Einfluss von FTY720, S1P und Estrogen auf die Tumorpromotion

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin

> vorgelegt von Henrik Potteck aus Frankfurt (Oder)

> > Mai 2010

- 1. Gutachter: Herr Professor Dr. Burkhard Kleuser
- 2. Gutachter: Herr Professor Dr. Matthias F. Melzig

Datum der Disputation: 12.07.2010

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von

Herrn Professor Dr. Burkhard Kleuser

in der Abteilung für Pharmakologie und Toxikologie des Instituts für Pharmazie der Freien Universität Berlin angefertigt.

Für meine Familie

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Burkhard Kleuser für die Vergabe des hochinteressanten Dissertationsthemas. Außerdem danke ich ihm für die hervorragende Betreuung, die durch stete Gesprächsbereitschaft und konstruktive Kritik gekennzeichnet war. Die hilfreiche Unterstützung und wissenschaftliche Kompetenz haben diese Arbeit erst ermöglicht.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. Matthias F. Melzig, Institut für Pharmazeutische Biologie, für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Ich danke Herrn Dr. Markus Tölle und Frau Mirjam Schuchardt, Medizinische Klinik für Nephrologie der Charité, für die Bereitstellung der Mäuse zur Gewinnung muriner Zellen.

Ich danke Herrn Dr. Jung, Herrn Dr. Schildknecht, dem Ärzteteam des St. Joseph-Krankenhauses sowie dem Ärzteteam des Operationszentrums Birkenwerder für das Gewebematerial zur Zellgewinnung.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Frau Hannelore Gonska, die mir bei der Einarbeitung und mit ihrem unermesslichen Wissen in der Zellkultur eine große Hilfe war. Außerdem waren die unzähligen Tassen Kaffee und ihr offenes Ohr von unschätzbarem Wert.

Allen Mitgliedern der Arbeitskreise von Frau Professor Dr. Monika Schäfer-Korting und Herrn Professor Dr. Burkhard Kleuser danke ich für die gute Zusammenarbeit und das freundschaftliche Arbeitsklima. Für die wunderbare Aufnahme in die Arbeitskreise, die enge Laborarbeit und die Unterstützung während der ganzen Zeit möchte ich mich besonders bei Frau Dr. Christina Keller, Herrn Ulrich Kürschner, Frau Peggy Schlupp, Herrn Karsten Zimmermann, Frau Dr. Melanie Schüppel, Frau Dr. Anja Schwanke, Frau Dr. Nadine Wolf, Frau Dr. Vivian Kral, Frau Dr. Anja Lüth, Herrn Dr. Günther Weindl, Frau Dr. Daniela Malek, Frau Dr. Corinna Schraut, Herrn Dr. Christian Braem, Frau Dr. Anna Katharina Manzer, Frau Elisabeth Schmitz, Herrn Lukasz Japtok und Herrn Michael Jakobi und bedanken.

Danksagung

Darüber hinaus danke ich ganz herzlich Frau Dr. Christina Keller, Herrn Ulrich Kürschner, Frau Peggy Schlupp, Herrn Karsten Zimmermann, Frau Dr. Melanie Schüppel, Frau Dr. Barbara Nieuwenhuis, Frau Dr. Anja Schwanke, Frau Dr. Nadine Wolf, Frau Dr. Vivian Kral, Herrn Dr. Günther Weindl und Herrn Dr. Christian Braem für die vielen Aktivitäten auch über das Labor hinaus.

Außerdem danke ich Frau Peggy Schlupp ganz herzlich für die gemeinsame Zeit im Büro mit zahlreichen informativen, kritischen und lustigen Gesprächen.

Ich danke außerdem Frau Wiebke Klipper, Frau Sarah Heilmann, Frau Dr. Christina Keller und Frau Silvia Materne für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich besonders bei meiner Familie und Frau Stefanie Zach für die wertvolle Unterstützung und den liebevollen Rückhalt während der gesamten Zeit bedanken.

Originalarbeiten:

Potteck H, Schueppel M, Kleuser B (2010) Sphingosine 1-phosphate protects human keratinocytes from apoptosis but inhibits insulin mediated cytoprotection via PKCδ activation (in Vorbereitung)

Potteck H, Nieuwenhuis B, Luth A, van der Giet M, Kleuser B (2010) Phosphorylation of the immunomodulator FTY720 inhibits programmed cell death of fibroblasts via the S1P3 receptor subtype and Bcl-2 activation. Cell Physiol Biochem 26:67-78

Kleuser B, Malek D, Gust R, Pertz HH, Potteck H (2008) 17-Beta-estradiol inhibits transforming growth factor-beta signaling and function in breast cancer cells via activation of extracellular signal-regulated kinase through the G protein-coupled receptor 30. Molecular pharmacology 74:1533-1543.

