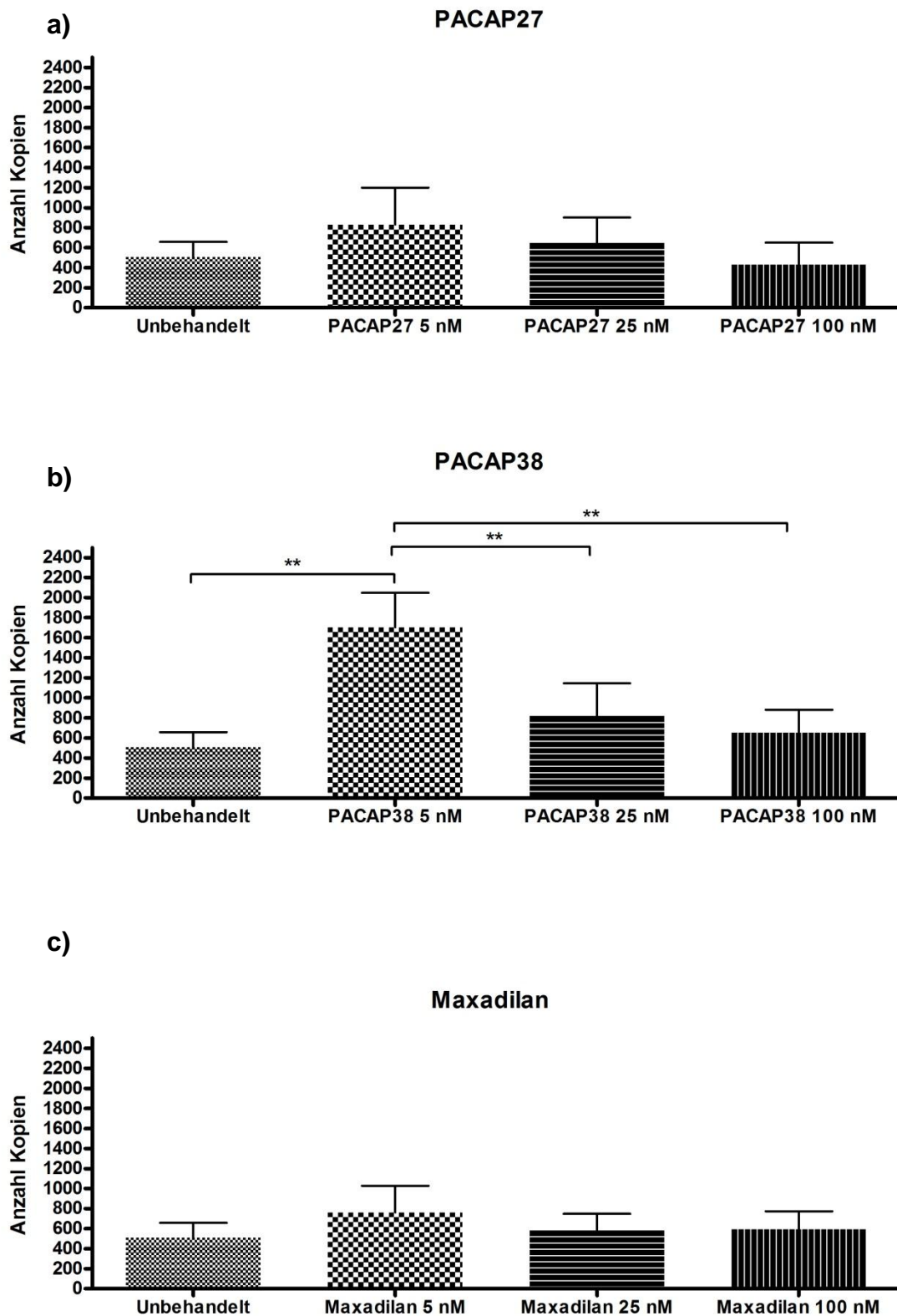


Abbildung 5.11 Analyse der Liganden abhängigen transkriptionellen Regulation von Stanniocalcin 1. Als Matrizen wurden die cDNA-Bibliotheken der mit **a)** PACAP27, **b)** PACAP38 und **c)** Maxadilan behandelten LLC1-Zellen verwendet. Die drei PAC1-Agonisten wurden in den Konzentrationen 5 nM, 25 nM und 100 nM eingesetzt. Signifikant nach Two Way Anova und Bonferoni. ** = $P < 0,01$

3.8 Expressionsprofil des VIP-/PACAP-Systems und der putativen PACAP-Zielgene Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 in humanen SCLC-Zelllinien mehrerer kleinzelliger Bronchialkarzinome

Im Rahmen dieser Arbeit wurden RT-PCR-Analysen an Gesamt-RNA-Extrakten der humanen kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien NCI-H60, -H69, -H82, -H146, -H187, -H209 und -H345 durchgeführt.

Für alle untersuchten Zelllinien konnte ein charakteristisches Expressionsmuster der PAC1/PAC1-Ligand Koexpression festgestellt werden, das eine Einteilung der Zellen in zwei Gruppen mit reziprokem Expressionsmuster erlaubte. Eine Gruppe von Zelllinien (**Gruppe 1**) (H60, H82, H187 und H209) exprimierte PAC1 auf einem hohen Niveau aber weder PACAP noch VIP auf einem anhand von PCR detektierbaren Niveau. Die zweite Gruppe (**Gruppe 2**) (H69, H146 und H345) exprimierte PACAP und PAC1 auf einem sehr viel niedrigeren Niveau. VPAC1 wurde in allen untersuchten Zelllinien exprimiert, dabei konnte aber kein deutliches Muster erkannt werden. Für die putativen Zielgene Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 konnte ebenfalls kein besonderes Expressionsmuster nachgewiesen werden (**vgl. Abb. 3.12–3.14 und Tab. 3.6**).

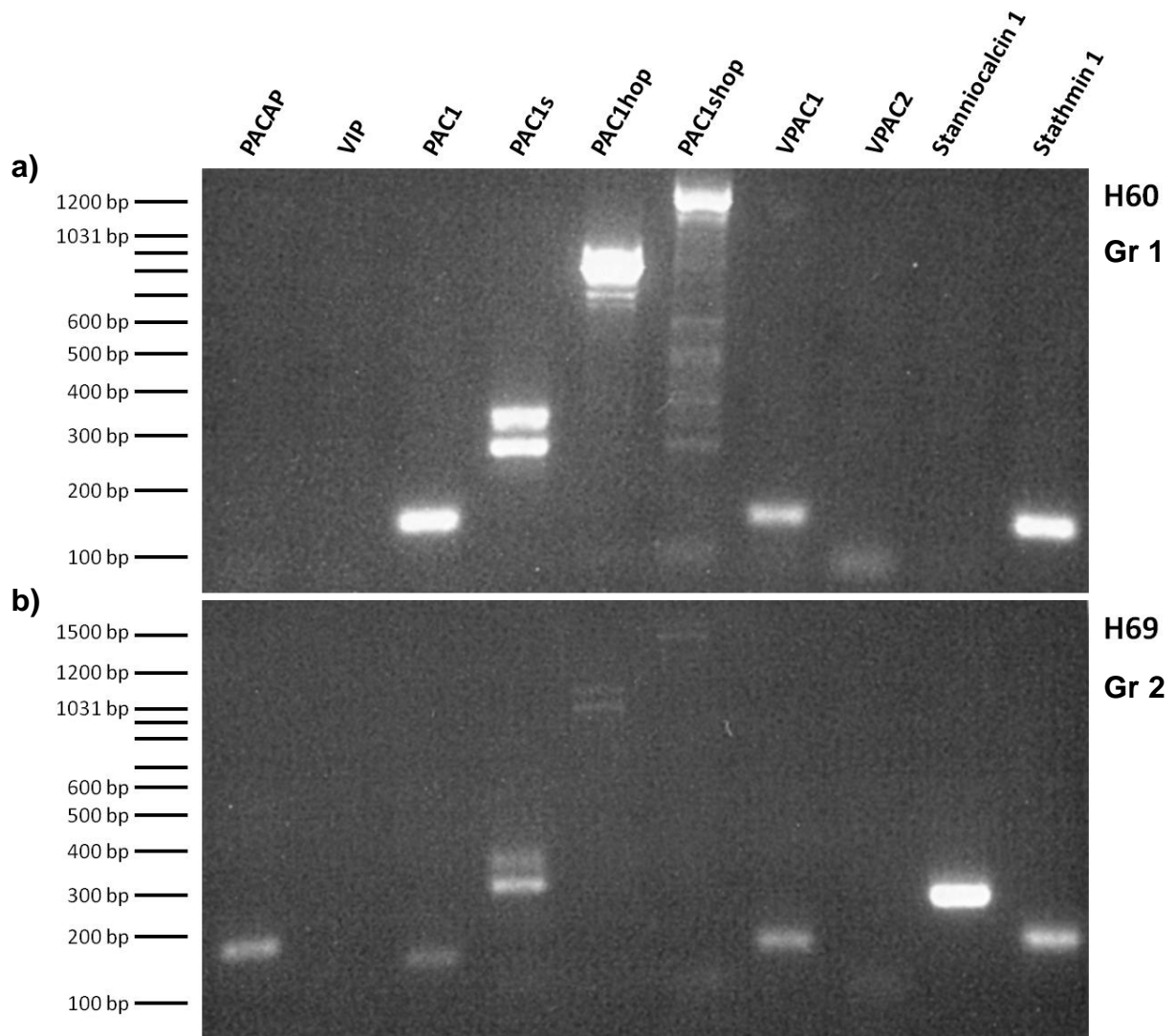


Abbildung 3.12 Detektion von PAC1-Rezeptoren und deren Splicevarianten und des VPAC1-Rezeptors. Zudem wurde eine Analyse auf PACAP und VIP sowie den VPAC2-Rezeptor und die putativen Zielgene Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 durchgeführt. Als Matrize dienen die cDNA-Bibliotheken der humanen kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien **a)** NCI-H60 und **b)** NCI-H69. Die Analyse erfolgte auf einem 1,5%igen Agarosegel. Zum Größenvergleich wurde eine DNA-Leiter verwendet. 35-Zyklen-PCR

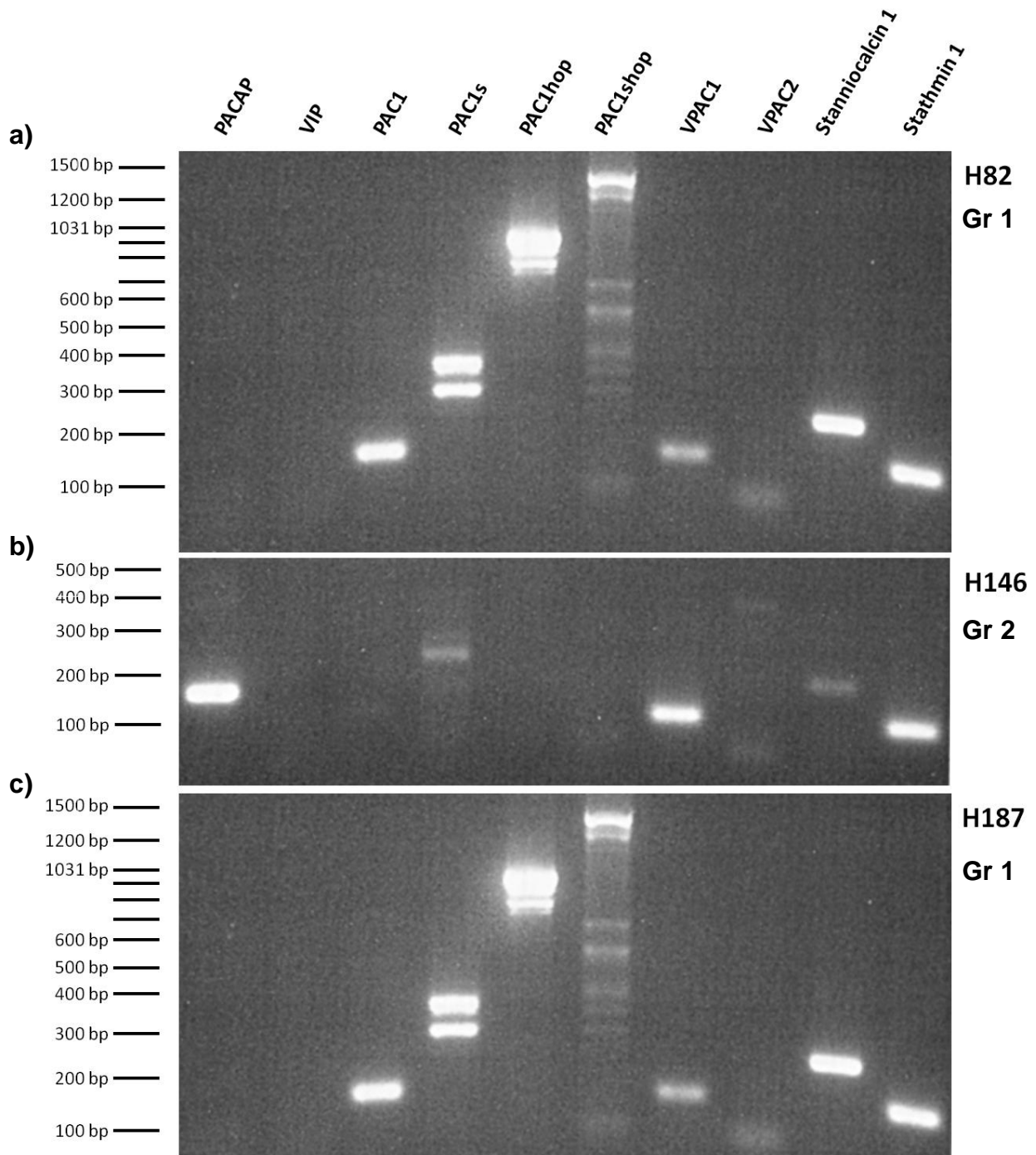


Abbildung 3.13 Detektion des PAC1-Rezeptors und seiner Splicevarianten sowie des VPAC1-Rezeptors. Zusätzlich konnten die putativen Zielgene Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 nachgewiesen werden. Als Matrize dienten die cDNA-Bibliotheken der humanen kleinzelligen Bronchialkarzinom-Zelllinien **a)** NCI-H82, **b)** NCI-H146 und **c)** NCI-H187. Die Analyse erfolgte auf einem 1,5%igen Agarosegel. Zum Größenvergleich wurde eine DNA-Leiter verwendet. Es wurde eine 35-Zyklus-PCR durchgeführt.

Ergebnisse

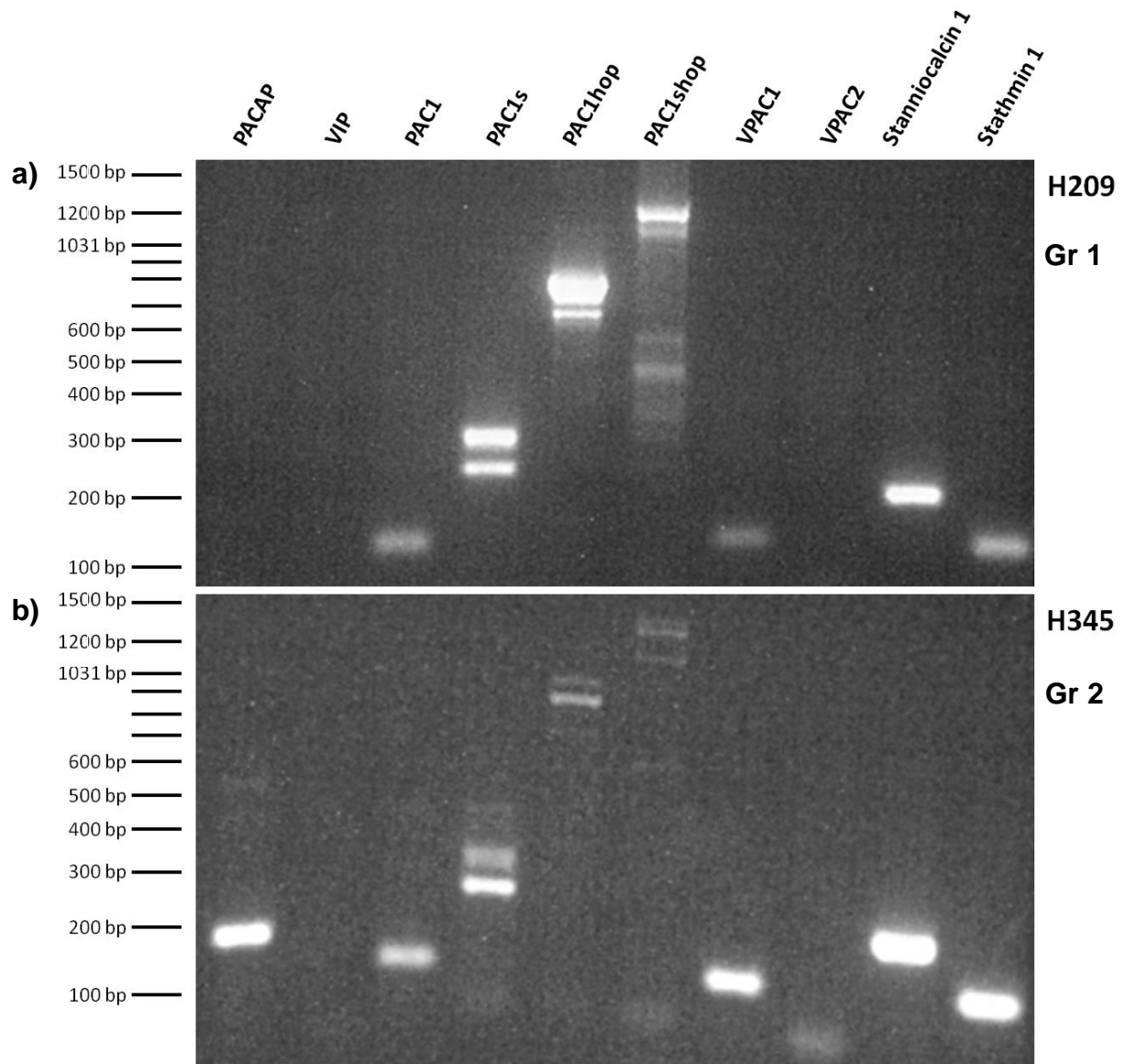


Abbildung 3.14 Nachweis der PACAP-Rezeptoren PAC1 und VPAC1 sowie der Splicevarianten von PAC1. Die putativen Zielgene Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 konnten ebenfalls detektiert werden. Als Template wurden die cDNA-Bibliotheken der humanen kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien **a)** NCI-H209 und **b)** NCI-H345 verwendet. Die Analyse erfolgte auf einem 1,5%igen Agarosegel. Zum Größenvergleich wurde eine DNA-Leiter verwendet. Eine 35-Zyklus-PCR wurde durchgeführt.

Tabelle 3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse der Qualitativen PCR der humanen kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien.

	PAC	VIP	PAC	PAC1	PAC1	PAC1s	VPA	VPA	Stc	Stat	Grup
	AP		1	s	hop	hop	C1	C2	1	h 1	pe
H60	-	-	+++	+++	+++	+++	++	-	-	+++	1
H69	++	-	+	+/-	+/-	+/-	+	-	+++	+	2
H82	-	-	+++	+++	+++	+++	+	-	+++	+++	1
H146	+++	-	+/-	+	-	-	+++	-	+	+++	2
H187	-	-	+++	+++	+++	++	++	-	+++	+++	1
H209	-	-	+	+++	+++	++	+	-	+++	+	1
H345	+++	-	++	++	+	+	+++	-	+++	+++	2

3.9 Expressionsprofil des VIP-/PACAP-Systems und der putativen PACAP Zielgene Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 in verschiedenen humanen kleinzelligen Bronchialkarzinomen

In den Transkriptomen der humanen kleinzelligen Bronchialkarzinome konnten alle drei PACAP-Rezeptoren nachgewiesen werden. Die einzige Ausnahme stellt der Tumor hSCLC 1056 dar, in dem VPAC2 nicht nachgewiesen werden konnte. Von den Liganden konnte PACAP in jedem Tumor nachgewiesen werden, während VIP gar nicht detektiert werden konnte. Die putativen Zielgene Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 konnten gleichermaßen detektiert werden (vgl. Abb. 3.15).

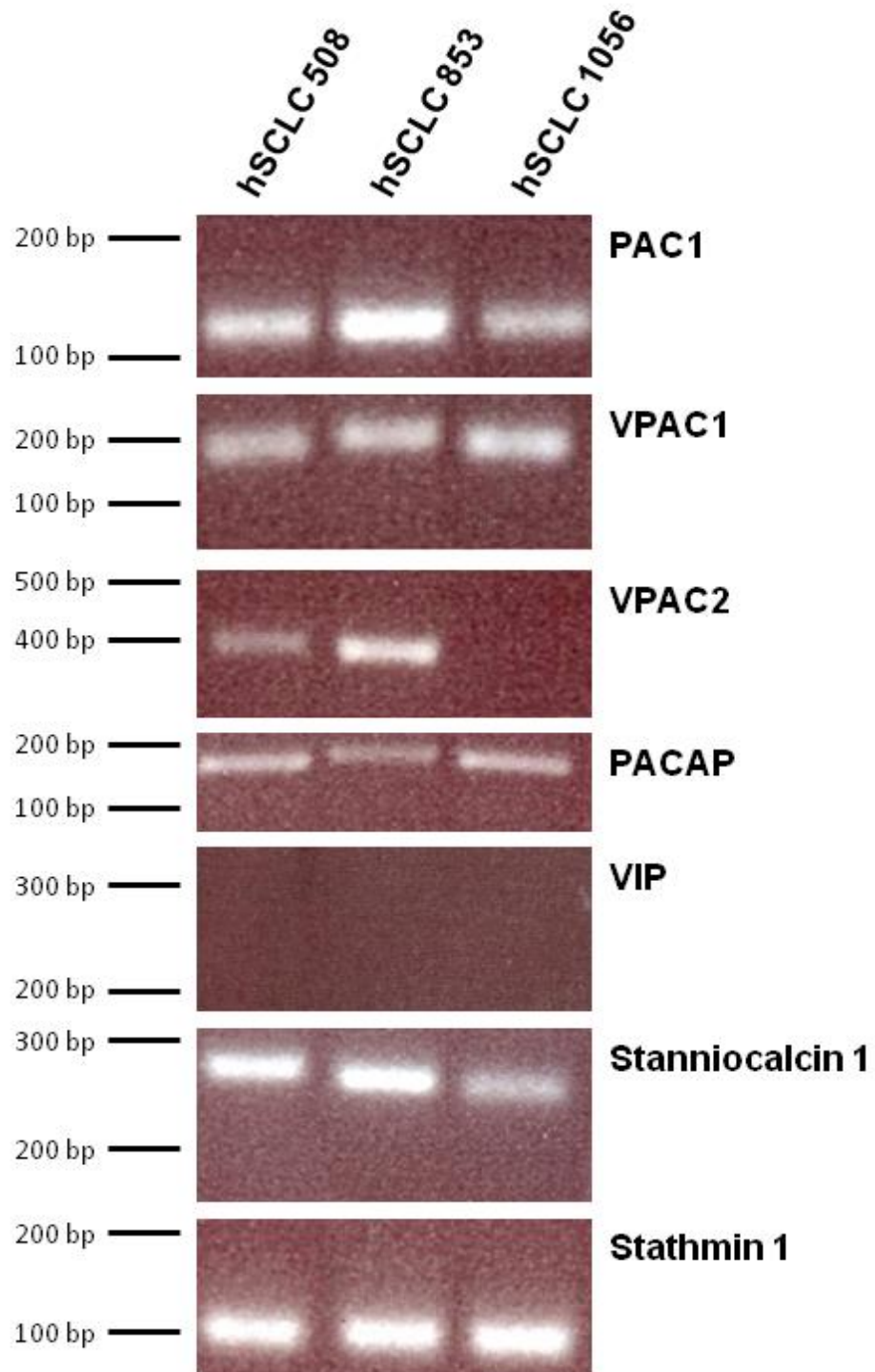


Abbildung 3.15 Nachweis der Expression des PACAP-Systems und Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 in humanen Tumorbiopsien. Als Matrize wurden cDNA-Bibliotheken der humanen kleinzelligen Bronchialkarzinome 508, 853 und 1056 verwendet. Die Analyse erfolgte auf einem 1,5%igen Agarosegel. Zum Größenvergleich wurde eine DNA-Leiter verwendet. Die PCR wurden mit 35-Zyklen durchgeführt.

3.10 Detektion der PAC1-Splicevarianten in cDNA-Bibliotheken verschiedener humaner kleinzelliger Bronchialkarzinome

Die bekannten Splicevarianten des humanen PAC1-Rezeptors konnten in allen untersuchten Tumor-Transkriptomen, abhängig vom PAC1-Expressionspegel, gleichermaßen nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.16).

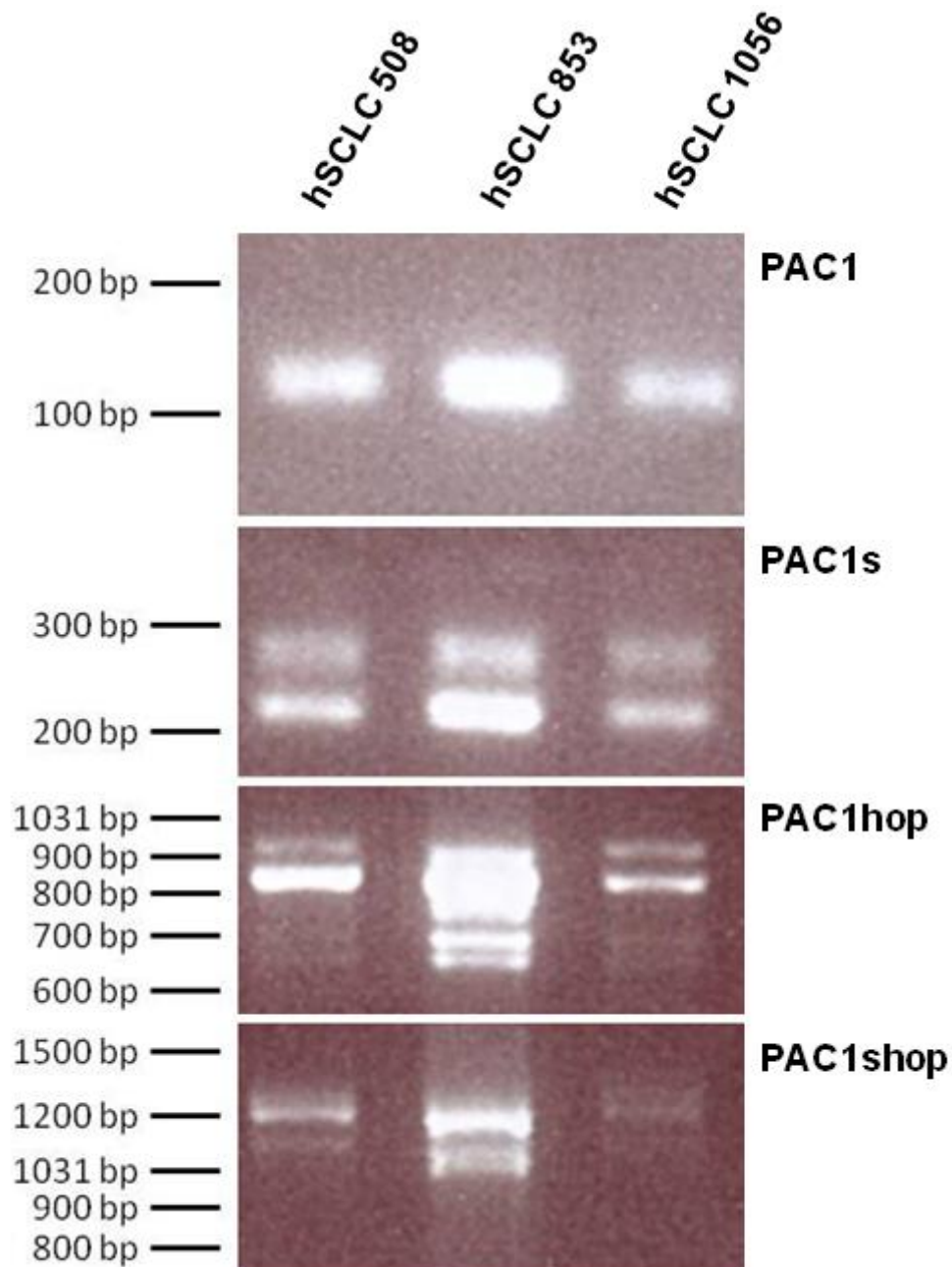


Abbildung 3.16 Nachweis der PAC1-Splicevarianten in cDNA-Bibliotheken der humanen kleinzelligen Bronchialkarzinome 508, 853 und 1056. Die Analyse erfolgte auf einem 1,5%igen Agarosegel. Zum Größenvergleich wurde eine DNA-Leiter verwendet. 35-Zyklen-PCR

3.11 Einfluss von PAC1-Agonisten auf die Zellproliferation der humanen kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinie NCI-H82

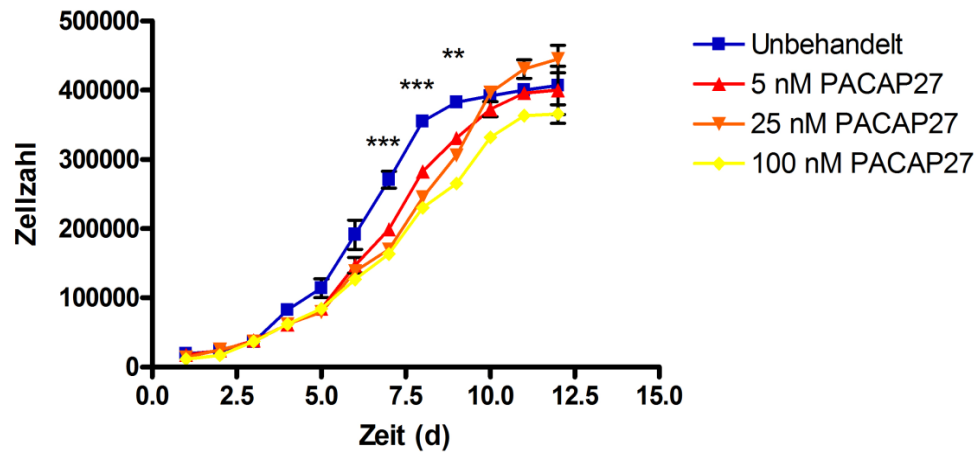
Mit der humanen semiadhärenten Zelllinie NCI-H82 wurden Proliferations-Experimente nach der gleichen Konzeption wie mit den LLC1-Zellen durchgeführt (**vgl. 3.6**). Die Zellzahl wurde aber mit einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die in vierfachen technischen Replikaten angesetzten Versuche wurden alle 24 h über einen Zeitraum von 13 Tagen ausgezählt.

In diesem Experiment war ebenfalls eine Tendenz zur Proliferationshemmung des selektiven (Maxadilan) und der nonselektiven (PACAP27 und PACAP38) Liganden am PAC1-Rezeptor erkennbar. Insbesondere die Maximalzellzahl verzerrt jedoch den Eindruck einer Proliferationshemmung (**vgl. Abb. 3.17**).

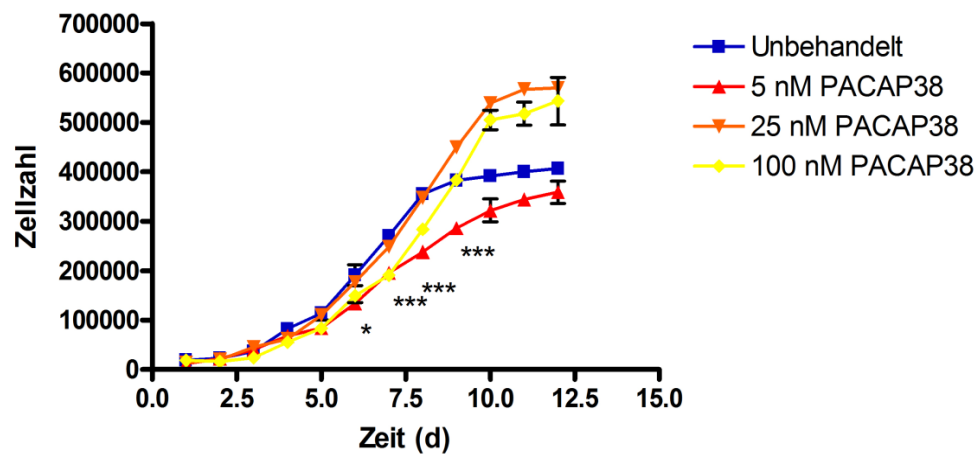
Auf mögliche Störfaktoren wird genauer in der Diskussion (**4.2.3**) eingegangen.

Proliferation von NCI-H82-Zellen

a)



b)



c)

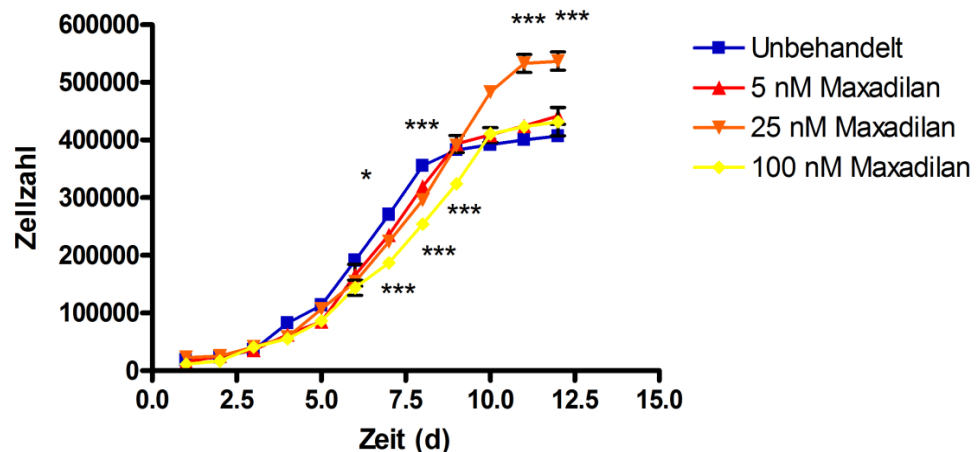


Abbildung 3.17 PACAP abhängige Proliferation der humanen kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinie NCI-H82. Die Ordinate gibt die Zellzahl an, während auf der Abszisse die Zeit in Tagen aufgetragen ist. Für das Experiment wurden je vier technische Replikate von drei unterschiedlichen Konzentrationen (5 nM, 25 nM und 100 nM) der Liganden **a)** PACAP27, **b)** PACAP38, **c)** Maxadilan und unbehandelte Zellen zum Vergleich der Proliferationsgeschwindigkeit verwendet. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,0001$

3.12 Einfluss von PAC1-Agonisten auf die Apoptose von NCI-H82-Zellen unter Applikation des Zytostatikums Cis-Platin

Dazu wurden Zellen der Zelllinie NCI H82 mit je drei Konzentrationen (5 nM, 25 nM und 100 nM) der PAC1-Liganden PACAP27, PACAP38 und Maxadilan ausgesät und mit 24 mg/ml CisPt behandelt. Die apoptotischen Zellen waren im Vergleich zu den nicht apoptotischen Zellen gut zu erkennen, da sich Größe und Anzahl der apoptotischen Körper von einem unveränderten Zellkern gut unterscheiden ließen. Die Apoptoserate der mit CisPt behandelten Zellen lag bei ca. 73 %, während die Apoptoserate der unbehandelten Zellen bei 0 % lag. Für alle verwendeten Konzentrationen der PAC1-Liganden konnte kein signifikanter Unterschied in der Apoptoserate festgestellt werden (**vgl. Abb. 3.18**).