Vorträge:

H. Potteck, B. Kleuser; Antiapoptotic Actions of FTY720-Phosphate in Fibroblasts, Meeting der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), März 2009, Essen

H. Potteck., C. Braem., M. Schäfer Korting, B. Kleuser; Phophorylation of the immunomodulator FTY720 protects fibroblasts from apoptosis via the S1P3 Receptor subtype. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (Suppl 1), 2007

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Entstehung von Tumoren	2
1.2	Der programmierte Zelltod	2
1.2.1 1.2.1.1 1.2.3 1.2.4 1.2.4 1.2.4.1 1.2.4.2 1.2.4.3 1.2.4.4	Apoptose Extrinsischer Signalweg Intrinsischer Signalweg Bedeutung der Apoptose Antiapoptotische Signalwege Die Serin- / Threoninkinase Akt ERK mTOR (mammalian target of rapamycin) Die Proteinkinase C	4 5 6 7 10 10 11 12 13
1.3	Sphingolipide	14
1.3.1 1.3.2 1.3.3 1.3.4 1.3.5	Biosynthese und Metabolismus S1P-Rezeptoren S1P Agonisten und Antagonisten FTY720 Einfluss von FTY720 auf die Apoptose	14 17 19 19 22
1.4	Insulin	24
1.4.1 1.4.2	Der Insulinrezeptor und seine Signaltransduktion Funktionen des Insulins in der Haut	24 25
1.5	Migration von Zellen und Metastasierung	26
1.5.1	Der transformierende Wachstumsfaktor β	27
1.5.2 1.5.3 1.5.4 1.5.5	TGF-β und Krebs Estrogene Estrogenrezeptoren ERE-unabhängige Effekte	28 28 28 29
1.5.2 1.5.3 1.5.4 1.5.5 1.6	TGF-β und Krebs Estrogene Estrogenrezeptoren ERE-unabhängige Effekte Zielsetzung	28 28 28 29 30
1.5.2 1.5.3 1.5.4 1.5.5 1.6 2	TGF-β und Krebs Estrogene Estrogenrezeptoren ERE-unabhängige Effekte Zielsetzung MATERIAL UND METHODEN	28 28 29 30 32
1.5.2 1.5.3 1.5.4 1.5.5 1.6 2 2.1	TGF-β und Krebs Estrogene Estrogenrezeptoren ERE-unabhängige Effekte Zielsetzung MATERIAL UND METHODEN Materialien	28 28 29 30 32 33
1.5.2 1.5.3 1.5.4 1.5.5 1.6 2 2.1 2.1.1 2.1.2 2.1.3 2.1.3.1 2.1.3.2 2.1.3.3 2.1.3.4 2.1.3.5 2.1.3.6	TGF-β und Krebs Estrogene Estrogenrezeptoren ERE-unabhängige Effekte Zielsetzung MATERIAL UND METHODEN Materialien Geräte Reagenzien und Verbrauchsmaterialien Nährmedien und Lösungen Zellkulturmedien und Lösungen zur Zellkultur Lösungen zur Zellyse Lösungen zur Poteinbestimmung Lösungen für die Elektrophorese und Western-Blot-Analyse Lösungen für die FACS-Analyse Plasmide	28 28 29 30 32 33 33 34 37 37 40 40 40 41 42 43
1.5.2 1.5.3 1.5.4 1.5.5 1.6 2 2.1 2.1.1 2.1.2 2.1.3 2.1.3.1 2.1.3.2 2.1.3.3 2.1.3.4 2.1.3.5 2.1.3.6 2.2	TGF-β und Krebs Estrogene Estrogenrezeptoren ERE-unabhängige Effekte Zielsetzung MATERIAL UND METHODEN Materialien Geräte Reagenzien und Verbrauchsmaterialien Nährmedien und Lösungen Zellkulturmedien und Lösungen zur Zellkultur Lösungen zur Zellyse Lösungen zur Poteinbestimmung Lösungen für die Elektrophorese und Western-Blot-Analyse Lösungen für die FACS-Analyse Plasmide	28 28 29 30 32 33 33 34 37 37 40 40 40 41 42 43 43

2.2.1.1 2.2.1.2 2.2.1.3 2.2.1.4 2.2.1.5 2.2.1.6 2.2.1.7	Gewinnung und Kultivierung humaner Fibroblasten Gewinnung und Kultivierung muriner S1P ₃ -Knockout- und Wildtyp-Fibroblasten Gewinnung und Kultivierung humaner Keratinozyten Gewinnung und Kultivierung muriner Keratinozyten Passagierung Quantifizierung und Einsaat von Zellen für die Versuche Lagerung und Reaktivierung der Zellen	43 43 44 45 45 46 46
2.2.2 2.2.3	Lösungen der Testsubstanzen Reinigung von E2-BSA mittels Behandlung mit Dextran behandelter Aktivkohle	47 48
2.2.3 2.2.4 2.2.4.1 2.2.4.2	Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate Proteinanalytische Methoden Zelllyse Proteinbestimmung	48 50 50 50
2.2.4.3 2.2.4.4 2.2.5 2.2.5.1 2.2.5.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) Western Blot und Entwicklung Kultur von E. coli Plattenkultur Flüssigkultur	50 51 52 52 52
2.2.5.3 2.2.6 2.2.7 2.2.8	Lagerung und Reaktivierung von E. coli Herstellung kompetenter E. coli Transformation und Expression in E. coli Transfektion von MDA-MB-231 Zellen mit Plasmid	52 53 53 53 54
2.2.9 2.2.10 2.2.11 2.2.12	Transfektion von Fibroblasten und Keratinozyten mit siRNA Isolierung der RNA Synthese von cDNA Real-Time Polymerase Kettenreaktion	54 55 56 56
2.2.13 2.2.14 2.2.15 2.2.16 2.2.17	Gehaltsbestimmung von FTY720 Immunologische Färbung von MDA-MB-231 Zellen JC-1 Migration Statistik	58 59 60 60 61
3	ERGEBNISSE	62
3.1	Einfluss von FTY720 auf die Apoptose in humanen Fibroblasten	63
3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5	Zytotoxizität von FTY720 FTY720-P schützt Fibroblasten vor Apoptose Bildung von FTY720-Phosphat in Fibroblasten Beteiligung der Sphk2 Botoiligung von S1P-Pozontorsubtypon am antiapoptotischen Effekt von	63 64 66 67
0.1.0	FTY720-P	68
3.1.6 3.1.7 3.1.8 3.1.9 3.1.10 3.1.11 3.1.12	Beteiligung von G _{αi} -gekoppelten Rezeptoren Aktivierung von Akt in humanen Fibroblasten Aktivierung von Akt in S1P ₃ -Knockout-Fibroblasten Einfluss von FTY720 auf den MAPK-Signalweg Einfluss von FTY720 auf den mTOR-Signalweg Beteiligung von Stickstoffmonoxid Mitochondrielles Membranpotential	71 72 74 75 77 78 79
3.1.13	Aktivierung von Bcl-2 durch FTY720-P	81