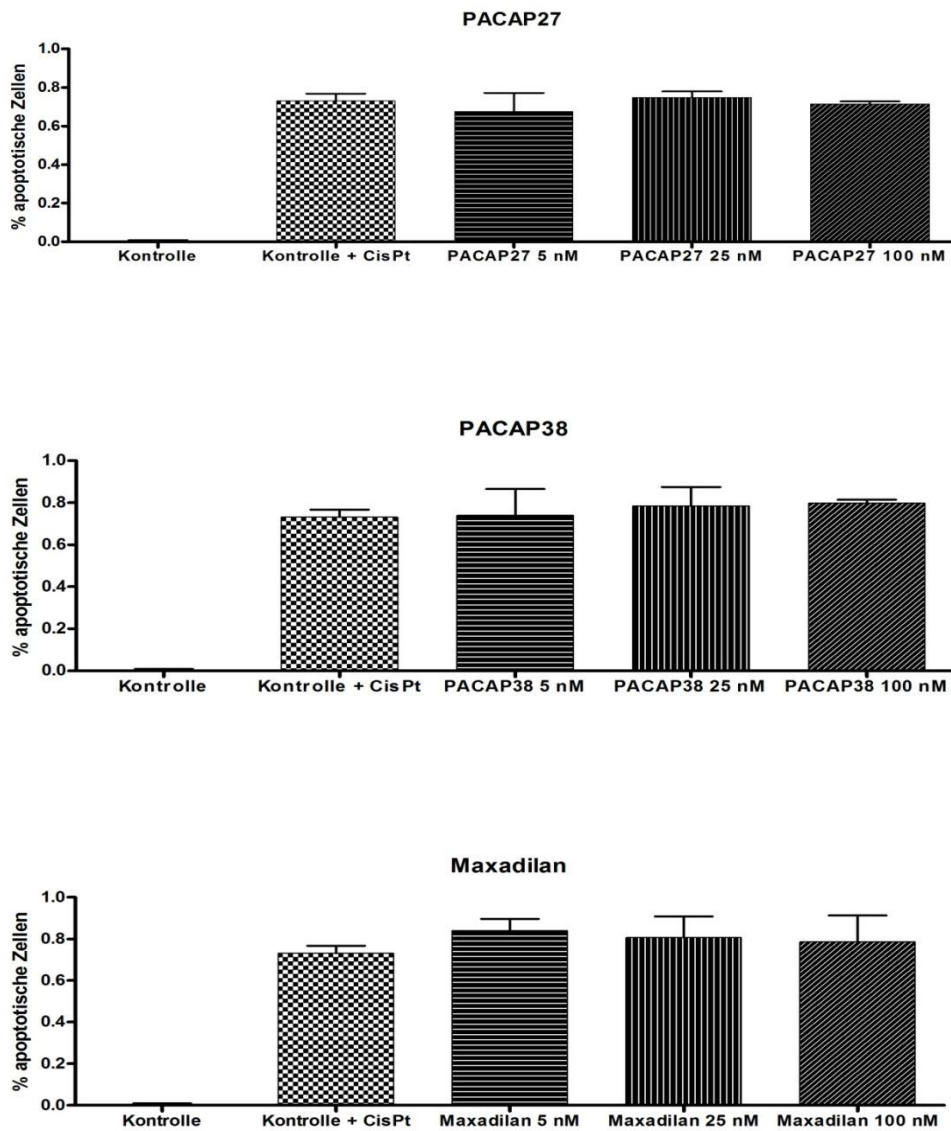


Abbildung 3.18 Einfluss der PAC1-Agonisten auf die Apoptoserate von mit 24 mg/ml CisPt behandelten Zellen der Zelllinie NCI-H82. Die drei bekannten Agonisten des PACAP-Systems PACAP27, PACAP38 und Maxadilan wurden in den Konzentrationen 5 nM, 25 nM und 100 nM eingesetzt. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersucht die Genexpression des PACAP-Systems, das heißt der Rezeptoren PAC1, VPAC1 und VPAC2 und ihrer endogenen Liganden PACAP und VIP, im kleinzelligen Bronchialkarzinom des Menschen *in vitro* und *in vivo* und in LLC1-Zellen, dem experimentellen Modell in der Maus.

Ein experimenteller Schwerpunkt war, den PAC1-Rezeptor und seine Rolle bei der Proliferation von Bronchialkarzinomzellen molekular und funktionell zu charakterisieren. Die Untersuchungen zur Genexpression waren mangels Verfügbarkeit spezifischer Antikörper auf die Analyse der PAC1 mRNA-Expression fokussiert (siehe S. 102).

Folgende neue Befunde wurden erzielt:

i.) Es gelang erstmals, die RNA-Expressionsprofile der PACAP-Rezeptoren PAC1, VPAC1 und VPAC2 im kleinzelligen Bronchialkarzinom *in vitro* und *in vivo* zu identifizieren, insbesondere in der murinen LLC1-Tumorzelllinie und ihren subkutanen und pulmonalen Transplantaten. Dabei wurde eine hohe Diversität der PAC1-Splicevarianten in allen untersuchten Karzinomen und Karzinomzelllinien festgestellt. Erstmals gelang in humanen Zelllinien kleinzelliger Bronchialkarzinome mit dem Nachweis eines reziproken Expressionsmusters von PAC1/PACAP eine Kategorisierung der Tumorzelllinien in zwei Gruppen. Gruppe 1 zeigte eine hohe Expression von PAC1 und eine nicht nachweisbare Expression von PACAP, Gruppe 2 wies umgekehrt eine hohe Expression von PACAP und eine niedrige Expression von PAC1 auf. Im Gegensatz zu LLC1-Zellen, in denen VPAC1 Expression nicht nachweisbar war, exprimierten alle untersuchten humanen Bronchialkarzinomzelllinien neben PAC1- auch VPAC1-Rezeptoren.

ii.) Mithilfe der FRET-Messung konnte das Vorhandensein funktioneller PAC1-Rezeptoren auf LLC1-Zellen nachgewiesen werden. Bereits durch subnanomolare Konzentrationen von PACAP38 ($EC_{50}=60$ pM) findet eine Aktivierung des PAC1-Rezeptors statt, die eine intrazelluläre Synthese von cAMP und eine Freisetzung von Ca^{2+} induziert. Also ist der PAC1-Rezeptor von LLC1-Zellen hochaffin.

iii.) Im Gegensatz zu neuroendokrinen Zellen wie z.B. PC12-Zellen, wird in LLC1-Zellen anscheinend eine Rückkopplungshemmung der PAC1-Expression durch PAC1-Agonisten induziert.

iv.) Die PAC1-Rezeptoraktivierung führt in LLC1-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Proliferationsrate. Auch in der humanen NCI-H82-Zelllinie resultiert eine PAC1-Rezeptoraktivierung in einer Änderung der Proliferationsrate, wenn auch nur marginal. Allerdings haben PAC1-Agonisten anscheinend keinen messbaren Einfluss auf die durch CisPt induzierte Apoptoserate.

v.) Sowohl für LLC1-Zellen als auch für pulmonale LLC1-Transplantate wurden erstmals eine simultane mRNA Expression des PAC1-Rezeptors und seiner Zielgene Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 nachgewiesen. Die Transkription dieser Zielgene scheint aber nicht von einer PAC1-Aktivierung abhängig zu sein. Humane kleinzellige Bronchialkarzinome und Bronchialkarzinomzelllinien weisen sehr heterogene Expressionsmuster von PAC1, Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 auf. Die Transkription von Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 korreliert nicht mit der PAC1 Expression.

Im Folgenden werden diese Ergebnisse im Detail diskutiert.

4.1 Bedeutung funktioneller Expression von PAC1 im kleinzelligen Bronchialkarzinom

4.1.1 Expression von PAC1 und VPAC2 in LLC1-Zellen

Zur Genexpression von PACAP-Rezeptoren (PAC1, VPAC1 und VPAC2) und spezifischen PAC1-Splicevarianten in LLC1-Zellen liegen bisher keine publizierten Ergebnisse Anderer vor. In dieser Arbeit wurde für die LLC1-Zelllinie der Nachweis einer prominenten PAC1-Expression mit fehlender Expression von VPAC1 erbracht. Spuren von VPAC2 mRNA wurden nachgewiesen und deuten auf die Anwesenheit des VPAC2-Rezeptors hin. Weder im peripheren Lungenparenchym ohne Tumortransplantat noch im

Diskussion

LLC1-Tumortransplantat ist die Genexpression von VIP oder PACAP nachweisbar. Angesichts einer sehr niedrigen mRNA-Expression von PAC1 und moderaten Expression von VPAC1 und VPAC2 im peripheren Lungenparenchym ohne Tumortransplantat ist zu schließen, dass die hohe PAC1-Expression im tumorösen Lungenparenchym hauptsächlich von den transplantierten LLC1-Zellen stammt. Die im Lungenparenchym mit LLC1-Tumorlast gemessene Expression von VPAC1 ist daher dem ortsständigen Wirtsgewebe zuzuschreiben. Unklar ist, welche ortsständigen Zelltypen in der Lunge PAC1, VPAC1 und/oder VPAC2 exprimieren. In Frage kommen u. a. Epithelzellen, Mastzellen, Endothelzellen, intrinsische Neurone sowie Zellen des Immunsystems (Lam et al. 1990; Lindén et al. 1999; Liu et al. 1999; Chedeville et al. 1993; Schmidt-Choudhury et al. 1999; Gottschall et al. 1991). Dies sollte Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein.

In der gesunden Mauslunge konnten nur die Splicevarianten null und hop_1 detektiert werden. Deren mRNA-Expressionsniveau war allerdings niedrig. In LLC1-Zellen und in LLC1-Lungenmetastasen nach i. v. Applikation über die Schwanzvene von LLC1-Zellen hingegen konnten zusätzlich die PAC1-Splicevarianten hip und s sowie möglicherweise $hiphop_1$ nachgewiesen werden. Über eine damit verbundene funktionelle Bedeutung kann zum jetzigen Zeitpunkt nur spekuliert werden. Damit sieht es so aus, als wären im LLC1-Tumortransplantat mindestens zwei weitere Splicevarianten vorhanden als bisher bekannt, namentlich hip und $hiphop_1$; diese konnten bisher nicht in einer cDNA-Bibliothek der Spezies *Mus musculus* nachgewiesen werden (Blechman and Levkowitz 2013). Damit scheinen LLC1-Tumore mehr PAC1-Splicevarianten zu exprimieren als das normale Lungengewebe.

Durch eine Interaktion der LLC1-Tumortransplantate mit den ortsständigen Wirtsgeweben scheint ein leichter Shift des PAC1-Splicevariantenprofils auf mRNA-Niveau induziert zu werden. Im NGF transgenen Tier ohne Tumorlast werden die PACAP-Rezeptoren schwächer exprimiert und auch die LLC1-Transplantate scheinen keine vergleichbar starke Änderung in der Expression von PAC1-Rezeptor-mRNA hervorzurufen, wie im Wildtyp. Dies ist vermutlich hauptsächlich darauf zurückführbar, dass im NGF-transgenen Tier die Tumorlast erheblich niedriger ist (**vgl. Abb. 3.3**). Alle genannten PAC1-Rezeptor-Splicevarianten werden in der LLC1-Zelllinie sowie in den LLC1-

Tumormodellen von Wildtyptieren auf einem deutlich höheren mRNA-Niveau exprimiert.

Das Expressionsmuster der PAC1-Splicevarianten in den LLC1-Tumortransplantaten ist identisch mit dem Expressionsmuster der LLC1-Zellen *in vitro*. Es scheint also nicht durch die Tumor-Wirt-Interaktion beeinflusst zu werden. Zwischen dem Splicevariantenprofil des PAC1-Rezeptors und der Aggressivität des Tumors, bzw. seiner Vulnerabilität für bestimmte Chemotherapeutika, ist keine Korrelation erkennbar bzw. publiziert worden.

Ein Nachweis des PAC1-Rezeptors auf Protein-Niveau konnte jedoch nicht vorgenommen werden, da bis zum Ende der Experimentalphase dieser Arbeit kein Antikörper die geforderte Spezifität und Sensitivität zeigt, um in einem semiquantitativen Western Blot verwendet zu werden. Sämtliche im Labor verfügbaren kommerziell erhältlichen PAC1-Rezeptorantikörper erwiesen sich in PAC1-Knock-out-Mäusen, dem Goldstandard zur Bestimmung der Spezifität von Antikörper, als unspezifisch (Kalmbach und Weihe, unveröffentlicht). Deshalb wurde die Lokalisierung von PAC1- sowie von VPAC1- und VPAC2-Rezeptoren mittels radioaktiver *In-situ*-Hybridisierung auf Genexpressionsebene vorgenommen.

In-situ-Hybridisierung von Gewebeschnitten subkutaner LLC1-Transplantate und *i. v.* transplantiert LLC1-Tumoren im Lungenparenchym zeigen ähnliche Expressionsmuster der PAC1-Rezeptoren.

4.1.2 Evidenz für ein reziprokes Expressionsprofil des PAC1-Rezeptors und seines Liganden PACAP in humanen Zelllinien des kleinzelligen Bronchialkarzinoms

Erstmalig gelang eine Kategorisierung von kleinzelligen Bronchialkarzinom-Zelllinien in zwei Gruppen aufgrund des Expressionsverhältnisses von PAC1/PACAP. In den Zelllinien ohne detektierbare PACAP-mRNA-Expression H60, H82, H187 und H 209 (**Gruppe 1**) werden die PAC1-Rezeptor-mRNA und die nachgewiesenen Splicevarianten auf deutlich höherem Niveau exprimiert. In den Zelllinien H69, H146 und H345 (**Gruppe 2**) wird PACAP exprimiert in denselben Zelllinien scheint die Expression der PAC1-Rezeptoren auf mRNA-Ebene erniedrigt zu sein; dies ist möglicherweise durch einen autokrinen Mechanismus induziert worden. Das könnte auf eine Rückkopplungshemmung des Rezeptors hindeuten. Die Expressionsdaten beruhen auf qualitativer RT-PCR und sollten mit QPCR bestätigt werden (**Tabelle 4.1**)

Tabelle 4.1 Abundanz von PACAP gegenüber dem PAC1-Rezeptor und den PAC1-Splicevarianten (- nicht nachgewiesen; + Nachweis erbracht; Anzahl der + spiegelt Abundanz wider: + Signal, ++ starkes Signal, +++ sehr starkes Signal)

	PACAP	PAC1	Gruppe
H60	-	+++	1
H82	-	+++	1
H187	-	+++	1
H209	-	+	1
H69	++	+	2
H146	+++	+/-	2
H345	+++	++	2

Während VPAC1 in jeder Zelllinie in unterschiedlicher Abundanz detektiert werden konnte, wurde VPAC2 in keiner der analysierten Zelllinien auf Genexpressionsebene nachgewiesen (**vgl. Abb. 3.13 bis 3.15**). In den murinen LLC1-Zellen konnte dagegen VPAC2 in Spuren, aber keine VPAC1-Transkripte detektiert werden (**vgl. Abb. 3.1**). Um die aktuellen Daten zu überprüfen, sollte auch hier ein qPCR-Nachweis vorgenommen werden. Zusätzlich sollten die hier getesteten Zelllinien mit 5, 25 und 100 nM PACAP27, PACAP38 und Maxadilan stimuliert werden, um so zu testen, ob es zu einer Regulation von PAC1-Rezeptor-mRNA kommt; durch Blockierung des PAC1-Rezeptors mit PACAP6-27 bzw. PACAP6-38, die beide kompetitive Hemmer zu den entsprechenden

nicht trunktierten Peptiden sind, sollte überprüft werden, ob der Effekt in Bezug auf die PAC1-Rezeptor-mRNA aufgehoben werden kann (**siehe Abb. 4.1**).

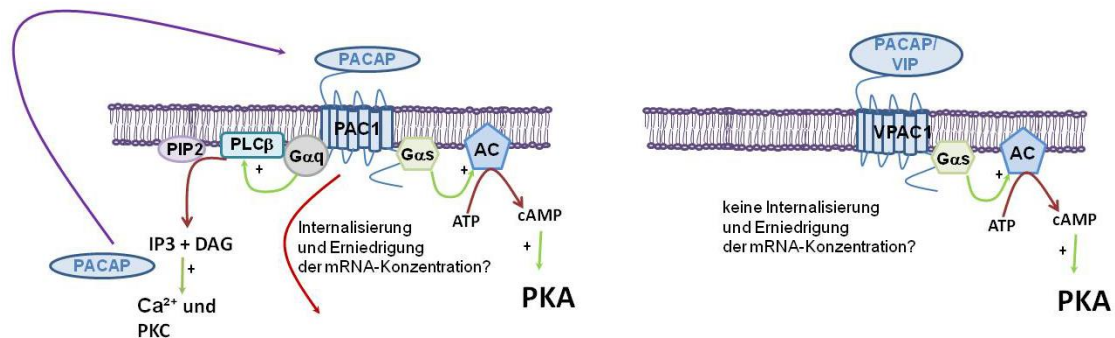


Abbildung 4.1 Schema eines möglichen Mechanismus zur Regulation des PAC1-Rezeptors im Vergleich zu dem VPAC1-Rezeptor in humanen kleinzelligen Bronchialkarzinomen. AC: Adenylatzyklase; PKA: Proteinkinase A; PLC: Phospholipase C; PKC: Proteinkinase C; IP3: Inositol-1,4,5-trisphosphat; GTP: Guanosintri-phosphat; ATP: Adenosintri-phosphat; cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat

Offensichtlich gibt es einen Speziesunterschied zwischen Maus und Mensch, insofern als in den humanen Zelllinien immer PAC1 und VPAC1 und in der murinen LLC1-Zelllinie lediglich PAC1 exprimiert wird. Die LLC1-Zelllinie kann deshalb nur mit Einschränkung als Modell für die Rolle des PACAP-Systems im humanen kleinzelligen Bronchialkarzinom gelten.

PAC1 ist in seiner Abundanz heterogen, aber bisher in jedem in dieser Arbeit untersuchten kleinzelligen Bronchialkarzinom und jeder kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinie, sei sie murin oder human detektiert worden.

Mit qualitativer PCR Analyse wurden in Biopsien humaner kleinzelliger Bronchialkarzinome alle Transkripte des VIP-/PACAP-Systems und der Zielgene Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 nachgewiesen (**siehe 4.5.1**). Einzig VIP konnte in keinem der analysierten Tumore detektiert werden. Alle bekannten Splicevarianten des humanen PAC1-Rezeptors konnten ebenfalls in jedem der vorliegenden Tumore auf mRNA-Niveau bestimmt werden. Theoretisch könnte allerdings VIP über die Blutbahn in den Tumor transportiert werden und ebenfalls die Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms beeinflussen. Eine Aussage über den exakten zellulären Ursprung der im Tumor nachgewiesenen Transkripte ist wegen der zellulären Heterogenität des Tumors und der Tumormikroumgebung noch nicht möglich. Hierzu werden zellspezifische Analysen nach Mikrodissektion notwendig sein (**vgl. Abb. 3.15 und 3.16**) (Busto et al. 1999; Delgado und Ganea; Lindén et al. 1997).

4.2 Evidenz für eine PAC1 Aktivierung in LLC1-Zellen

Zur Untersuchung von intrazellulären cAMP-Konzentrationsänderungen in lebenden Zellen wurde 2004 ein FRET-basierter-Sensor auf Protein-Niveau, EPAC1-camps, entwickelt (Nikolaev et al. 2004). LLC1-Zellen konnten mit einem EPAC1-camps enthaltenden Plasmid mit nur geringer Effizienz (ca. 2 %) transfiziert werden. Da für eine erfolgreiche FRET-Messung jedoch nur eine einzelne Zelle notwendig ist, war die geringe Transfektionseffizienz unproblematisch. Eine Dosiswirkungskurve ermöglichte die Bestimmung der EC_{50} bei ca. 60 pM des eingesetzten Liganden PACAP38. Die von T. Moody erstmals 1993 ermittelte IC_{50} wurde mit den oben genannten humanen Zelllinien ermittelt, dieser Wert liegt aber um einen Faktor 100–1000 höher als der hier ermittelte Wert. In der Literatur wurde bisher eine EC_{50} von ca. 0,1–1 nM für PACAP38 am PAC1-Rezeptor angegeben (Spengler et al. 1993; Moro und Lerner 1997; Arimura, 1998).

LLC1-Zellen exprimieren zusätzlich funktionelle VPAC2-Rezeptoren. VPAC2-Rezeptor-mRNA wurde in Spuren nachgewiesen. Die Expression funktioneller VPAC2-Rezeptoren konnte durch FRET-Experimente mit VIP-Konzentrationen zwischen 50 pM und 5nM bestätigt. Sowohl VIP als auch PACAP38 haben an dem VPAC2-Rezeptor die gleiche Bindungsaffinität (Lutz et al. 1993; Inagaki et al. 1994). Das heisst es ist davon auszugehen, dass 500 pM PACAP38 wie 500 pM VIP an VPAC2-Rezeptoren binden und auf diese Weise eine cAMP-Synthese gleicher Stärke induzieren, die sich wie mit VIP gemessen auf ca. 13% des mit PACAP38 gemessenen Signals beläuft. Das heisst im Umkehrschluss, dass 87% der über den FRET-Effekt nachgewiesenen cAMP-Synthese durch 500 pM PACAP38 an den PAC1-Rezeptoren induziert werden. Da bei 50 pM VIP gar keine cAMP-Syntese nachgewiesen werden konnte, einer Konzentration, die unter Verwendung von PACAP38 bereits ca. 40% der maximal messbaren cAMP-Synthese induziert, ist der durch die VPAC2-Rezeptoren entstehende Fehler unwesentlich. Die hier erwähnten Daten stammen aus einer persönlichen Kommunikation mit Dr. Krasel (Pharmakologie Philipps-Universität Marburg AG Bünemann).

Die durch PACAP38 induzierte cAMP-Synthese erwies sich als nicht durch Auswaschen des Liganden rückgängig machbar, d. h., der Ligand scheint

irreversibel an den Rezeptor zu binden. In der Literatur ist ein solcher persistierender Effekt im zentralen Nervensystem bereits beschrieben, im kleinzelligen Bronchialkarzinom hingegen noch nicht.

Es gibt Evidenzen dafür, dass aktivierte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren über „Clathrin-coated vesicles“ internalisiert werden, während die G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren weiterhin aktiviert bleiben (Ponsioen et al. 2009; Calebiro et al. 2009).

Bisher konnte eine solche persistierende Aktivierung für mehrere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren gezeigt werden, z. B. für den β_2 -adrenergen Rezeptor und den TSH-Rezeptor (Hynes et al. 2004; Calebiro et al. 2010). Für PAC1 konnten Rezeptorinternalisierung und ein persistierender Effekt durch endosomale Aktivierung der Adenylatzyklase im zentralen Nervensystem und in Ganglien des vegetativen efferenten viszeralen Nervensystems nachgewiesen werden (May et al. 2010; Merriam et al. 2013). Zusätzlich wurde im zentralen Nervensystem und im Hoden von Ratten ein System von PACAP-Rezeptoren, die an nukleären Membranen sitzen, vorgeschlagen. Über dieses soll eine Ausschüttung von zellinternem Ca^{2+} aktiviert werden. Demnach soll es zwei Systeme der Aufnahme von PACAP38 und -27 geben, einerseits über „Clathrin-coated vesicles“ und andererseits über Makropinozytose (Doan et al. 2012).

Zwar wurde der Nachweis funktioneller PAC1-Rezeptoren nur im Mausmodell erbracht, aber man kann davon ausgehen, dass auch die PAC1-Rezeptoren in humanen kleinzelligen Bronchialkarzinom Zellen funktionell aktiv sind.

Um die Verknüpfung der nativen PAC1-Signalkaskade zu überprüfen, wurde ein PKA-Sensor (AKAR2) verwendet. Wenn das Sensorprotein AKAR2 durch die PKA an einer PKA-Konsensussequenz phosphoryliert wird, bindet eine „Forkhead“-assoziierte Domäne intramolekular an die phosphorylierte Konsensussequenz und bringt so die Fluorophore in eine räumliche Nähe, die einen FRET-Effekt ermöglicht (Zhang et al. 2001). Eigene Pilotversuche zeigten, dass die PKA aktiviert wird. Da die Fluorophore aber sehr schnell ausbleichen und die Veränderung des Quotienten des durch die Fluorophore emittierten Lichts der Wellenlänge 535 zu 480 im Vergleich zu den Messungen mit EPAC1-camps niedrig war, konnte keine Dosiswirkungskurve erstellt werden (Daten nicht gezeigt).

Diskussion

Da die meisten PAC1-Splicevarianten zusätzlich zu einer Aktivierung der Adenylzyklase auch eine PLC aktivieren, werden die sekundären Botenstoffe IP_3 , DAG und Ca^{2+} in der PAC1-Signalkaskade freigesetzt. Eine intrazelluläre Ausschüttung von Ca^{2+} kann mit dem Ca^{2+} -Sensor Fluo-4 nachgewiesen werden, allerdings ohne genaue Lokalisierung der ausschüttenden Organelle (Gee et al. 2000). Auf diese Weise konnte mittels Videobeobachtung eine deutliche Ca^{2+} -Oszillation von mit PACAP38 stimulierten LLC1-Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Um die subzelluläre Lokalisation der Ausschüttung des Ca^{2+} einer Organelle zuweisen zu können, wurden die Ca^{2+} -Sensoren CameleonD1ER und CameleonMt verwendet. Ersterer ist zum Nachweis von Kalziumionen aus dem endoplasmatischen Retikulum konzipiert worden und Letzterer zum Nachweis einer Ausschüttung aus den Mitochondrien (Palmer et al. 2004; Palmer et al. 2006). Diese Sensoren scheinen aber nicht sensitiv genug zu sein, denn die eigenen Pilotmessungen führten zu keinem Erkenntnisgewinn. Mit Fluo-4 konnte nach erfolgtem Nachweis der Ca^{2+} -Aktivierung aufgrund von Engpässen am Konfokalmikroskop der kooperierenden Arbeitsgruppe nicht weitergearbeitet werden.

Die hier gezeigten Ergebnisse zur Rezeptoraktivierung in der Maus gehen mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen konform. Diese zeigen, dass die PAC1-Splicevarianten null und hop_1 , die auch in LLC1-Zellen exprimiert werden, $G\alpha_s$ - und $G\alpha_q$ -Proteine und somit die PKA aktivieren, aber auch Ca^{2+} mittels IP_3 aus intrazellulären Speichern freisetzen (Spengler et al. 1993; Pisegna et al. 1996; Zhou et al. 2000; Lutz et al. 2006; Holighaus et al. 2011).

Um die hier diskutierten Experimente vollständig abzurunden, wären noch weitere Experimente mit EPAC1camps und den Liganden PACAP27 und Maxadilan sowie den Antagonisten PACAP6-38 bzw. PACAP6-27 notwendig sowie entsprechende weitere Experimente mit Fluo4 erforderlich sind, um eine EC_{50} für die Kalziumausschüttung kalkulieren zu können.

4.3 Evidenz für eine transkriptionelle Rückkopplungshemmung von PAC1 durch selektive und nonselektive PAC1-Agonisten?

Die Resultate der QPCR-Untersuchungen scheinen für PAC1 auf einen Rückkopplungshemmungsmechanismus hinzudeuten. Die mRNA von PAC1 war in LLC1-Zellen nach einer sechsstündigen Stimulation mit den PAC1-Liganden PACAP27, PACAP38 und Maxadilan auf ca. 50 % des mRNA-Niveaus von unbehandelten Zellen erniedrigt (**vgl. Abb. 3.9**). Die Ergebnisse aus der qualitativen PCR der untersuchten humanen Zelllinien scheinen ebenfalls auf einen Rückkopplungsmechanismus hinzudeuten (**siehe 4.1.2**). Im Gegensatz zu den eigenen Befunden zeigten andere Arbeiten eine Hochregulation der PAC1-mRNA in PC12-Zellen (persönl. Mitteilung L. Eiden, NIMH).

Der Abgleich mit Publikationen zeigt, dass nur eine kleine Anzahl internalisierter G-Protein-gekoppelter Rezeptoren über Lysosomen abgebaut wird, die weitaus meisten werden einem „Re-cycling“ unterzogen und in die Zellmembran reintegriert (Benke et al. 2012; Cottrell 2013). Eine Aktivierung der PAC1-Rezeptoren könnte möglicherweise die Transkription der PAC1-mRNA negativ beeinflussen. Dass eine Regulation von G-Protein gekoppelten Rezeptoren auch auf Transkriptionsebene stattfindet, ist seit 1988 zumindest für β -adrenerge Rezeptoren bekannt (Hadcock und Malbon 1988). Insgesamt sind die erzielten Ergebnisse als hinreichende Evidenz für eine transkriptionelle Rückkopplungshemmung von PAC1 durch selektive und nonselektive PAC1-Agonisten zu werten.

4.4 PAC1 Abhängigkeit der Proliferationsrate von LLC1-Zellen

Die PAC1-Liganden (PACAP27, PACAP38 und Maxadilan) bewirken eine statistisch signifikante Verlangsamung der Proliferation der Zellen (**vgl. Abb. 3.8**).

Die Quantifizierung der Zellen wurde aber mit zunehmender Zelldichte schwieriger, da dann die einzelnen Zellen schwerer zu erkennen waren. Im Vergleich mit dem Proliferationsassay der humanen Zelllinie NCI-H82 (**vgl.**

Diskussion

Abb. 3.17) ist die Verringerung der Proliferationsrate der LLC1-Zelllinie deutlich zu erkennen und wirft daher die Frage nach speziesabhängiger Beeinflussung der Proliferationsrate durch PAC1 Agonisten auf.

Die Proliferationskurve der H82-Zellen zeigte allenfalls eine geringe Hemmung durch die PAC1-Liganden; häufig liegt aber zwischen den einzelnen Messpunkten keine statistische Signifikanz vor. Eine dosisabhängige Wirkung ist nicht erkennbar (**vgl. Abb. 3.17**). Die mit H82-Zellen erzielten Ergebnisse sind aus unterschiedlichen Gründen nicht im gleichen Maß aussagekräftig wie die mit LLC1-Zellen generierten Ergebnisse. Um eine sigmoidale Proliferationskurve mit H82-Zellen zu erhalten, musste eine sehr kleine Startpopulation verwendet werden, da die Messung ansonsten direkt in der exponentiellen Phase der Proliferation begonnen hätte. Als Problem stellte sich auch heraus, dass die H82-Zellen in Clustern wachsen und nicht vollständig vereinzelt werden konnten. Zusätzlich konnte das Medium über den Zeitraum des Experiments nicht gewechselt werden, weil die einzelnen Wells alle hätten abzentrifugiert werden müssen, dadurch wäre aber ein nicht kalkulierbarer Einfluss, durch beispielsweise abkühlen und nicht konditioniertes Medium, auf die Proliferation der Zellen genommen worden. Diese erschwerenden Umstände könnten Ursache dafür sein, dass die resultierenden Proliferationskurven nicht so eindeutig verlaufen wie für die LLC1-Zellen. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass nur eine marginale Hemmung in H82-Zellen beobachtet werden kann, die aber zumindest in einigen Punkten statistisch signifikant ist. Möglicherweise ist die Proliferationshemmung tatsächlich stärker, was aber durch die Streubreite der Messergebnisse maskiert wird.

4.4.1 Fehlender Einfluss von PAC1-Agonisten auf die Apoptoserate von NCI-H82-Zellen

In früheren Arbeiten wurde für unterschiedliche Gewebe gezeigt, dass PACAP Einfluss auf apoptotische Prozesse hat. Antiapoptotische Effekte konnten insbesondere bei Protektion gegen oxidativen Stress, Herzinfarkt, Schlaganfall und Ethanol-Zelltoxizität nachgewiesen werden (Mester et al. 2011, Seaborn et al. 2011; Deguil et al. 2007). In dem in der vorliegenden Arbeit durchgeführten

Experiment konnte jedoch kein statistisch signifikanter Einfluss des PACAP-Systems auf eine durch CisPt induzierte Apoptose detektiert werden. Es ist allerdings noch nicht auszuschließen, dass doch ein marginaler Effekt auf die Apoptoserate vorhanden ist, ein deutlicher Effekt ist jedoch klar ausschließbar.

4.5 PACAP-abhängige Regulation von Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 auf Transkriptionsebene

In den LLC1-Tumortransplantaten im Lungenparenchym wurde zusätzlich die Expression der PAC1-Zielgene Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 untersucht. Dabei zeigte sich, dass Stathmin 1 das höhere Expressionsniveau aufweist. Die hohe Expressionsrate von Stathmin 1, welches während der Mitose beim Abbau der Spindeln des Spindelapparats eine Rolle spielt (Niethammer et al. 2004), reflektiert möglicherweise eine starke Proliferation. Stanniocalcin 1 ist auf einem etwas niedrigeren Niveau als PAC1 exprimiert. Da die RNA-Expression von PAC1, Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 in den Gewebeschnitten des Lungenparenchyms in den tumorösen Arealen überlappt und wahrscheinlich koexistiert, bietet es sich an, RNA Sonden gegen diese drei Moleküle kombinatorisch zur Identifikation von Metastasen- und Tumorgewebe kleinzelliger Bronchialkarzinome zu verwenden.

Da bereits bekannt ist, dass Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 Zielgene der PAC1-Signaltransduktion in anderen Zelllinien sind, wurde ein QPCR-Assay für diese durchgeführt. Dabei ergab sich, dass PACAP38 nach einer sechsstündigen Stimulation in LLC1-Zellen keine Veränderung der Transkriptionseigenschaften der Stathmin 1 mRNA induziert (**vgl. Abb. 3.10**). In der Literatur wurde allerdings gezeigt, dass die Aktivierung von PAC1 eine starke Phosphorylierung von Stathmin 1 in PC12-Zellen induziert (Zeitraum 5 Min.–9 h nach Stimulationsbeginn) sowie eine konzentrationsabhängige negative Regulation der Stathmin 1-mRNA nach 24-stündiger Stimulation mit PACAP38 (PC12-Zellen) zur Folge hat (Dejda et al. 2010; Yamada et al. 2010). Eine Analyse der Expressionskinetik mit einer Maximalstimulationsdauer von 24 Stunden sowie ein Western Blot zur Analyse möglicher posttranslationaler Modifikationen in Reaktion auf eine PAC1-Rezeptor-Stimulation sind noch

Diskussion

erforderlich, um genauer zu klären, in welcher Weise in kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen Stathmin 1 durch die PAC1-Signalkaskade reguliert wird.

Die für Stanniocalcin 1 generierten Daten zeichnen ein inkonsistentes Bild zur Regulation der Transkription von Stanniocalcin 1. Einzig 5 nM PACAP38 scheint die mRNA Expression von Stanniocalcin 1 statistisch signifikant zu beeinflussen; warum allerdings nur PACAP38 mit einer 5-nM-Konzentration diesen Effekt auslösen sollte, konnte nicht ermittelt werden. Die höheren Konzentrationen von PACAP38 sowie alle Ansätze der Liganden PACAP27 und Maxadilan scheinen unter den gegebenen Versuchsbedingungen keinen Einfluss auf die Transkription von Stanniocalcin 1 zu haben (**vgl. Abb. 5.11**). In NG108-15-Zellen und kortikalen Neuronen der Ratte wird die mRNA von Stanniocalcin 1 nach dreistündiger und sechsstündiger Stimulation stärker exprimiert (Holighaus et al. 2011; Holighaus et al. 2012), in LLC1-Zellen ist nach einer sechsstündigen Stimulation keine transkriptionelle Regulation der mRNA von Stanniocalcin 1 nachweisbar. Da PAC1 induzierte Änderungen der Stanniocalcin 1 mRNA-Synthese in Karzinomen allgemein und im kleinzelligen Bronchialkarzinom speziell bis heute gar nicht untersucht wurden, sind weitere Experimente notwendig, um die Belastbarkeit der Datenlage zu optimieren.

4.5.1 Die PAC1 Zielgene in humanen Zelllinien und Biopsien des kleinzelligen Bronchialkarzinoms

Da die PAC1-Zielgene Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 in LLC1-Zellen nicht transkriptionell reguliert werden, ist es möglich, dass Stathmin 1 wie bereits publiziert posttranslational modifiziert wird. Alternativ kann es auch sein, dass diese beiden Proteine in LLC1-Zellen nicht durch PACAP reguliert werden.

Alle getesteten Zelllinien exprimieren PAC1. Die Expression der putativen PAC1 Zielgene Stathmin 1 und Stanniocalcin 1 ist in den untersuchten humanen Bronchialkarzinom-Zelllinien hingegen heterogen.

Stathmin 1 und Stanniocalcin 1 wurden bisher in kleinzelligen Bronchialkarzinomen noch nicht untersucht. In nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen sind beide Proteine dagegen schon nachgewiesen worden. Ihre Funktion wird in unterschiedlichen Karzinomen beispielsweise mit

verstärkter Metastasierung (Stathmin 1) bzw. antiapoptotischer Wirkung (Stanniocalcin 1) in Verbindung gebracht (Singer et al. 2009; Williams et al. 2012; Block et al. 2009).