3.2	Einfluss von FTY720 und S1P auf die Apoptose in humanen	
	Keratinozyten	83
3.2.1 3.2.2 3.2.3	Zytotoxizität von FTY720 FTY720-Phosphat schützt Keratinozyten vor Apoptose Einfluss des S1P ₃ -Rezeptorsubtyps auf den antiapoptotischen Effekt von	83 83
3.2.4 3.2.5 3.2.6	Mitochondrielles Membranpotential in Keratinozyten Bidirektionales Verhalten von S1P in Keratinozyten Beteiligung der Proteinkinase Cδ am apoptotischen Effekt von S1P	85 85 86 87
3.3	Einfluss von Estradiol und TGF- β auf die Migration von Brustkrebsze	ellen
		90
3.3.1 3.3.2 3.3.3 3.3.4 3.3.5	Expressionsmuster von Estradiol-sensitiven Rezeptoren Non-genomische Effekte von Estradiol Beteiligung $G_{\alpha i}$ -gekoppelter Rezeptoren Beteiligung des MAPK Signalwegs Transfektion und Lokalisierung von GPR30 in MDA-MB-231 Zellen	90 91 92 93 95
4	DISKUSSION	96
4.1	Einfluss von FTY720 auf die Apoptose von Fibroblasten	97
4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.4 4.1.5 4.1.6 4.1.7 4.1.8 4.1.9 4.1.10 4.1.11	Apoptotische Eigenschaften von FTY720 Antiapoptototische Eigenschaften von FTY720-P Einfluss der Konzentration und der Phosphorylierung Beteiligung von S1PR Der PI3K / Akt-Signalweg Der ERK-Signalweg Der mTOR-Signalweg Beteiligung von NO Beteiligung der Mitochondrien Einfluss von Bcl-2 Bedeutung und Ausblick	97 99 100 103 105 107 108 110 111 113 115
4.2	Einfluss von S1P und Insulin auf die Apoptose von Keratinozyten	116
4.2.1 4.2.2 4.2.3	Interaktion von S1P und Insulin in Keratinozyten Beteiligung der PKC Therapierelevanz und Ausblick	116 118 120
4.3	Die Migration von Brustkrebszellen	120
4.3.1 4.3.2 4.3.3 4.3.4 4.3.5	E2 und die Migration von Zellen TGF-β und der Einfluss auf die Migration Crosstalk zwischen TGF-β und E2 Beteiligung membranständiger Rezeptoren Bedeutung des Crosstalks und Ausblick	120 122 123 124 126

5 ZUSAMMENFASSUNG

5.1	Zusammenfassung	129
5.2	Abstract	132

ABC	ATP binding cassette
AIF	apoptosis inducing factor
ALK	activin receptor-like kinase
Apaf-1	apoptosis protease activating factor-1
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
ATP	Adenosintriphosphat
BAEC	bovine aortic endothelial cells
Bak	Bcl-2 antagonist killer protein
Bax	Bcl-2 associated x protein
Bcl	B-cell lymphoma
Bcl-xl	Bcl-2-like 1
BH-Domäne	Bcl-2-Homologie-Domäne
Bid	Bcl-2 interacting domain death agonist
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death
BMP	bone morphogenetic protein
bp	base pair
BPE	boviner Hypophysenextrakt
BSA	bovines Serumalbumin
CAD	caspase-activated DNase
iCAD	inhibitor of CAD
cAMP	cyclic adenosine mono phosphate
CDK	cyclin-dependent kinase
cDNA	copy deoxyribonucleic acid
СНО	Chinese hamster ovary
Co-Smad	kooperatives Smad
ct-FKS	mit Aktivkohle behandeltes FKS
Cyt c	Cytochrom C
d	Тад
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DD	death domain
DED	death effector domain
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
E1	Estron
E2	Estradiol
E3	Estriol
E2-BSA	an BSA konjugiertes Estradiol
ECM	extrazelluläre Matrix
Edg	endothelial differentiation gene
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ERα/β	Estrogenrezeptor α/β
ERE	estrogen response element
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FADD	Fas associated death domain
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
FMOC-CI	9-Fluorenylmethylchloroformiat
FSC	forward scatter
FTY720-P	FTY720-Phosphat
g	relative Zentrifugalbeschleunigung
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-protein-coupled receptor
grb	growth receptor bound
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HaCaT	human adult low calcium high temperature
HDL	high density lipoprotein
hEGF	human epidermal growth factor
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure
Her-2/neu	human epithelial growth factor receptor type 2/neu

HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HRP	horseradish peroxidise
HSP	Hitzeschockprotein
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
IGF	insulin-like growth factor
IGF-IR	IGF-I Rezeptor
lg	Immunglobulin
ΙκΒ	Inhibitor ĸB
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO Synthase
IR	Insulinrezeptor
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
I-Smad	inhibitory Smad
IUPHAR	International Union of Pharmacology
JC-1	5,5,6,6-Tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin-Iodid
JNK	c-jun-N-terminal kinase
KBM	Keratinozyten-Basalmedium
KGM	Keratinozyten-Wachstumsmedium
KO	Knockout
L-NAME	Nw-Nitro-L-argininmethylesterhydrochlorid
LPA	Lysophosphatidsäure
MAD	mother against decapentaplegic
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCF-7	Michigan cancer foundation -7
mdm2	murine double minute 2
MEK	mitogen activated protein kinase kinase
mER	membranständige ER
min	Minute
MMP	Matrixmetalloproteinase
MOMP	mitochondrial outer membrane permeabilization
mRNA	
	messenger ribonucieic acid
MS	messenger ribonucieic acid multiple Sklerose
MS NADPH	messenger ribonucieic acid multiple Sklerose Nicotinamidadenindinukleotiddiphosphat

nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
P-Akt	Phosphoryliertes Akt
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCD	Programmierter Zelltod
PCR	polymerase chain reaktion
PDGF	platelet-derived growth factor
PDK1	phosphoinositide-dependent kinase-1
PH-Domäne	Pleckstrin-homologe Domäne
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIP ₃	Phosphoinositol-3,4,5-trisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
РКС	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP2A	protein phosphatase 2A
PTEN	phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10
PTX	Pertussistoxin
PVDF	Polyvinyliden-difluorid
RNA	ribonucleic acid
RNAi	RNA Interferenz
R-Smad	receptor regulated Smad
RT	reverse Transkriptase
RTK	Rezeptortyrosinkinase
S	Sekunde
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidelektrophorese
SHC	SH2-containing protein
siRNA	small interfering RNA
Sma	small body size
SMC	Glattmuskelzellen

SphK	Sphingosinkinase
SSC	sideward scatter
TBS	Tris-buffered solution
TBST	Tween in TBS
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylenethylendiamin
TGF-β	transforming growth factor β
TNF	tumor necrosis factor
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
TNFR1	TNF-Rezeptor 1
TRADD	TNFR1 assoziiertes Todesdomänenprotein
Tris	Trishydroxymethylenaminomethan
TβR-I/II/III	TGF-β Rezeptor Typ I/II/III
u	units
VEGF	vascular endothelial growth factor
VSMC	vascular smooth muscle cells
Δψm	Transmembranäres mitochondrielles Potential

1.1 Die Entstehung von Tumoren

Normalerweise besteht der erwachsene Körper einer annähernd aus gleichbleibenden Zellzahl. Da jede Zelle nur eine begrenzte Lebensdauer besitzt, müssen sterbende Zellen ständig durch neue ersetzt werden. Gerät dieses Gleichgewicht aus den Fugen, kann dies schwerwiegende Folgen für den Organismus haben. Eine Fehlregulation des Zellwachstums kann die Entstehung von unphysiologischen Neubildungen eines Gewebes (Neoplasien) verursachen. Verdrängt die Neubildung umliegendes Gewebe spricht man von benignen Tumoren. Kommt es sogar zu einer Infiltration und Zerstörung des umliegenden Gewebes sowie zur Ausbildung von Metastasen, handelt es sich um maligne Tumoren, die auch als Krebs bezeichnet werden.

Auf molekularer Ebene existieren verschiedene Ursachen, warum eine Zelle zu unkontrollierter Teilung angeregt wird. Die wichtigsten hierbei sind Mutationen von verschiedenen Genen. Dabei können Onkogene derart verändert sein, dass sie ständig aktiv sind und die daraus vermehrt gebildeten Proteine die Zellteilung stimulieren. Tumor-Suppressor-Gene können in ihrer Funktion gehemmt sein, so dass durch sie ein unkontrolliertes Wachstum nicht mehr verhindert werden kann. Zusätzlich kann die Mutation von Reparatur-Genen deren Funktion verhindern. Als Folge davon kann die Proliferation von Zellen gesteigert und der programmierte Zelltod (PCD) gehemmt sein.