4.6 Ausblick: Bedeutung von PAC1 als Ziel für die Tumorbildgebung und als diagnostischer und prognostischer Marker

Die LLC1-Zelllinie kann in diesem Zusammenhang präklinisch zur Entwicklung eines Mausmodells verwendet werden, um das Tumortargeting mit Maxadilan zu testen.

Maxadilan ist als selektiver PAC1-Agonist den nicht selektiven PAC1-Agonisten PACAP27 und PACAP38 vorzuziehen, weil Letztere auch an die Rezeptoren VPAC1 und VPAC2 binden. Ziel des Einsatzes von Maxadilan als Trägermolekül wäre es, das Agens in den Zielzellen zu konzentrieren und Nebenwirkungen zu minimieren.

PAC1 und seine Zielgene Stathmin 1 und Stanniocalcin 1 sind in murinen und humanen Zelllinien kleinzelliger Bronchialkarzinome in der Regel stark exprimiert; dies ist eine Voraussetzung dafür, dass diese Proteine als Bio- bzw. Tumormarker verwendet werden können. Es ist als günstig einzuschätzen, dass die PAC1-Agonisten (PACAP27, PACAP38 und Maxadilan) weder in der murinen noch in den humanen kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien proliferativ wirken und in der humanen Zelllinie nicht antiapoptotisch wirken. Das ist ein gutes Indiz zur Verwendbarkeit von Maxadilan als Trägermolekül für ein Tumorimaging oder einen Drug-targeting Mechanismus.

Sowohl die Rezeptorinternalisierung als auch die Makropinozytose könnten Mechanismen sein, die eine solche Instrumentalisierung möglich machen, angesichts bereits existierender molekularer Ansätze, in denen Peptide eingesetzt werden, um Chemotherapeutika in Karzinomzellen zu transportieren (EGF, Somatostatin) (Theodoropoulou and Stalla 2013) (Foy et al. 2013) (Han et al. 2013). Denkbar ist beispielsweise eine Kopplung eines Chemotherapeutikums an Maxadilan über eine pH-empfindliche kovalente Bindung einer funktionellen Gruppe wie eine Amid-, eine Ester- oder eine Etherbindung. Wenn das beladene Maxadilan in eine Umgebung mit einem pH-

Diskussion

Wert wie dem eines wachsenden Tumors transportiert wird, steigt die Wahrscheinlichkeit einer Hydrolyse des Agens. Alternativ könnten auch zellinterne Enzyme zur Spaltung einer kovalenten Bindung instrumentalisiert werden, vorausgesetzt diese Bindung ist für entsprechende Enzyme zugänglich.

Aufgrund der Ko-Expression von PAC1-Rezeptoren und seinen beiden putativen Zielgenen Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 in der LLC1-Zelllinie sowie einigen humanen kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien bietet es sich an, durch deren kombinierten Nachweis Tumorzellen und Metastasen in Biopsien zu identifizieren. Für Stathmin 1 alleine wurde ein solcher Vorschlag bereits für viele Karzinome anderer Gewebe formuliert (Nemunaitis, 2012) (Bhagirath et al. 2012) (Tradonsky et al. 2012) (Belletti und Baldassarre 2011). Möglicherweise lässt sich über die Kombination der hier genannten Proteine zusätzliche Information über die Malignität des Tumors gewinnen. Außerdem besteht die Möglichkeit, Tumormetastasen eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms im Blut anhand von PAC1, Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 über eine PCR nachzuweisen. Für Stanniocalcin 1 und nicht kleinzellige Bronchialkarzinome wurde ein solcher Vorschlag bereits publiziert (Du et al. 2011).

Es ist zudem denkbar, dass das Verhältnis von PAC1/PACAP für diagnostische und prognostische Zwecke genutzt werden kann. Möglicherweise lassen sich auch über das Splicevariantenprofil von PAC1 ein prognostisches Biomarkerprofil aus Biopsien kleinzelliger Bronchialkarzinome Informationen über den vorliegenden Tumor gewinnen.

Insgesamt offerieren die hier erzielten Ergebnisse einen Beitrag für neue translationale Ansätze in der personalisierten Krebsmedizin.

5 Anhang

5.1 Abkürzungsverzeichnis

7-TM	7-Transmembran
°C	Grad Celsius
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	alkalische Phosphatase
as	antisense
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Kalzium-Ionen (zweifach positiv geladen)
cAMP	cyclic adenosinmonophosphat (zyklisches Adenosinmonophosphat)
cDNA	complementary DNA
CFA	complete Freund's Adjuvant
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
CMF	calcium magnesium free
COX-2	Cyclooxygenase 2
CTP	Cytosintriphosphat
d	Tag(e)
d-	Desoxy-
DAG	Diacylglycerol

Anhang	
dd	destilliert und demineralisiert
demin	demineralisiert
DePeX	Dibutyl-Phtalat-Xylol
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle´s Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	ethylene-diamine-tetraacetic acid
ER	endoplasmatisches Retikulum
Fwd	forward
FCS	fetal calf serum
FGF	fibroblast growth factor
g	Gramm
g	Gravitation / Schwerkraft
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GHRH	Growth hormone releasing Hormone
GMP	Guanosinmonophosphat
GPCR	G-Protein coupled receptor
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
h	human (als Präfix)
HBSS	Hanks balanced salt solution

HGF	hepatocyte growth factor
IL 1 β	Interleukin 1 β
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
ISH	<i>In-situ</i> -Hybridisierung
kb	kilo-Basen
KV	Kresylviolett
l	Liter
LLC1	Lewis lung carcinoma 1
M	molar
m	Meter
m	milli (10 ⁻³)
μ	mikro (10 ⁻⁶)
min	Minute
mRNA	messenger RNA
n	nano (10 ⁻⁹)
NaAc	Natriumacetat
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NCI	National cancer institute of USA
Ncl.	Nucleus
NGF	nerve growth factor
NN	Nebenniere
NO	Stickstoffmonoxid
NSCLC	Non small cell lung cancer
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte

Anhang	
OT	Objektträger
p	piko (10^{-12})
p.a.	pro analysis
PACAP	pituitary adenylate cyclase activating peptide
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PDGF	platelet-derived-growth-factor
PFA	Paraformaldehyd
PIP ₂	Phosphatidylinositol-(4, 5)-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PNS	peripheres Nervensystem
POD	Peroxidase
polyA	Poly-Adenylat-Sequenz
QPCR	quantitative polymerase chain reaction
Rev	reverse
RM	Rückenmark
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Rotationen pro Minute
RPMI	Roswell Park memorial Institute
RT	Reverse Transkription, Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse transkription-PCR
s	Sekunde

SA	Streptavidin
SCLC	small cell lung cancer
SP	Substanz P
SSC	sodium chloride, sodium citrate
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEA	Triethanolimin
TESAP	3-(Triethoxysilyl)-propylamin
TNF α	Tumornekrose Faktor α
TRP	transient receptor potential
U	Units (internationale Enzymeinheit)
U	Umdrehungen
UDP	Uracildiphosphat
UMP	Uracilmonophosphat
UTP	Uraciltriphosphat
VEGF	vascular epithelial growth factor
VIP	vasoactive intestinale peptide
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
ZNS	Zentralnervensystem

5.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1. Schema des humanen Prepropeptids von PACAP und dessen posttranslationaler Prozessierung. Art und Locus jeder Hydrolysierungs- und Amidierungsreaktion ist spezifisch. PK-1, -2 oder -4: Prohormon-Konvertase-1,-2 oder-4; PAM: peptidyl glycin α -amidating monooxygenase; SP: Signalpeptid PRP: PACAP related peptide (Schema modifiziert nach Vaudry et al., 2009).....6

Abbildung 1.2 Phylogenetische Verwandtschaft der PACAP-Rezeptoren im Zusammenhang mit den fünf GPCR-Familien (TM I–TM VII) im humanen Genom (Fredriksson et al. 2003). Die Rhodopsin-Familie ist nicht mit abgebildet. In Grün sind die drei PACAP-Rezeptoren hervorgehoben.....10

Abbildung 1.3 Intrazelluläre PAC1/VPAC1/VPAC2-Signalwege: Die Abbildung stellt die Hauptsignalwege von VPAC1 und -2 sowie von PAC1 über heterotrimere G-Proteine dar. Alle PACAP-Rezeptoren aktivieren $G_{\alpha s}$ sowie $G_{\alpha q}$, während VPAC1 und VPAC2 auch $G_{\alpha i}$ aktivieren. Die Phospholipase D (PLD) wird über PAC1 und die Proteinkinase C (PKC) aktiviert, während VPAC1 und VPAC2 die PLD zusätzlich über ARF aktivieren können PLC β : Phospholipase C β ; AC: Adenylatzyklase G αi : inhibitorisches G-Protein; G αs : cAMP-Synthese stimulierendes G-Protein; G αq : Phospholipase C stimulierendes G-Protein; PIP $_2$: Phosphoinositol-4,5-bisphosphat; IP3: Inositol-1,4,5-triphosphat; PKA: Proteinkinase A; ATP: Adenosintri-phosphat; cAMP: zyklisches Adenosin-3,5-monophosphat; PC: Phosphatidylcholin; PA: Phospholipid; ARF: (Schema nach [Dickson and Finlayson 2009].....11

Abbildung 1.4 Die wichtigsten Splicevarianten des PAC1-Rezeptors. Die Anzahl der Aminosäuren, die eine Splicevariante mehr oder weniger haben, bezieht sich auf die PAC-null-Splicevariante. Die very-short-Splicevariante beinhaltet das Stück der short-Variante. Zusätzlich zu den dargestellten Splicevarianten gibt es eine short/hop1-Splicevariante und mehrere Splicevarianten in anderen Arten wie Zebrafisch und Krallenfrosch (modifiziert nach Dickson und Finlayson 2009).13

Abbildung 1.5 Schematische Zusammenfassung der im Text beschriebenen Signalwege und Faktoren des kleinzelligen Bronchialkarzinoms, die mit der PACAP-Signaltransduktion auf molekularer Ebene kommunizieren. Referenzen siehe im Text.....22

Abbildung 3.1 Nachweis der PACAP-Rezeptorgenexpression auf mRNA-Ebene in LLC1-Zellen und sc-LLC1-Transplantaten mittels RT-PCR. Zur Verifikation wurde eine cDNA-Bibliothek eines murinen Hirns verwendet. Die Analyse erfolgte auf einem 1,2%igen Agarosegel nach einer 35-Zyklen-PCR. Zum Größenvergleich wurde eine DNA-Leiter verwendet. Größe der Amplikons siehe **Tabelle 3.1**.....64

Abbildung 3.2 Nachweis von PAC1-Splicevarianten a) null, hip, hop1/2 und b) s. Der Nachweis erfolgte mit cDNA-Bibliotheken der LLC1-Zelllinie und des sc LLC1-Transplantats. Zur Verifikation wurde die cDNA-Bibliothek eines murinen Gesamthirns verwendet. Die Analyse erfolgte auf einem 1,2%igen Agarosegel nach einer 35-Zyklen-PCR. Zum Größenvergleich wurde eine DNA-Leiter verwendet.....66

Abbildung 3.3 Nachweis des PACAP/VIP-Systems und PAC1 abhängige Zielgene von PAC1 (Stanniocalcin 1 und Stathmin 1) in jeweils einer Gesamtlungen-cDNA von C57/bl6- und C57/bl6-NGF-transgener Maus, mit und ohne i. v. applizierte LLC1-Tumoren. Die Analyse erfolgte auf einem 1,5%igen Agarosegel nach einer 35-Zyklen-PCR. Zum Größenvergleich wurde ein DNA-Leiter verwendet.....68

Abbildung 3.4 Expressionsmuster des PACAP-Systems in sc-LLC1-Tumoren mit radioaktiver in situ-Hybridisierung auf dem Röntgenfilmautoradiogramm. PAC1 zeigt eine deutliche Expression auf mRNA-Niveau. In den weiteren Gewebeschnitten beruht das Signal jedoch lediglich auf Hintergrund- und Edging-Effekten.....69

Abbildung 3.5 Expressionsmuster der Transkripte von PAC1, Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 in Lungengewebeschnitten von C57/BL6- und NGFtg-C57/BL6-Mäusen jeweils mit und ohne i. v. applizierte LLC1-Metastasen. Nachweisbar ist jeweils eine verstärkte Expression des untersuchten Transkripts in dem Tumorgewebe. Besonders deutlich zu erkennen bei Stathmin 1. Exposition der Autoradiogramme 24h.....70

Abbildung 3.6 Dosiswirkungskurve von PACAP38 auf die murine Zelllinie LLC1. Auf der Ordinate ist die Veränderung der cAMP-Konzentration in Prozent der Maximaländerung aufgetragen und auf der dekadisch logarithmisch skalierten Abszisse die Konzentration von PACAP38.....71

Abbildung 3.7 FRET-Messung nach Aktivierung von PAC1 durch PACAP38 und Isoprenalin. a) Die Fluoreszenz-Ratio sinkt nach Gabe des PACAP38 enthaltenden FRET-Puffers ab, normalisiert sich jedoch nicht mehr während der Spülung mit reinem FRET-Puffer. b) Die Ratio sinkt nach Gabe eines Isoprenalin enthaltenden Puffers schnell ab und erholt sich mit der Spülung durch reinen FRET-Puffer. Die Pfeile markieren jeweils den Pufferwechsel.....72

Abbildung 3.8 Nachweis einer Proliferationshemmung durch PAC1-Agonisten. Für das Experiment wurden je zehn technische Replikate von drei unterschiedlichen Konzentrationen (5 nM, 25 nM und 100 nM) der Liganden a) PACAP27, b) PACAP38 und c) Maxadilan verwendet sowie unbehandelte Zellen zum Vergleich der Proliferationsgeschwindigkeit. Die Ordinate gibt die Zellzahl an, während auf der Abszisse die Zeit in Tagen aufgetragen ist. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts. ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,0001$ 74

Abbildung 3.9 Säulendiagramm zum Nachweis eines Expressionsrückgangs des PAC1-Rezeptors. Als Matrizen wurden die cDNA-Bibliotheken der mit **a) PACAP27, b) PACAP38 und c) Maxadilan** behandelten LLC1-Zellen verwendet. Die Liganden wurden in den Konzentrationen 5 nM, 25 nM und 100 nM eingesetzt. Analyse auf Regulation der PAC1-Transkripte. Signifikant nach Two Way Annova und Bonferoni
 ** = $P < 0,01$; * = $P < 0,05$76

Abbildung 3.10 Säulendiagramm zur Analyse einer transkriptionellen Regulation von Stathmin 1. Als Matrize wurden die cDNA-Bibliotheken der mit **a) PACAP27, b) PACAP38 und c) Maxadilan** behandelten LLC1-Zellen verwendet. Die drei PAC1-Agonisten wurden in den Konzentrationen 5 nM, 25 nM und 100 nM eingesetzt Signifikant nach Two Way Annova und Bonferoni.....78

Abbildung 5.11 Analyse der Liganden abhängigen transkriptionellen Regulation von Stanniocalcin 1. Als Matrizen wurden die cDNA-Bibliotheken der mit **a) PACAP27, b) PACAP38 und c) Maxadilan** behandelten LLC1-Zellen verwendet. Die drei PAC1-Agonisten wurden in den Konzentrationen 5 nM, 25 nM und 100 nM eingesetzt Signifikant nach Two Way Annova und Bonferoni.
 ** = $P < 0,01$80

Abbildung 3.12 Detektion von PAC1-Rezeptoren und deren Splicevarianten und des VPAC1-Rezeptors. Zudem wurde eine Analyse auf PACAP und VIP sowie den VPAC2-Rezeptor und die putativen Zielgene Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 durchgeführt. Als Matrize dienten die cDNA-Bibliotheken der humanen kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien **a) NCI-H60 und b) NCI-H69.** Die Analyse erfolgte auf einem 1,5%igen Agarosegel. Zum Größenvergleich wurde eine DNA-Leiter verwendet. 35-Zyklen-PCR.....82

Abbildung 3.13 Detektion des PAC1-Rezeptors und seiner Splicevarianten sowie des VPAC1-Rezeptors. Zusätzlich konnten die putativen Zielgene Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 nachgewiesen werden. Als Matrize dienten die cDNA-Bibliotheken der humanen kleinzelligen Bronchialkarzinom-Zelllinien **a) NCI-H82, b) NCI-H146 und c) NCI-H187.** Die Analyse erfolgte auf einem 1,5%igen Agarosegel. Zum Größenvergleich wurde eine DNA-Leiter verwendet. Es wurde eine 35-Zyklen-PCR durchgeführt.....83

Abbildung 3.14 Nachweis der PACAP-Rezeptoren PAC1 und VPAC1 sowie der Splicevarianten von PAC1. Die putativen Zielgene Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 konnten ebenfalls detektiert werden. Als Template wurden die cDNA-Bibliotheken der humanen kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien **a) NCI-H209 und b) NCI-H345** verwendet. Die Analyse erfolgte auf einem 1,5%igen Agarosegel. Zum Größenvergleich wurde eine DNA-Leiter verwendet. Eine 35-Zyklen-PCR wurde durchgeführt.....84

Abbildung 3.15 Nachweis der Expression des PACAP-Systems und Stanniocalcin 1 und Stathmin 1 in humanen Tumorbiopsien. Als Matrize wurden cDNA-Bibliotheken der humanen kleinzelligen Bronchialkarzinome 508, 853 und 1056 verwendet. Die Analyse erfolgte auf einem 1,5%igen Agarosegel. Zum Größenvergleich wurde eine DNA-Leiter verwendet. Die PCR wurden mit 35-Zyklen durchgeführt.....86

Abbildung 3.16 Nachweis der PAC1-Splicevarianten in cDNA-Bibliotheken der humanen kleinzelligen Bronchialkarzinome 508, 853 und 1056. Die Analyse erfolgte auf einem 1,5%igen Agarosegel. Zum Größenvergleich wurde eine DNA-Leiter verwendet. 35-Zyklen-PCR87

Abbildung 3.17 PACAP abhängige Proliferation der humanen kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinie NCI-H82. Die Ordinate gibt die Zellzahl an, während auf der Abszisse die Zeit in Tagen aufgetragen ist. Für das Experiment wurden je vier technische Replikate von drei unterschiedlichen Konzentrationen (5 nM, 25 nM und 100 nM) der Liganden **a) PACAP27, b) PACAP38, c) Maxadilan** und unbehandelte Zellen zum Vergleich der Proliferationsgeschwindigkeit verwendet. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,0001$ 89

Abbildung 3.18 Einfluss der PAC1-Agonisten auf die Apoptoserate von mit 24 mg/ml CisPt behandelten Zellen der Zelllinie NCI-H82. Die drei bekannten Agonisten des PACAP-Systems PACAP27, PACAP38 und Maxadilan wurden in den Konzentrationen 5 nM, 25 nM und 100 nM eingesetzt. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts.....91

Abbildung 7.1 Schema eines möglichen Mechanismus zur Regulation des PAC1-Rezeptors im Vergleich zu dem VPAC1-Rezeptor in humanen kleinzelligen Bronchialkarzinomen. AC: Adenylatzyklase; PKA: Proteinkinase A; PLC: Phospholipase C; PKC: Proteinkinase C; IP3: Inositol-1,4,5-trisphosphat; GTP: Guanosintriphosphat; ATP: Adenosintriphosphat; cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat.....99

5.3 Literaturverzeichnis

Abad, C., C. Martinez, J. Leceta, M. G. Juarranz, M. Delgado and R. P. Gomariz (2002). "Pituitary adenylate-cyclase-activating polypeptide expression in the immune system." Neuroimmunomodulation **10**(3): 177-186.

Abu-Hamdan, M. D., Drescher, M. J., Ramakrishnan, N. A., Khan, K. M., Toma, V. S., Hatfield, J. S., et al. (2006). Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its receptor (PAC1- R) in the cochlea: evidence for specific transcript expression of PAC1- R splice variants in rat microdissected cochlear subfractions. *Neuroscience* **140**, 147–161.

Ajpru, S., McArthur, A. J., Piggins, H. D., and Sugden, D. (2002). Identification of PAC1 receptor isoform mRNAs by real-time PCR in rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **105**, 29–37.

Alexandre, D., H. Vaudry, L. Grumolato, V. Turquier, A. Fournier, S. Jegou and Y. Anouar (2002). "Novel splice variants of type I pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor in frog exhibit altered adenylate cyclase stimulation and differential relative abundance." Endocrinology **143**(7): 2680-2692.

Algire, C., M. Zakikhani, M. J. Blouin, J. H. Shuai and M. Pollak (2008). "Metformin attenuates the stimulatory effect of a high-energy diet on in vivo LLC1 carcinoma growth." Endocr Relat Cancer **15**(3): 833-839.

Alli, E., J. M. Yang, J. M. Ford and W. N. Hait (2007). "Reversal of stathmin-mediated resistance to paclitaxel and vinblastine in human breast carcinoma cells." Mol Pharmacol **71**(5): 1233-1240.

Angerer L.M. and Argerer R.C. (1981) , *Nucleic Acids Res.* : Vol 9 , 2819-2840.

Arimura, A. (1998). "Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems." Jpn J Physiol **48**(5): 301-331.

Arimura, A., A. Somogyvári-Vigh, A. Miyata, K. Mizuno, D. H. Coy and C. Kitada (1991). "Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes." Endocrinology **129**(5): 2787-2789.

Belletti, B. and G. Baldassarre (2011). "Stathmin: a protein with many tasks. New biomarker and potential target in cancer." Expert Opin Ther Targets **15**(11): 1249-1266.

Belmont, L. D. and T. J. Mitchison (1996). "Identification of a protein that interacts with tubulin dimers and increases the catastrophe rate of microtubules." Cell **84**(4): 623-631.

Benke, D., K. Zemoura and P. J. Maier (2012). "Modulation of cell surface GABA(B) receptors by desensitization, trafficking and regulated degradation." World J Biol Chem **3**(4): 61-72.

Bertram, J. S. and P. Janik (1980). "Establishment of a cloned line of Lewis Lung Carcinoma cells adapted to cell culture." Cancer Lett **11**(1): 63-73.

Bhagirath, D., N. Abrol, R. Khan, M. Sharma, A. Seth and A. Sharma (2012). "Expression of CD147, BIGH3 and Stathmin and their potential role as diagnostic marker in patients with urothelial carcinoma of the bladder." Clin Chim Acta **413**(19-20): 1641-1646.

Bikfalvi, A., S. Klein, G. Pintucci and D. B. Rifkin (1997). "Biological roles of fibroblast growth factor-2." Endocr Rev **18**(1): 26-45.

Blechman, J. and G. Levkowitz (2013). "Alternative Splicing of the Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Receptor PAC1: Mechanisms of Fine Tuning of Brain Activity." Front Endocrinol (Lausanne) **4**: 55.

Block, G. J., S. Ohkouchi, F. Fung, J. Frenkel, C. Gregory, R. Pochampally, G. DiMattia, D. E. Sullivan and D. J. Prockop (2009). "Multipotent stromal cells are activated to reduce apoptosis in part by upregulation and secretion of stanniocalcin-1." Stem Cells **27**(3): 670-681.

Bourgault, S., D. Vaudry, L. Guilhaudis, E. Raoult, A. Couvineau, M. Laburthe, I. Ségalas-Milazzo, H. Vaudry and A. Fournier (2008). "Biological and structural analysis of truncated analogs of PACAP27." J Mol Neurosci **36**(1-3): 260-269.

Braas, K. M. and V. May (1999). "Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides directly stimulate sympathetic neuron neuropeptide Y release through PAC(1) receptor isoform activation of specific intracellular signaling pathways." J Biol Chem **274**(39): 27702-27710.

Busto, R., I. Carrero, L. G. Guijarro, R. M. Solano, J. Zapatero, F. Noguerales and J. C. Prieto (1999). "Expression, pharmacological, and functional evidence for PACAP/VIP receptors in human lung." Am J Physiol **277**(1 Pt 1): L42-48.

Byrne, A. M., D. J. Bouchier-Hayes and J. H. Harmey (2005). "Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF)." J Cell Mol Med **9**(4): 777-794.

Calebiro, D., V. O. Nikolaev, M. C. Gagliani, T. de Filippis, C. Dees, C. Tacchetti, L. Persani and M. J. Lohse (2009). "Persistent cAMP-signals triggered by internalized G-protein-coupled receptors." PLoS Biol **7**(8): e1000172.

Calebiro, D., V. O. Nikolaev, L. Persani and M. J. Lohse (2010). "Signaling by internalized G-protein-coupled receptors." Trends Pharmacol Sci **31**(5): 221-228.

Campbell, R. M. and C. G. Scanes (1992). "Evolution of the growth hormone-releasing factor (GRF) family of peptides." Growth Regul **2**(4): 175-191.

Cardell, L. O., R. Uddman, A. Luts and F. Sundler (1991). "Pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) in guinea-pig lung: distribution and dilatatory effects." Regul Pept **36**(3): 379-390.

Anhang

Cauvin, A., L. Buscail, P. Gourlet, P. De Neef, D. Gossen, A. Arimura, A. Miyata, D. H. Coy, P. Robberecht and J. Christophe (1990). The novel VIP-like hypothalamic polypeptide PACAP interacts with high affinity receptors in the human neuroblastoma cell line NB-OK. Peptides. United States. **11**: 773-777.

Cauvin, A., P. Robberecht, P. De Neef, P. Gourlet, A. Vandermeers, M. C. Vandermeers-Piret and J. Christophe (1991). "Properties and distribution of receptors for pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) in rat brain and spinal cord." Regul Pept **35**(2): 161-173.

Cavallaro, S., D'Agata, V., Guardabasso, V., Travali, S., Stivala, F., and Canonico, P. L. (1995). Differentiation induces pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor expression in PC-12 cells. Mol. Pharmacol. **48**, 56–62.

Chafai, M., Basille, M., Galas, L., Rostene, W., Gressens, P., Vaudry, H., Gonzalez, B. J., et al. (2011). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide promote the genesis of calcium currents in differentiating mouse embryonic stem cells. Neuroscience **199**, 103–115.

Chang, C. H., W. Y. Chey, L. Braggins, D. H. Coy and T. M. Chang (1996). "Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates cholecystokinin secretion in STC-1 cells." Am J Physiol **271**(3 Pt 1): G516-523.

Chang, C. H., W. Y. Chey, D. H. Coy and T. M. Chang (1995). Galanin inhibits cholecystokinin secretion in STC-1 cells. Biochem Biophys Res Commun. United States. **216**: 20-25.

Chatterjee, T. K., R. V. Sharma and R. A. Fisher (1996). "Molecular cloning of a novel variant of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor that stimulates calcium influx by activation of L-type calcium channels." J Biol Chem **271**(50): 32226-32232.

Chedeville, A., L. Mirossay, E. Chastre, I. Hurbain-Kosmath, M. Lopez and C. Gespach (1993). Interaction of VIP, PACAP and related peptides in normal and leukemic human monocytes and macrophages. FEBS Lett. Netherlands. **319**: 171-176.

Cockcroft, S. and B. D. Gomperts (1985). "Role of guanine nucleotide binding protein in the activation of polyphosphoinositide phosphodiesterase." Nature **314**(6011): 534-536.

Collins, B. J., W. Kleeberger and D. W. Ball (2004). "Notch in lung development and lung cancer." Semin Cancer Biol **14**(5): 357-364.

Cottrell, G. S. (2013). "Roles of proteolysis in regulation of GPCR function." Br J Pharmacol **168**(3): 576-590.

Croce, C. M. (2008). "Oncogenes and cancer." N Engl J Med **358**(5): 502-511.

Curmi, P. A., C. Noguès, S. Lachkar, N. Carelle, M. P. Gonthier, A. Sobel, R. Lidereau and I. Bièche (2000). "Overexpression of stathmin in breast

carcinomas points out to highly proliferative tumours." Br J Cancer **82**(1): 142-150.

D'Angelo, S. P. and M. C. Pietanza (2010). "The molecular pathogenesis of small cell lung cancer." Cancer Biol Ther **10**(1): 1-10.

Daniel, P. B., T. J. Kieffer, C. A. Leech and J. F. Habener (2001). "Novel alternatively spliced exon in the extracellular ligand-binding domain of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) type 1 receptor (PAC1R) selectively increases ligand affinity and alters signal transduction coupling during spermatogenesis." J Biol Chem **276**(16): 12938-12944.

Daura-Oller, E., M. Cabre, M. A. Montero, J. L. Paternain and A. Romeu (2009). "Specific gene hypomethylation and cancer: new insights into coding region feature trends." Bioinformatics **3**(8): 340-343.

Dautzenberg, F. M., G. Mevenkamp, S. Wille and R. L. Hauger (1999). N-terminal splice variants of the type I PACAP receptor: isolation, characterization and ligand binding/selectivity determinants. J Neuroendocrinol. England. **11**: 941-949.

De Niu, P., D. P. Radman, E. M. Jaworski, H. Deol, R. Gentz, J. Su, H. S. Olsen and G. F. Wagner (2000). "Development of a human stanniocalcin radioimmunoassay: serum and tissue hormone levels and pharmacokinetics in the rat." Mol Cell Endocrinol **162**(1-2): 131-144.

Deguil, J., D. Jailloux, G. Page, B. Fauconneau, J. L. Houeto, M. Philippe, J. M. Muller and S. Pain (2007). "Neuroprotective effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in MPP⁺-induced alteration of translational control in Neuro-2a neuroblastoma cells." J Neurosci Res **85**(9): 2017-2025.

Dejda, A., P. Chan, T. Seaborn, L. Coquet, T. Jouenne, A. Fournier, H. Vaudry and D. Vaudry (2010). "Involvement of stathmin 1 in the neurotrophic effects of PACAP in PC12 cells." J Neurochem **114**(5): 1498-1510.

Delgado, M. and D. Ganea (2001). "Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit expression of Fas ligand in activated T lymphocytes by regulating c-Myc, NF-kappa B, NF-AT, and early growth factors 2/3." J Immunol **166**(2): 1028-1040.

Deutsch, P. J., V. C. Schadlow and N. Barzilai (1993). "38-Amino acid form of pituitary adenylate cyclase activating peptide induces process outgrowth in human neuroblastoma cells." J Neurosci Res **35**(3): 312-320.

Deutsch, P. J. and Y. Sun (1992). "The 38-amino acid form of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates dual signaling cascades in PC12 cells and promotes neurite outgrowth." J Biol Chem **267**(8): 5108-5113.

Dickson, L., I. Aramori, J. Sharkey and K. Finlayson (2006). "VIP and PACAP receptor pharmacology: a comparison of intracellular signaling pathways." Ann N Y Acad Sci **1070**: 239-242.

Anhang

Dickson, L. and K. Finlayson (2009). "VPAC and PAC receptors: From ligands to function." Pharmacol Ther **121**(3): 294-316.

Doan, N. D., D. Chatenet, M. Létourneau, H. Vaudry, D. Vaudry and A. Fournier (2012). "Receptor-independent cellular uptake of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide." Biochim Biophys Acta **1823**(4): 940-949.

Douziech, N., A. Lajas, Z. Coulombe, E. Calvo, J. Laine and J. Morisset (1998). Growth effects of regulatory peptides and intracellular signaling routes in human pancreatic cancer cell lines. Endocrine. United States. **9**: 171-183.

Du, Y. Z., X. H. Gu, L. Li and F. Gao (2011). "The diagnostic value of circulating stanniocalcin-1 mRNA in non-small cell lung cancer." J Surg Oncol **104**(7): 836-840.

Engelman, J. A. (2009). "Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations." Nat Rev Cancer **9**(8): 550-562.

Foy, K. C., M. J. Miller, N. Moldovan, W. E. Carson and P. P. Kaumaya (2013). "Correction to: Foy KC, Miller MJ, Moldovan N, Carson III WE, Kaumaya PTP. Combined vaccination with HER-2 peptide followed by therapy with VEGF peptide mimics exerts effective anti-tumor and anti-angiogenic effects in vitro and in vivo. Oncolmmunology 2012; 1:1048-1060." Oncoimmunology **2**(1): e23914.

Fradinger, E. A., J. A. Tello, J. E. Rivier and N. M. Sherwood (2005). "Characterization of four receptor cDNAs: PAC1, VPAC1, a novel PAC1 and a partial GHRH in zebrafish." Mol Cell Endocrinol **231**(1-2): 49-63.

Fredriksson, R., M. C. Lagerström, L. G. Lundin and H. B. Schiöth (2003). "The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints." Mol Pharmacol **63**(6): 1256-1272.

Gavet, O., S. Ozon, V. Manceau, S. Lawler, P. Curmi and A. Sobel (1998). "The stathmin phosphoprotein family: intracellular localization and effects on the microtubule network." J Cell Sci **111 (Pt 22)**: 3333-3346.

Gaytan, F., A. J. Martinez-Fuentes, F. Garcia-Navarro, H. Vaudry and E. Aguilar (1994). "Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) immunolocalization in lymphoid tissues of the rat." Cell Tissue Res **276**(2): 223-227.

Gee, K. R., K. A. Brown, W. N. Chen, J. Bishop-Stewart, D. Gray and I. Johnson (2000). "Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes." Cell Calcium **27**(2): 97-106.

Gentles, A. J. and S. Karlin (1999). "Why are human G-protein-coupled receptors predominantly intronless?" Trends Genet **15**(2): 47-49.

Germano, P. M., Le, S. V., Oh, D. S., Fan, R., Lieu, S., Siu, A., et al. (2004). Differential coupling of the PAC1 SV1 splice variant on human colonic tumors to

the activation of intracellular cAMP but not intracellular Ca²⁺ does not activate tumor proliferation. *J. Mol. Neurosci.* 22, 83–92.

Ghatei, M. A., K. Takahashi, Y. Suzuki, J. Gardiner, P. M. Jones and S. R. Bloom (1993). "Distribution, molecular characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its precursor encoding messenger RNA in human and rat tissues." *J Endocrinol* **136**(1): 159-166.

Gottschall, P. E., I. Tatsuno and A. Arimura (1991). "Hypothalamic binding sites for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: characterization and molecular identification." *FASEB J* **5**(2): 194-199.

Gottschall, P. E., I. Tatsuno, A. Miyata and A. Arimura (1990). "Characterization and distribution of binding sites for the hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide." *Endocrinology* **127**(1): 272-277.

Gourlet, P., M. C. Woussen-Colle, P. Robberecht, P. de Neef, A. Cauvin, M. C. Vandermeers-Piret, A. Vandermeers and J. Christophe (1991). "Structural requirements for the binding of the pituitary adenylate-cyclase-activating peptide to receptors and adenylate-cyclase activation in pancreatic and neuronal membranes." *Eur J Biochem* **195**(2): 535-541.

Grimaldi, M., and Cavallaro, S. (1999). Functional and molecular diversity of PACAP/VIP receptors in cortical neurons and type I astrocytes. *Eur. J. Neurosci.* 11, 2767–2772.

Grumolato, L., Louiset, E., Alexandre, D., Ait-Ali, D., Turquier, V., Fournier, A., et al. (2003). PACAP and NGF regulate common and distinct traits of the sympathoadrenal lineage: effects on electrical properties, gene markers and transcription factors in differentiating PC12 cells. *Eur. J. Neurosci.* 17, 71–82.

Hadcock, J. R. and C. C. Malbon (1988). "Down-regulation of beta-adrenergic receptors: agonist-induced reduction in receptor mRNA levels." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(14): 5021-5025.

Hall, R. A., R. T. Premont, C. W. Chow, J. T. Blitzer, J. A. Pitcher, A. Claing, R. H. Stoffel, L. S. Barak, S. Shenolikar, E. J. Weinman, S. Grinstein and R. J. Lefkowitz (1998). "The beta2-adrenergic receptor interacts with the Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor to control Na⁺/H⁺ exchange." *Nature* **392**(6676): 626-630.

Han, C. Y., L. L. Yue, L. Y. Tai, L. Zhou, X. Y. Li, G. H. Xing, X. G. Yang, M. S. Sun and W. S. Pan (2013). "A novel small peptide as an epidermal growth factor receptor targeting ligand for nanodelivery in vitro." *Int J Nanomedicine* **8**: 1541-1549.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.

Anhang

Hanash, S. M., J. R. Strahler, R. Kuick, E. H. Chu and D. Nichols (1988). "Identification of a polypeptide associated with the malignant phenotype in acute leukemia." J Biol Chem **263**(26): 12813-12815.

Hannibal, J., P. Hindersson, S. M. Knudsen, B. Georg and J. Fahrenkrug (2002). "The photopigment melanopsin is exclusively present in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-containing retinal ganglion cells of the retinohypothalamic tract." J Neurosci **22**(1): RC191.