Bei malignen Tumoren ist das Auftreten von Metastasen charakteristisch. Dabei beschreibt der Vorgang der Metastasierung die Migration von Tumorzellen von ihrem Ursprungsgewebe in weiter entfernt liegende Gewebe, um dort neue Tochtergeschwülste zu bilden. Die Größe des Primärtumors ist dabei unerheblich für die Wahrscheinlichkeit der Metastasierung. Da maligne Tumore die zweithäufigste Todesursache in den Industrienationen darstellen, ist das genaue Verständnis der Prozesse des PCD sowie der Migration von großer Bedeutung.

1.2 Der programmierte Zelltod

Schon bei der mit einer Proliferation von Zellen einhergehenden Entwicklung eines mehrzelligen Organismus spielt der programmierte Zelltod eine große Rolle. Die

unkontrollierte Vermehrung von Geweben kann einem Organismus in seiner Morphogenese eher schaden als nutzen. Daher ist auch bei vollständig entwickelten Organismen die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Proliferation und Zelltod von immenser Bedeutung. Neben diesem Punkt ist der PCD auch für die Entfernung beschädigter oder entarteter Zellen verantwortlich. Ist die Funktion des PCD gestört, kann dies pathologische Veränderungen nach sich ziehen. Am wichtigsten dabei ist sicher die Entstehung maligner Erkrankungen. Im Laufe der vergangenen drei Jahrzehnte ist die Zahl der wissenschaftlichen Publikationen zu diesem Thema exponentiell angestiegen, was dessen Bedeutung für die Gesellschaft unterstreicht. Das Verständnis des Prozesses des PCD ist von großer Wichtigkeit, um beispielsweise neue Therapien gegen Malignome zu entwickeln.

Es gibt verschiedene Arten des PCD. Bis jetzt hat sich ein Modell etabliert, das den PCD aufgrund morphologischer Unterschiede in drei große Gruppen unterteilt: Apoptose, Nekrose und Autophagie (Sun and Peng 2009). Bei der Nekrose gehen dem Zelltod verschiedene Geschehnisse voraus. So kommt es zu einem Zellorganellen, wie dem Anschwellen unterschiedlicher endoplasmatischen Retikulum (ER), dem Golgi-Apparat und den Mitochondrien, sowie der Zelle selbst. Hinzu kommen ein Verlust der Membranintegrität und ein Abbau des Zellkerns. Dadurch werden zahlreiche Zytokine freigesetzt, die eine Immunreaktion des umliegenden Gewebes verursachen (Golstein and Kroemer 2007). Autophagie stellt einen Prozess dar, der hauptsächlich durch die Zelle ausgelöst wird, wenn weniger Nahrungsfaktoren zur Verfügung stehen. Es ist ein kataboler Prozess, der der Zelle z.B. freie Aminosäuren für die Synthese benötigter Proteine zur Verfügung stellt. Weiterhin wird die Autophagie durch eine Bildung von sogenannten Autophagosomen, intrazellulären Vesikeln mit Doppelmembran, charakterisiert. Die Autophagosomen fusionieren mit Lysosomen zu Autolysosomen, in denen abgetrennte Zellkomponenten verdaut werden (Noda et al. 2009). Als dritter und wichtigster Vertreter des PCD ist die Apoptose zu nennen. Da der Vorgang der Apoptose sehr komplex ist, soll dieser im nächsten Abschnitt genauer beschrieben werden.

1.2.1 Apoptose

Während der Entwicklung eines Organismus kommen der Apoptose verschiedenste Aufgaben zu. Sie ist notwendig, um Gewebestrukturen zu formen oder zu entfernen und die Zellzahl zu regulieren (Jacobson et al. 1997). Zusammen mit der Entfernung geschädigter und damit potentiell gefährlicher Zellen spielt die Apoptose während des gesamten Lebenszyklus eine entscheidende Rolle (Lawen 2003). Der Apoptose wurde sehr große Aufmerksamkeit zuteil, seit bekannt wurde, dass sie an vielen pathologischen Veränderungen beteiligt ist. Eine verstärkte Apoptose wurde in (neuro)degenerativen Krankheiten, wie z.B. Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson, beobachtet. Eine verringerte Apoptose ist bei Krebs oder Autoimmunerkrankungen zu finden (Sun and Peng 2009). Der Begriff der Apoptose wurde von einer schottischen Forschergruppe geprägt, da er eine Beschreibung der morphologischen Veränderungen einer Zelle widerspiegelt. Das Wort stammt aus dem Griechischen und bedeutet so viel wie das Abfallen (,apoptosis') von Blättern von Bäumen oder Blumen. Der Prozess der Apoptose einer Zelle ist durch eine Vielzahl von Vorgängen charakterisiert. So kommt es zunächst zu einem Abrunden der Zellen und zu einer starken Volumenverkleinerung. Darauf folgen die Kondensation des Chromatins und die Fragmentierung der nukleären DNA. Abschließend schnürt die Plasmamembran Vesikel ("Blebbing") ab. Dabei bleibt die Membran fast bis zum Schluss intakt. was das Ausbleiben von Entzündungsreaktionen erklärt. Die abgeschnürten Vesikel ("apoptotic bodies" genannt) werden dann von umliegenden gesunden Zellen oder Phagozyten aufgenommen und abgebaut (Kerr et al. 1972).