Hauser-Kronberger, C., G. W. Hacker, K. Albegger, W. H. Muss, F. Sundler, A. Arimura and O. Dietze (1996). "Distribution of two VIP-related peptides, helospectin and pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP), in the human upper respiratory system." Regul Pept **65**(3): 203-209.

He, L. F., T. T. Wang, Q. Y. Gao, G. F. Zhao, Y. H. Huang, L. K. Yu and Y. Y. Hou (2011). "Stanniocalcin-1 promotes tumor angiogenesis through up-regulation of VEGF in gastric cancer cells." J Biomed Sci **18**: 39.

Holighaus, Y., T. Mustafa and L. E. Eiden (2011). "PAC1hop, null and hip receptors mediate differential signaling through cyclic AMP and calcium leading to splice variant-specific gene induction in neural cells." Peptides **32**(8): 1647-1655.

Holighaus, Y., E. Weihe and L. E. Eiden (2012). "STC1 induction by PACAP is mediated through cAMP and ERK1/2 but not PKA in cultured cortical neurons." J Mol Neurosci **46**(1): 75-87.

Hosoya, M., C. Kimura, K. Ogi, S. Ohkubo, Y. Miyamoto, H. Kugoh, M. Shimizu, H. Onda, M. Oshimura and A. Arimura (1992). "Structure of the human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) gene." Biochim Biophys Acta **1129**(2): 199-206.

Hoyle, C. H. (1998). "Neuropeptide families: evolutionary perspectives." Regul Pept **73**(1): 1-33.

Hynes, T. R., S. M. Mervine, E. A. Yost, J. L. Sabo and C. H. Berlot (2004). "Live cell imaging of Gs and the beta2-adrenergic receptor demonstrates that both alphas and beta1gamma7 internalize upon stimulation and exhibit similar trafficking patterns that differ from that of the beta2-adrenergic receptor." J Biol Chem **279**(42): 44101-44112.

Izycki, T., E. Chyczewska, W. Naumnik and M. Ossolinska (2006). "Serum levels of IGF-I and IGFBP-3 in patients with lung cancer during chemotherapy." Oncol Res **16**(1): 49-54.

Jemal, A., M. Thun, X. Q. Yu, A. M. Hartman, V. Cokkinides, M. M. Center, H. Ross and E. M. Ward (2011). "Changes in smoking prevalence among U.S. adults by state and region: Estimates from the Tobacco Use Supplement to the Current Population Survey, 1992-2007." BMC Public Health **11**: 512.

Journot, L., C. Waeber, C. Pantaloni, F. Holsboer, P. H. Seeburg, J. Bockaert and D. Spengler (1995). "Differential signal transduction by six splice variants of

the pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) receptor." Biochem Soc Trans **23**(1): 133-137.

Juneja, J. and P. J. Casey (2009). "Role of G12 proteins in oncogenesis and metastasis." Br J Pharmacol **158**(1): 32-40.

Kanwal, R. and S. Gupta (2012). "Epigenetic modifications in cancer." Clin Genet **81**(4): 303-311.

Kim, D., D. L. Lewis, L. Graziadei, E. J. Neer, D. Bar-Sagi and D. E. Clapham (1989). "G-protein beta gamma-subunits activate the cardiac muscarinic K⁺-channel via phospholipase A₂." Nature **337**(6207): 557-560.

Korkola, J. and J. W. Gray (2010). "Breast cancer genomes--form and function." Curr Opin Genet Dev **20**(1): 4-14.

Krieg PA, Melton DA. (1984) "Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs." Nucleic Acids Res. **25**;12(18):7057-7070.

Küntziger, T., O. Gavet, A. Sobel and M. Bornens (2001). "Differential effect of two stathmin/Op18 phosphorylation mutants on *Xenopus* embryo development." J Biol Chem **276**(25): 22979-22984.

L., W. R. and E. J. H. (1991) "Identification of G-Proteins functionally associated with receptors for Ca²⁺-mobilizing agonists." A480-A480.

Lam, H. C., K. Takahashi, M. A. Ghatei, S. M. Kanse, J. M. Polak and S. R. Bloom (1990). "Binding sites of a novel neuropeptide pituitary-adenylate-cyclase-activating polypeptide in the rat brain and lung." Eur J Biochem **193**(3): 725-729.

Larhammar, D, (2009) "Neuropeptides Phylogeny and Evolution." 873-880.

Lazarovici, P., H. Jiang and D. Fink (1998). "The 38-amino-acid form of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces neurite outgrowth in PC12 cells that is dependent on protein kinase C and extracellular signal-regulated kinase but not on protein kinase A, nerve growth factor receptor tyrosine kinase, p21(ras) G protein, and pp60(c-src) cytoplasmic tyrosine kinase." Mol Pharmacol **54**(3): 547-558.

Lelievre, V., A. C. Meunier, E. Caigneaux, J. Falcon and J. M. Muller (1998). Differential expression and function of PACAP and VIP receptors in four human colonic adenocarcinoma cell lines. Cell Signal. England. **10**: 13-26.

Lelievre, V., N. Pineau, J. Du, C. H. Wen, T. Nguyen, T. Janet, J. M. Muller and J. A. Waschek (1998). "Differential effects of peptide histidine isoleucine (PHI) and related peptides on stimulation and suppression of neuroblastoma cell proliferation. A novel VIP-independent action of PHI via MAP kinase." J Biol Chem **273**(31): 19685-19690.

Anhang

Lerner, E. A., J. M. Ribeiro, R. J. Nelson and M. R. Lerner (1991). "Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*." J Biol Chem **266**(17): 11234-11236.

Li, M., J. L. Maderdrut, J. J. Lertora and V. Batuman (2007). Intravenous infusion of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in a patient with multiple myeloma and myeloma kidney: a case study. Peptides. United States. **28**: 1891-1895.

Lindén, A., L. O. Cardell, S. Yoshihara and J. A. Nadel (1999). "Bronchodilation by pituitary adenylate cyclase-activating peptide and related peptides." Eur Respir J **14**(2): 443-451.

Lindén, A., S. Yoshihara, L. O. Cardell, T. Kaneko, P. Stjärne and J. A. Nadel (1997). "Functional type II VIP-PACAP receptors in human airway epithelial-like cells." Peptides **18**(6): 843-846.

Litosch, I. and J. N. Fain (1985). "5-Methyltryptamine stimulates phospholipase C-mediated breakdown of exogenous phosphoinositides by blowfly salivary gland membranes." J Biol Chem **260**(30): 16052-16055.

Liu, H., A. T. Kho, I. S. Kohane and Y. Sun (2006). "Predicting survival within the lung cancer histopathological hierarchy using a multi-scale genomic model of development." PLoS Med **3**(7): e232.

Liu, P., H. Cheng, T. M. Roberts and J. J. Zhao (2009). "Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer." Nat Rev Drug Discov **8**(8): 627-644.

Liu, Y. C., A. M. Khawaja and D. F. Rogers (1999). "Effect of vasoactive intestinal peptide (VIP)-related peptides on cholinergic neurogenic and direct mucus secretion in ferret trachea in vitro." Br J Pharmacol **128**(6): 1353-1359.

Lu, N., Zhou, R., and DiCicco-Bloom, E. (1998). Opposing mitogenic regulation by PACAP in sympathetic and cerebral cortical precursors correlates with differential expression of PACAP receptor (PAC1-R) isoforms. J. Neurosci. Res. **53**, 651–662.

Lutz, E. M., E. Ronaldson, P. Shaw, M. S. Johnson, P. J. Holland and R. Mitchell (2006). Characterization of novel splice variants of the PAC1 receptor in human neuroblastoma cells: consequences for signaling by VIP and PACAP. Mol Cell Neurosci. United States. **31**: 193-209.

Lyons, J., C. A. Landis, G. Harsh, L. Vallar, K. Grünwald, H. Feichtinger, Q. Y. Duh, O. H. Clark, E. Kawasaki and H. R. Bourne (1990). "Two G protein oncogenes in human endocrine tumors." Science **249**(4969): 655-659.

Ma, Y. C., J. Huang, S. Ali, W. Lowry and X. Y. Huang (2000). "Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins." Cell **102**(5): 635-646.

Maucuer, A., J. Moreau, M. Méchali and A. Sobel (1993). "Stathmin gene family: phylogenetic conservation and developmental regulation in *Xenopus*." J Biol Chem **268**(22): 16420-16429.

May, V., E. Lutz, C. MacKenzie, K. C. Schutz, K. Dozark and K. M. Braas (2010). "Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/PAC1HOP1 receptor activation coordinates multiple neurotrophic signaling pathways: Akt activation through phosphatidylinositol 3-kinase gamma and vesicle endocytosis for neuronal survival." J Biol Chem **285**(13): 9749-9761.

McCulloch, D. A., E. M. Lutz, M. S. Johnson, C. J. MacKenzie and R. Mitchell (2000). "Differential activation of phospholipase D by VPAC and PAC1 receptors." Ann N Y Acad Sci **921**: 175-185.

McCulloch, D. A., MacKenzie, C. J., Johnson, M. S., Robertson, D. N., Holland, P. J., Ronaldson, E., et al. (2002). Additional signals from VPAC/PAC family receptors. Biochem. Soc. Trans. **30**, 441–446.

Merriam, L. A., C. N. Baran, B. M. Girard, J. C. Hardwick, V. May and R. L. Parsons (2013). "Pituitary adenylate cyclase 1 receptor internalization and endosomal signaling mediate the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-induced increase in Guinea pig cardiac neuron excitability." J Neurosci **33**(10): 4614-4622.

Mester, L., K. Kovacs, B. Racz, I. Solti, T. Atlasz, K. Szabadfi, A. Tamas and D. Reglodi (2011). "Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is protective against oxidative stress in human retinal pigment epithelial cells." J Mol Neurosci **43**(1): 35-43.

Metro, G. and F. Cappuzzo (2009). "Emerging drugs for small-cell lung cancer." Expert Opin Emerg Drugs **14**(4): 591-606.

Meyer, D. K. (2006) The effects of PACAP on neural cell proliferation. Regul Pept. 2006 Nov **15**;137(1-2):50-7.

Micke, P., M. Basrai, A. Faldum, F. Bittinger, L. Rönstrand, A. Blaukat, K. M. Beeh, F. Oesch, B. Fischer, R. Buhl and J. G. Hengstler (2003). "Characterization of c-kit expression in small cell lung cancer: prognostic and therapeutic implications." Clin Cancer Res **9**(1): 188-194.

Miyata, A., A. Arimura, R. R. Dahl, N. Minamino, A. Uehara, L. Jiang, M. D. Culler and D. H. Coy (1989). "Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells." Biochem Biophys Res Commun **164**(1): 567-574.

Miyata, A., L. Jiang, R. D. Dahl, C. Kitada, K. Kubo, M. Fujino, N. Minamino and A. Arimura (1990). "Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38)." Biochem Biophys Res Commun **170**(2): 643-648.

Mochizuki, N., Y. Ohba, E. Kiyokawa, T. Kurata, T. Murakami, T. Ozaki, A. Kitabatake, K. Nagashima and M. Matsuda (1999). "Activation of the ERK/MAPK pathway by an isoform of rap1GAP associated with G alpha(i)." Nature **400**(6747): 891-894.

Anhang

Moody, T. W., A. Di Florio and R. T. Jensen (2012). "PYK-2 is tyrosine phosphorylated after activation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptors in lung cancer cells." J Mol Neurosci **48**(3): 660-666.

Moody, T. W., J. Leyton, T. Coelho, S. Jakowlew, K. Takahashi, F. Jameison, M. Koh, M. Fridkin, I. Gozes and M. Knight (1997). "(Stearyl, Norleucine17)VIP hybrid antagonizes VIP receptors on non-small cell lung cancer cells." Life Sci **61**(17): 1657-1666.

Moody, T. W., F. Zia and A. Makheja (1993). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptors are present on small cell lung cancer cells. Peptides. United States. **14**: 241-246.

Moro, O. and E. A. Lerner (1997). "Maxadilan, the vasodilator from sand flies, is a specific pituitary adenylate cyclase activating peptide type I receptor agonist." J Biol Chem **272**(2): 966-970.

Musnier, A., B. Blanchot, E. Reiter and P. Crépieux (2010). "GPCR signalling to the translation machinery." Cell Signal **22**(5): 707-716.

Mustafa, T., Grimaldi, M., and Eiden, L. E. (2007). The hop cassette of the PAC1 receptor confers coupling to Ca²⁺ elevation required for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-evoked neurosecretion. J. Biol. Chem. **282**, 8079–8091.

Neer, E. J. (1995). "Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals." Cell **80**(2): 249-257.

Nemunaitis, J. (2012). "Stathmin 1: a protein with many tasks. New biomarker and potential target in cancer." Expert Opin Ther Targets **16**(7): 631-634.

Neves, S. R., P. T. Ram and R. Iyengar (2002). "G protein pathways." Science **296**(5573): 1636-1639.

Nguyen, T. D., G. G. Heintz and M. S. Wolfe (1993). "Structural characterization of PACAP receptors on rat liver plasma membranes." Am J Physiol **265**(5 Pt 1): G811-818.

Niethammer, P., P. Bastiaens and E. Karsenti (2004). "Stathmin-tubulin interaction gradients in motile and mitotic cells." Science **303**(5665): 1862-1866.

Nikolaev, V. O., M. Bünemann, L. Hein, A. Hannawacker and M. J. Lohse (2004). "Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation." J Biol Chem **279**(36): 37215-37218.

North, W. G., G. Gao, A. Jensen, V. A. Memoli and J. Du (2010). "NMDA receptors are expressed by small-cell lung cancer and are potential targets for effective treatment." Clin Pharmacol **2**: 31-40.

Ogi, K., C. Kimura, H. Onda, A. Arimura and M. Fujino (1990). "Molecular cloning and characterization of cDNA for the precursor of rat pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)." Biochem Biophys Res Commun **173**(3): 1271-1279.

Ohtaki T, Watanabe T, Ishibashi Y, Kitada C, Tsuda M, Gottschall PE, Arimura A, and Fujino M (1990) Molecular identification of receptor for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. Biochem Biophys Res Commun 171:838–844.

Palmer, A. E., M. Giacomello, T. Kortemme, S. A. Hires, V. Lev-Ram, D. Baker and R. Y. Tsien (2006). "Ca²⁺ indicators based on computationally redesigned calmodulin-peptide pairs." Chem Biol **13**(5): 521-530.

Palmer, A. E., C. Jin, J. C. Reed and R. Y. Tsien (2004). "Bcl-2-mediated alterations in endoplasmic reticulum Ca²⁺ analyzed with an improved genetically encoded fluorescent sensor." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(50): 17404-17409.

Pantaloni, C., P. Brabet, B. Bilanges, A. Dumuis, S. Houssami, D. Spengler, J. Bockaert and L. Journot (1996). "Alternative splicing in the N-terminal extracellular domain of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor modulates receptor selectivity and relative potencies of PACAP-27 and PACAP-38 in phospholipase C activation." J Biol Chem **271**(36): 22146-22151.

Pardal, R., M. F. Clarke and S. J. Morrison (2003). "Applying the principles of stem-cell biology to cancer." Nat Rev Cancer **3**(12): 895-902.

Patnaik, S. K., J. Dahlgaard, W. Mazin, E. Kannisto, T. Jensen, S. Knudsen and S. Yendamuri (2012). "Expression of microRNAs in the NCI-60 cancer cell-lines." PLoS One **7**(11): e49918.

Peacock, C. D. and D. N. Watkins (2008). "Cancer stem cells and the ontogeny of lung cancer." J Clin Oncol **26**(17): 2883-2889.

Peleg, S., D. Varon, T. Ivanina, C. W. Dessauer and N. Dascal (2002). "G(α)(i) controls the gating of the G protein-activated K(+) channel, GIRK." Neuron **33**(1): 87-99.

Pilzer, I., and Gozes, I. (2006b). VIP provides cellular protection through a specific splice variant of the PACAP receptor: a new neuroprotection target. Peptides 27, 2867–2876.

Pisegna, J. R., T. W. Moody and S. A. Wank (1996). "Differential signaling and immediate-early gene activation by four splice variants of the human pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor (hPACAP-R)." Ann N Y Acad Sci **805**: 54-64; discussion 64-56.

Pisegna, J. R., and Wank, S. A. (1996). Cloning and characterization of the signal transduction of four splice variants of the human pituitary adenylate

Anhang

cyclase activating polypeptide receptor. Evidence for dual coupling to adenylate cyclase and phospholipase C. *J. Biol. Chem.* 271, 17267–17274.

Ponimaskin, E., T. Voyno-Yasenetskaya, D. W. Richter, M. Schachner and A. Dityatev (2007). "Morphogenic signaling in neurons via neurotransmitter receptors and small GTPases." *Mol Neurobiol* **35**(3): 278-287.

Ponsioen, B., M. Gloerich, L. Ritsma, H. Rehmann, J. L. Bos and K. Jalink (2009). "Direct spatial control of Epac1 by cyclic AMP." *Mol Cell Biol* **29**(10): 2521-2531.

Potti, A., N. Moazzam, K. Ramar, D. S. Hanekom, S. Kargas and M. Koch (2003). "CD117 (c-KIT) overexpression in patients with extensive-stage small-cell lung carcinoma." *Ann Oncol* **14**(6): 894-897.

Pozo, D., M. L. Montilla, J. M. Guerrero and J. R. Calvo (1997). "Characterization of VIP receptor-effector system antagonists in rat and mouse peritoneal macrophages." *Eur J Pharmacol* **321**(3): 379-386.

Price, D. K., J. R. Ball, Z. Bahrani-Mostafavi, J. C. Vachris, J. S. Kaufman, R. W. Naumann, R. V. Higgins and J. B. Hall (2000). "The phosphoprotein Op18/stathmin is differentially expressed in ovarian cancer." *Cancer Invest* **18**(8): 722-730.

Reubi, J. C. (2003). "Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy." *Endocr Rev* **24**(4): 389-427.

Robberecht, P., P. Gourlet, A. Cauvin, L. Buscail, P. De Neef, A. Arimura and J. Christophe (1991). "PACAP and VIP receptors in rat liver membranes." *Am J Physiol* **260**(1 Pt 1): G97-102.