Das Auslösen der Apoptose läuft nicht zufällig ab, sondern unterliegt einer strengen Regulation. So wurden im Wurm Caenorhabditis elegans Gene entdeckt, die ausschließlich den Tod bestimmter Zellen beeinflussen (Ellis and Horvitz 1986). Homologien dieser Gene wurden in Säugetieren identifiziert (Yuan et al. 1993), so dass von einem "Suizidprogramm' in menschlichen Zellen ausgegangen werden kann. Verschiedene Stimuli wurden entdeckt, die in der Lage sind, den Prozess der Apoptose auszulösen. Man unterscheidet zwei Wege, auf denen die Zelle das Programm der Apoptose ablaufen lässt. Zum einen spricht man vom Rezeptorvermittelten oder auch extrinsischen Signalweg. Zum anderen ist der intrinsische Signalweg beschrieben worden, in dem den Mitochondrien eine große Bedeutung zukommt.

1.2.1.1 Extrinsischer Signalweg

Ob in einer Zelle die Signalkaskade der Apoptose aktiviert wird, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Die Aktivierung des extrinsischen Signalweges erfolgt nach Bindung von bestimmten Proteinen an zugehörige "Todesrezeptoren.' Zu diesen Liganden zählen TNF- α (tumor necrosis factor- α), FasL (Fas-Ligand) und TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), die an ihre Rezeptoren der TNF-Superfamilie, TNFR1 (tumor necrosis factor receptor 1), Fas (CD95) und die DR-Familie (death receptor), binden. Den Todesrezeptoren ist eine ca. 80 Aminosäuren große zytosolische Domäne gemein. Diese ist essentiell für das Auslösen von Todessignalen und wird aus diesem Grund Todesdomäne (death domain, DD) genannt. Nach Bindung des Liganden an extrazelluläre cysteinreiche Domänen kommt es zu einer Homotrimerisierung des Rezeptors und anschließender Rekrutierung spezifischer intrazellulärer Adapter-Proteine. Der TNF Rezeptor interagiert mit dem Adapter-Protein TRADD (TNFR-associated death domain), während FADD (Fas associated death domain) das Adapter-Protein für Fas darstellt. FADD besitzt neben seiner DD am N-terminalen Ende eine weitere wichtige Domäne, die DED (death effector domain). Diese Domäne wird für die Bindung einer bedeutenden Gruppe von Proteinen benötigt, den Caspasen (Aspartat-spezifische Cysteinyl-Protease). Von der großen Gruppe der Caspasen wird im nächsten Schritt die Initiator-Caspase 8 rekrutiert und bildet daraufhin mit FADD den "death inducing signalling complex" (DISC). Nachdem sich der Komplex gebildet hat, kommt es zur autolytischen Spaltung der Caspase 8 in ein aktives Heterotetramer. Dieses Spaltprodukt ist in der Lage, die Effektor-Caspase 3 zu aktivieren, welche ihrerseits ICAD (inhibitor of CAD) von CAD (caspase-activated DNase) abspaltet und somit die active Endonuclease CAD freisetzt. Darüber hinaus spaltet die Caspase 3 das Protein ROCKI (Rho-associated coiled coil forming kinase I), was zum oben beschriebenen Phänomen des Blebbing führt. Wird die gesamte Signalkaskade aktiviert, resultiert daraus der Zelltod. Neben der Aktivierung der Effektor-Caspasen besitzt die aktivierte Caspase 8 eine weitere Funktion. Sie spaltet Bid (Bcl-2interacting domain death agonist) zu tBid (truncated Bid), ein Protein der Bcl-2 (B-Cell Lymphoma) Familie (Li et al. 1998; Luo et al. 1998). Dessen Interaktion mit zwei weiteren Proteinen dieser Familie, Bax und Bak, führt dann unter Beteiligung der Mitochondrien zur Apoptose.

1.2.1.2 Intrinsischer Signalweg

Der intrinsische Signalweg der Apoptose kann durch verschiedene Stimuli ausgelöst werden. Die wichtigsten hierbei sind Strahlung, oxidativer Stress oder zytotoxische Stoffe sowie das eben erwähnte tBid. Wird eine Zelle diesen Noxen ausgesetzt, werden die Mitochondrien geschädigt, was eine Freisetzung von Cytochrom c (Cyt c) ins Zytoplasma zur Folge hat. Cyt c ist normalerweise an der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und ist für den Elektronentransport zuständig. Nachdem Cyt c in das Plasma transloziert ist, bildet es zusammen mit Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) in Gegenwart von ATP ein Heptamer, das die Caspase 9 rekrutiert und so ein als Apoptosom bezeichneter Komplex entsteht. Das Apoptosom aktiviert nun seinerseits die Initiator-Caspase 9, die wiederum die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 aktiviert (Riedl and Salvesen 2007). Als Konsequenz stehen wieder der Abbau zellulärer Bestandteile und der Zelltod.

Der schon kurz erwähnten Gruppe der Proteine der Bcl-2 Familie kommt eine wichtige Aufgabe zu. Sie reguliert die Freisetzung des Cyt c aus den Mitochondrien. Die Familie wird durch eine Bcl-2 Homologie (BH)-Domäne charakterisiert, die alle Mitglieder besitzen und die eine Heterodimerisierung untereinander ermöglicht. Zurzeit können drei Gruppen der Familie unterschieden werden (Chittenden et al. 1995). Die erste Gruppe stellen die antiapoptotischen Proteine, hauptsächlich Bcl-2 und Bcl-XL, dar. Sie besitzen vier Domänen (BH1 – BH4). Zur zweiten Gruppe gehören die proapoptotischen Proteine Bax und Bak, die nur die Domänen BH1 -BH3 besitzen. Zur dritten Gruppe zählt man die sogenannten BH3-only Proteine, die ausschließlich diese Domäne besitzen und proapoptotische Effekte vermitteln (Bad, Bik, Bid, Bim) (Youle and Strasser 2008). Die Proteine Bax und Bak wirken apoptotisch, weil sie nach Aktivierung durch tBid Homooligomere bilden und als diese Poren in der Mitochondrienmembran formen. Dadurch kommt es zu einer Permeabilisierung der Membran [Mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP)], was zur Freisetzung von Proteinen, wie Cyt c, Apoptose-induzierender Faktor (AIF) oder Smac, in das Zytoplasma führt (Wei et al. 2001). Mit der Bildung der permeablen Pore in der Mitochondrienmembran ist ein Abfall oder sogar ein Zusammenbruch völliger des transmembranären, mitochondriellen Membranpotentials $\Delta \psi_m$ verbunden (Ly et al. 2003). Antiapoptotische Proteine, wie Bcl-2 oder Bcl-XL hingegen sind in der Lage, proapoptotische Bcl-2 Familien-Proteine zu binden und damit deren Funktion zu unterdrücken (Wang 2001). Bcl-2 ist

außerdem ein potenter Stabilisator des $\Delta \psi_m$ (Shimizu et al. 1996). Ob in einer Zelle der Prozess der Apoptose abläuft, hängt also stark von einem Gleichgewicht zwischen proapoptotischen und antiapoptotischen Bcl-2 Proteinen ab (Korsmeyer 1995). Liegt das Gleichgewicht auf der Seite des Bcl-2, wird die Apoptose unterdrückt, was unkontrolliertes Wachstum von Gewebe zur Folge haben kann. So wurde ursprünglich in Maus-Modellen gezeigt, dass eine vermehrte Bildung von Bcl-2 mit einer erhöhten Neigung zur Ausbildung von Tumoren einhergeht (Strasser et al. 1990; Jager et al. 1997).



Abb. 1: Signalwege der Apoptose

1.2.3 Bedeutung der Apoptose

Eine korrekte Entwicklung des Organismus und die Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase sind ohne die Apoptose nicht möglich. Würde keine Gegenregulation zur Mitose existieren, besäße ein 80-jähriger Mann 2 Tonnen

Knochenmark und Lymphknoten sowie einen 16 km langen Darm (Melino 2001). Der physiologische Nutzen ist unumstritten. Daher ist es nur allzu gut verständlich, dass Veränderungen im Prozess der Apoptose, seien es nur wenige Zellen oder ganze Gewebe, gravierende Folgen haben können. Die Entstehung von malignen Erkrankungen konnte klar mit einer verminderten Apoptoserate in Verbindung gebracht werden. Im Zuge der Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen wurden zwei wichtige Faktoren entdeckt: das Protoonkogen MYC und das Tumorsuppressorprotein p53 (Kerr et al. 1994). Da in 50% aller Tumoren eine Mutation von p53 zu finden ist, erklärt dies das große Interesse für die Wissenschaft auch im Hinblick auf die Entwicklung neuer Möglichkeiten zur Therapie onkologischer Erkrankungen. Mutationen von p53 und eine damit verbundene Entstehung von Krebs konnten beispielsweise in der Haut und der Brust dokumentiert werden (Bergh 1999; Benjamin et al. 2008). Die eigentliche Aufgabe von p53 besteht darin, bei Schädigung der DNA der Zelle diese entweder im G1-Zustand zu halten, um eine Reparatur zu ermöglichen, oder bei irreversiblen Schäden, Apoptose in dieser Zelle auszulösen (Lane 1992; Oren 1992). Neben den beiden genannten Faktoren wurde eine Vielzahl weiterer Proteine identifiziert, die an der Entstehung maligner Erkrankungen beteiligt sein können. So konnte gezeigt werden, dass ERK (extracellular regulated kinase), Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) / Akt, mTOR (mammalian target of rapamycin) und die Familie der Proteinkinase C (PKC) eine wichtige Rolle spielen können.