Robberecht, P., P. Gourlet, P. De Neef, M. C. Woussen-Colle, M. C. Vandermeers-Piret, A. Vandermeers and J. Christophe (1992). "Structural requirements for the occupancy of pituitary adenylate-cyclase-activating-peptide (PACAP) receptors and adenylate cyclase activation in human neuroblastoma NB-OK-1 cell membranes. Discovery of PACAP(6-38) as a potent antagonist." *Eur J Biochem* **207**(1): 239-246.

Ronaldson, E., Robertson, D. N., Johnson, M. S., Holland, P. J., Mitchell, R., and Lutz, E. M. (2002). Specific interaction between the hop1 intracellular loop 3 domain of the human PAC(1) receptor and ARF. *Regul. Pept.* 109, 193–198

Rosenbaum, D. M., S. G. Rasmussen and B. K. Kobilka (2009). "The structure and function of G-protein-coupled receptors." *Nature* **459**(7245): 356-363.

Rosselin, G., M. Maletti, J. Besson and W. Rostène (1982). "A new neuroregulator: the vasoactive intestinal peptide or VIP." *Mol Cell Endocrinol* **27**(3): 243-262.

Rosti, G., G. Bevilacqua, P. Bidoli, L. Portalone, A. Santo and G. Genestreti (2006). "Small cell lung cancer." *Ann Oncol* **17 Suppl 2**: ii5-10.

Rosti, G., O. Carminati, M. Monti, S. Tamberi and M. Marangolo (2006). "Chemotherapy advances in small cell lung cancer." Ann Oncol **17 Suppl 5**: v99-102.

Roychowdhury, S., D. Panda, L. Wilson and M. M. Rasenick (1999). "G protein alpha subunits activate tubulin GTPase and modulate microtubule polymerization dynamics." J Biol Chem **274**(19): 13485-13490.

Rubin, L. L. and F. J. de Sauvage (2006). "Targeting the Hedgehog pathway in cancer." Nat Rev Drug Discov **5**(12): 1026-1033.

Ruotsalainen, T., H. Joensuu, K. Mattson and P. Salven (2002). "High pretreatment serum concentration of basic fibroblast growth factor is a predictor of poor prognosis in small cell lung cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **11**(11): 1492-1495.

Said, S. I. and V. Mutt (1970). "Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine." Science **169**(3951): 1217-1218.

Salcido, C. D., A. Larochelle, B. J. Taylor, C. E. Dunbar and L. Varticovski (2010). "Molecular characterisation of side population cells with cancer stem cell-like characteristics in small-cell lung cancer." Br J Cancer **102**(11): 1636-1644.

Salido, M., E. Arriola, A. Carracedo, I. Cañadas, A. Rovira, B. Espinet, F. Rojo, M. Arumi, S. Serrano, J. Albanell and F. Sole (2009). "Cytogenetic characterization of NCI-H69 and NCI-H69AR small cell lung cancer cell lines by spectral karyotyping." Cancer Genet Cytogenet **191**(2): 97-101.

Sasi, S. P., X. Yan, H. Enderling, D. Park, H. Y. Gilbert, C. Curry, C. Coleman, L. Hlatky, G. Qin, R. Kishore and D. A. Goukassian (2012). "Breaking the 'harmony' of TNF- α signaling for cancer treatment." Oncogene **31**(37): 4117-4127.

Savai, R., A. C. Langheinrich, R. T. Schermuly, S. S. Pullamsetti, R. Dumitrascu, H. Traupe, W. S. Rau, W. Seeger, F. Grimminger and G. A. Banat (2009). "Evaluation of angiogenesis using micro-computed tomography in a xenograft mouse model of lung cancer." Neoplasia **11**(1): 48-56.

Schmidt-Choudhury, A., G. T. Furuta, S. J. Galli, W. E. Schmidt and B. K. Wershil (1999). "Mast cells contribute to PACAP-induced dermal oedema in mice." Regul Pept **82**(1-3): 65-69.

Schulz, S., C. Rocken, C. Mawrin, W. Weise and V. Holtt (2004). Immunocytochemical identification of VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptors in normal and neoplastic human tissues with subtype-specific antibodies. Clin Cancer Res. United States. **10**: 8235-8242.

Seaborn, T., O. Masmoudi-Kouli, A. Fournier, H. Vaudry and D. Vaudry (2011). "Protective effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) against apoptosis." Curr Pharm Des **17**(3): 204-214.

Anhang

Segre, G. V. and S. R. Goldring (1993). "Receptors for secretin, calcitonin, parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide, vasoactive intestinal peptide, glucagonlike peptide 1, growth hormone-releasing hormone, and glucagon belong to a newly discovered G-protein-linked receptor family." Trends Endocrinol Metab **4**(10): 309-314.

Shibata, T., A. Kokubu, K. Tsuta and S. Hirohashi (2009). "Oncogenic mutation of PIK3CA in small cell lung carcinoma: a potential therapeutic target pathway for chemotherapy-resistant lung cancer." Cancer Lett **283**(2): 203-211.

Shigyo, M., H. Aizawa, H. Inoue, K. Matsumoto, S. Takata and N. Hara (1998). "Pituitary adenylate cyclase activating peptide regulates neurally mediated airway responses." Eur Respir J **12**(1): 64-70.

Simon, M. I., M. P. Strathmann and N. Gautam (1991). "Diversity of G proteins in signal transduction." Science **252**(5007): 802-808.

Singer, S., M. Malz, E. Herpel, A. Warth, M. Bissinger, M. Keith, T. Muley, M. Meister, H. Hoffmann, R. Penzel, G. Gdynia, V. Ehemann, P. A. Schnabel, R. Kuner, P. Huber, P. Schirmacher and K. Breuhahn (2009). "Coordinated expression of stathmin family members by far upstream sequence element-binding protein-1 increases motility in non-small cell lung cancer." Cancer Res **69**(6): 2234-2243.

Spengler, D., C. Waeber, C. Pantaloni, F. Holsboer, J. Bockaert, P. H. Seeburg and L. Journot (1993). "Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor." Nature **365**(6442): 170-175.

Sriuranpong, V., M. W. Borges, R. K. Ravi, D. R. Arnold, B. D. Nelkin, S. B. Baylin and D. W. Ball (2001). "Notch signaling induces cell cycle arrest in small cell lung cancer cells." Cancer Res **61**(7): 3200-3205.

Stella, M. C. and P. M. Comoglio (1999). "HGF: a multifunctional growth factor controlling cell scattering." Int J Biochem Cell Biol **31**(12): 1357-1362.

Stephens, L., F. T. Cooke, R. Walters, T. Jackson, S. Volinia, I. Gout, M. D. Waterfield and P. T. Hawkins (1994). "Characterization of a phosphatidylinositol-specific phosphoinositide 3-kinase from mammalian cells." Curr Biol **4**(3): 203-214.

Suda, K., D. M. Smith, M. A. Ghatei and S. R. Bloom (1992). "Investigation of the interaction of VIP binding sites with VIP and PACAP in human brain." Neurosci Lett **137**(1): 19-23.

Tang, W. J. and A. G. Gilman (1991). "Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein beta gamma subunits." Science **254**(5037): 1500-1503.

Taniwaki, M., Y. Daigo, N. Ishikawa, A. Takano, T. Tsunoda, W. Yasui, K. Inai, N. Kohno and Y. Nakamura (2006). "Gene expression profiles of small-cell lung cancers: molecular signatures of lung cancer." Int J Oncol **29**(3): 567-575.

Tanno, S., Y. Ohsaki, K. Nakanishi, E. Toyoshima and K. Kikuchi (2004). "Human small cell lung cancer cells express functional VEGF receptors, VEGFR-2 and VEGFR-3." Lung Cancer **46**(1): 11-19.

Tatsuno, I., P. E. Gottschall, K. Köves and A. Arimura (1990). "Demonstration of specific binding sites for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in rat astrocytes." Biochem Biophys Res Commun **168**(3): 1027-1033.

Theodoropoulou, M. and G. K. Stalla (2013). "Somatostatin receptors: From signaling to clinical practice." Front Neuroendocrinol **34**(3): 228-252.

Tradonsky, A., T. Rubin, R. Beck, B. Ring, R. Seitz and S. Mair (2012). "A search for reliable molecular markers of prognosis in prostate cancer: a study of 240 cases." Am J Clin Pathol **137**(6): 918-930.

Travis, W. D. (2009). "Lung tumours with neuroendocrine differentiation." Eur J Cancer **45 Suppl 1**: 251-266.

Travis, W. D., K. Garg, W. A. Franklin, I. I. Wistuba, B. Sabloff, M. Noguchi, R. Kakinuma, M. Zakowski, M. Ginsberg, R. Padera, F. Jacobson, B. E. Johnson, F. Hirsch, E. Brambilla, D. B. Flieder, K. R. Geisinger, F. Thunnissen, K. Kerr, D. Yankelevitz, T. J. Franks, J. R. Galvin, D. W. Henderson, A. G. Nicholson, P. S. Hasleton, V. Roggli, M. S. Tsao, F. Cappuzzo and M. Vazquez (2006). "Bronchioloalveolar carcinoma and lung adenocarcinoma: the clinical importance and research relevance of the 2004 World Health Organization pathologic criteria." J Thorac Oncol **1**(9 Suppl): S13-19.

Uings, I. J. and S. N. Farrow (2000). "Cell receptors and cell signalling." Mol Pathol **53**(6): 295-299.

Ushiyama, M., Ikeda, R., Sugawara, H., Yoshida, M., Mori, K., Kangawa, K., et al. (2007). Differential intracellular signaling through PAC1 isoforms as a result of alternative splicing in the first extracellular domain and the third intracellular loop. Mol. Pharmacol. **72**, 103–111.

Ushiyama, M., Ikeda, R., Yoshida, M., Mori, K., Kangawa, K., Sugawara, H., et al. (2010). Alternative splicing of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor contributes to function of PACAP-27. J. Mol. Neurosci. **42**, 341–348.

Vaudry, D., Y. Chen, A. Ravni, C. Hamelink, A. G. Elkahloun and L. E. Eiden (2002). "Analysis of the PC12 cell transcriptome after differentiation with pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)." J Neurochem **83**(6): 1272-1284.

Vaudry, D., A. Falluel-Morel, S. Bourgault, M. Basille, D. Burel, O. Wurtz, A. Fournier, B. K. Chow, H. Hashimoto, L. Galas and H. Vaudry (2009). "Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery." Pharmacol Rev **61**(3): 283-357.

Vertongen, P., C. Devalck, E. Sariban, M. H. De Laet, H. Martelli, F. Paraf, P. Helardot and P. Robberecht (1996). Pituitary adenylate cyclase activating

Anhang

peptide and its receptors are expressed in human neuroblastomas. J Cell Physiol. United States. **167**: 36-46.

Waschek, J. A., E. Diccico-Bloom, A. Nicot and V. Lelievre (2006). Hedgehog signaling: new targets for GPCRs coupled to cAMP and protein kinase A. Ann N Y Acad Sci. United States. **1070**: 120-128.

Waschek, J. A., E. M. Diccico-Bloom, V. Lelievre, X. Zhou and Z. Hu (2000). "PACAP action in nervous system development, regeneration, and neuroblastoma cell proliferation." Ann N Y Acad Sci **921**: 129-136.

Watkins, D. N., D. M. Berman and S. B. Baylin (2003). "Hedgehog signaling: progenitor phenotype in small-cell lung cancer." Cell Cycle **2**(3): 196-198.

Wei, Y., Martin, S. C., Heinrich, G., and Mojsov, S. (1998). Cloning and functional characterization of PACAP-specific receptors in zebrafish. Ann. N. Y. Acad. Sci. 865, 45–48.

Williams, K., R. Ghosh, P. V. Giridhar, G. Gu, T. Case, S. M. Belcher and S. Kasper (2012). "Inhibition of stathmin1 accelerates the metastatic process." Cancer Res **72**(20): 5407-5417.

Woehler, A. and E. G. Ponimaskin (2009). "G protein--mediated signaling: same receptor, multiple effectors." Curr Mol Pharmacol **2**(3): 237-248.

Wu, S., Y. Yoshiko and F. De Luca (2006). "Stanniocalcin 1 acts as a paracrine regulator of growth plate chondrogenesis." J Biol Chem **281**(8): 5120-5127.

Yamada, K., S. Matsuzaki, T. Hattori, R. Kuwahara, M. Taniguchi, H. Hashimoto, N. Shintani, A. Baba, N. Kumamoto, T. Yoshikawa, T. Katayama and M. Tohyama (2010). "Increased stathmin1 expression in the dentate gyrus of mice causes abnormal axonal arborizations." PLoS One **5**(1): e8596.

Yenjai, C. and S. Wanich (2010). "Cytotoxicity against KB and NCI-H187 cell lines of modified flavonoids from *Kaempferia parviflora*." Bioorg Med Chem Lett **20**(9): 2821-2823.

Yeung, B. H., A. Y. Law and C. K. Wong (2012). "Evolution and roles of stanniocalcin." Mol Cell Endocrinol **349**(2): 272-280.

Zhang, J., Y. Ma, S. S. Taylor and R. Y. Tsien (2001). "Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(26): 14997-15002.

Zhang, K., P. J. Lindsberg, T. Tatlisumak, M. Kaste, H. S. Olsen and L. C. Andersson (2000). "Stanniocalcin: A molecular guard of neurons during cerebral ischemia." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3637-3642.

Zhang, K. Z., J. A. Westberg, A. Paetau, K. von Boguslawsky, P. Lindsberg, M. Erlander, H. Guo, J. Su, H. S. Olsen and L. C. Andersson (1998). "High expression of stanniocalcin in differentiated brain neurons." Am J Pathol **153**(2): 439-445.

Zhang, X., W. Cai, F. Cao, E. Schreibmann, Y. Wu, J. C. Wu, L. Xing and X. Chen (2006). "18F-labeled bombesin analogs for targeting GRP receptor-expressing prostate cancer." J Nucl Med **47**(3): 492-501.

Zhou, C. J., S. Kikuyama, M. Shibamura, T. Hirabayashi, S. Nakajo, A. Arimura and S. Shioda (2000). "Cellular distribution of the splice variants of the receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PAC(1)-R) in the rat brain by *In situ* RT-PCR." Brain Res Mol Brain Res **75**(1): 150-158.

Zhu, L., C. Tamvakopoulos, D. Xie, J. Dragovic, X. Shen, J. E. Fenyk-Melody, K. Schmidt, A. Bagchi, P. R. Griffin, N. A. Thornberry and R. Sinha Roy (2003). "The role of dipeptidyl peptidase IV in the cleavage of glucagon family peptides: in vivo metabolism of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-(1-38)." J Biol Chem **278**(25): 22418-22423.

Zinn, R. L., E. E. Gardner, I. Dobromilskaya, S. Murphy, L. Marchionni, C. L. Hann and C. M. Rudin (2013). "Combination treatment with ABT-737 and chloroquine in preclinical models of small cell lung cancer." Mol Cancer **12**: 16.

5.4 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Eberhard Weihe und Dr. Martin Schäfer für die Überlassung des Themas und die engagierte und kompetente Betreuung.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. R. Müller und Prof. Dr. S. Brüsselbach aus dem Institute für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) Marburg (Philipps-Universität Marburg, Emil-Mannkopff-Str. 2, D-35032 Marburg) dafür mir die LLC1-Zelllinie und die subkutanen LLC1-Tumortransplantate zur Verfügung gestellt zu haben. Ich bedanke mich ebenfalls für in Paraffin eingebettete Lungengewebe und tiefgefrorene kryopräservierte Lungengewebe mit LLC1-Transplantaten, die mir von Prof. Dr. H. Renz, PD Dr. A. Nockher und K. Seidler aus dem Biomedizinisches Forschungszentrum Marburg (BMFZ) (Hans-Meerwein-Straße 2, D-35043 Marburg) zur Verfügung gestellt wurden.

Die Durchführung der FRET-Experimente konnte dank der Nutzung der Geräte in den Laborräumlichkeiten unter Anleitung von Dr. C. Krasel aus dem Institut für Pharmakologie und klinische Pharmazie der Philipps Universität Marburg (Karl-von-Frisch-Str. 1, 35043 Marburg) sichergestellt werden, mein Dank gilt deshalb auch Prof. Dr. M. Bünemann.

Für die großzügige Bereitstellung von RNA-Extrakten unterschiedlicher humaner Bronchialkarzinome im Rahmen des deutschen Lungenzentrums (DLZ) bedanke ich mich bei Prof. Dr. F. Herth, Dr. T. Mulley und Dr. M. Meister aus der Thoraxklinik-Heidelberg gGmbH (Amalienstr. 5, 69126 Heidelberg)

Bei Dr. L. Eiden möchte ich mich für die ausgezeichneten Vorschläge und dem wissenschaftlichen Rat sowie die Kunst, die richtigen Fragen zu stellen, herzlich bedanken.

Bei Prof. Kinscherf bedanke ich mich dafür, dass ich die Laborräumlichkeiten und Geräte seiner Arbeitsgruppe benutzen durfte und bei Dr. Bonnaterra bedanke ich mich dafür mir unterstützend bei meinen Zellkulturexperimenten zur Seite gestanden zu haben.

Besonderer Dank gilt auch Martin Klietz und Dr. Mirjam Bertoune, mit denen ich ergiebige Diskussionen zu den Themen dieser Arbeit geführt habe.

Bei PD Dr. B. Schütz und PD Dr. M Bette möchte ich mich für die freundliche Beantwortung von Fragen zu experimentellen Planung bedanken.

Bei Michael Schneider, Heike Reichert-Preibsch, Barbara Wiegand, Heidi Hlawaty und Annette Seip und bedanke ich mich für die kontinuierliche technische Unterstützung.

5.5 Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Berlin waren die Herren Prof. Abram, Prof. Christmann, PD Fürstenau, Prof. Hucho, Prof. Menzel, PD Meyer, Prof. Pflüger, Prof. Rausch, Prof. Schweiger, Prof. Simon, Prof. Stark.

Mein akademischer Lehrer in Dundee war Herr Prof. Proud.

Mein akademischer Lehrer in Marburg war Herr Prof. Weihe.

5.6 Fördergelder

Die Fördergelder, mit denen diese Arbeit finanziert wurde kamen aus der hessischen **Landes-Offensive zur Entwicklung Wissenschaftlich-ökonomischer Exzellenz (LOEWE)** Schwerpunkt: „Tumor und Entzündung“, sowie dem **LOEWE-Zentrum Universities of Gießen and Marburg Lung Centre (UGMLC)**.