Darüber hinaus sind Zellen bekannt, die noch wichtige Funktionen ausüben, obwohl sie als ,tot' bezeichnen kann. Dazu gehören die Erythrozyten und die Keratinozyten (Kroemer et al. 2005). Das physiologische Programm der Apoptose für die Keratinozyten resultiert nicht in einem kompletten Verlust dieser Zellen. Stattdessen werden daraus die Korneozyten, auch terminal differenzierte Keratinozyten genannt, die das Stratum Corneum der Haut bilden (McCall and Cohen 1991; Lippens et al. 2005). Da die Keratinozyten aufgrund ihrer Lokalisation dem UV-Licht ausgesetzt sind, können sie durch dieses geschädigt werden und Apoptose auslösen (sunburn cells). Zusätzlich wurde berichtet, dass UV-Exposition Keratinozyten veranlasst, TNF- α zu produzieren, welches auto- oder parakrin Apoptose auszulösen vermag (Kock et al. 1990). Interessanterweise wurden auch in der Psoriasis, einer benignen hyperproliferativen Erkrankung, erhöhte Spiegel von TNF- α gefunden. Dies ist verwunderlich, da neben der gesteigerten Proliferation der Keratinozyten, diese auch

weniger Apoptose unterlaufen (Laporte et al. 2000). Denkbar ist also eine gesteigerte Resistenz gegenüber TNF-a-induzierter Apoptose. Die verminderte Apoptoserate in psoriatischen Läsionen korreliert mit verminderten Konzentrationen der Caspase 14 (Lippens et al. 2000), einer Caspase, die ausschließlich in Keratinozyten exprimiert wird (Nicotera and Melino 2007). Darüber hinaus ist eine Beteiligung von Interleukin 15, p53, Survivin und Bcl-XL gezeigt worden (Raj et al. 2006). Auch in der Entstehung von Hautkrebs spielen p53, Bcl-2, Bcl-XL und Survivin eine Rolle durch eine verringerte Apoptoseneigung (Eberle et al. 2007). Interessant ist in diesem Zusammenhang ebenso eine Beeinflussung der verschiedenen Hautzellen untereinander. So wird die Invasivität von Melanomzellen durch Matrixmetalloproteinase 1 (MMP-1) produzierende Fibroblasten gesteigert (Wandel et al. 2002).

Fibroblasten sind ebenfalls an der Pathogenese einiger anderer Erkrankungen der Haut beteiligt. Dazu gehören die Sklerodermie, Keloide und hypertrophe Narben. Die Ätiologie der Sklerodermie (auch Systemische Sklerose bei Organbefall) ist unbekannt. Charakterisiert ist diese Krankheit durch Fibrose von Bindegewebe, Entzündungsreaktion und Schädigung von Blutgefäßen. Auch hierbei kommt den Fibroblasten eine Bedeutung zu. So sind Fibroblasten, die aus Sklerodermie-Patienten isoliert wurden, resistent gegen verschiedene zytotoxische Stimuli (Jelaska and Korn 2000; Santiago et al. 2001). Außerdem wurden in entsprechenden Läsionen keine apoptotischen Fibroblasten gefunden. Ein Grund dafür ist eine Hochregulation von Bcl-2, während gleichzeitig weniger Bax exprimiert wird sowie eine starke Aktivierung von Akt (Yamamoto 2009).

Auch der Prozess der Wundheilung unterliegt einer feinen Regulation. Ist diese gestört, kann es zu pathologischen Veränderungen kommen. Keloide sind benigne dermale Tumore, die durch eine Hyperproliferation von Fibroblasten, Überproduktion der extrazellulären Matrix (ECM), Invasivität über die ursprünglichen Grenzen hinaus und Wiederauftreten gekennzeichnet sind (Tredget et al. 1997). Damit einher geht ebenfalls verminderte Empfänglichkeit Fibroblasten eine von gegenüber apoptotischer Stimuli durch eine Überexpression des Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I) Rezeptor (Ishihara et al. 2000). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass aus Keloiden gewonnene Keratinozyten eine höhere Proliferationsrate und geringere Apoptose in Fibroblasten vermitteln (Funayama et al. 2003), was das Zusammenspiel dieser wichtigen Hautzellen verdeutlicht. Im Unterschied zu Keloiden

sind hypertrophe Narben auf das ursprüngliche Wundgebiet begrenzt und durch eine überschießende Produktion der ECM gekennzeichnet. Auch hier wurde berichtet, dass Keratinozyten einen Einfluss auf Fibroblasten und Myofibroblasten haben (Bellemare et al. 2005). Ein größeres Verständnis der Apoptose in Fibroblasten und Keratinozyten ist somit von großer therapeutischer Bedeutsamkeit.

1.2.4 Antiapoptotische Signalwege

1.2.4.1 Die Serin- / Threoninkinase Akt

So wie es viele Signalwege gibt, die nach Aktivierung den Tod der Zelle einläuten, existiert eine Vielzahl von Signalkaskaden, die das Gegenteil bewirken. Dies wurde schon am Beispiel der Bcl-2 Familienproteine deutlich gemacht. Im Folgenden sollen nun weitere Proteine mit antiapoptotischer Funktion vorgestellt werden.

Der wahrscheinlich wichtigste Signalweg in diesem Zusammenhang ist der PI3K / Akt-Signalweg. Verdeutlicht wird dies durch die stärkste Veränderung im Tumorgewebe im Vergleich zu anderen Signalwegen. Die Veränderungen beinhalten Mutation, Basentausch und verstärkte Expression des Gens, was eine Aktivierung der Signalkaskade zur Folge hat. Die Konsequenzen, die sich daraus ergeben, sind unkontrolliertes Wachstum eines Gewebes, eine gesteigerte Metastatisierung und eine erhöhte Therapieresistenz.

Die drei wichtigsten Aufgaben der aktivierten Proteinkinase Akt (Proteinkinase B) sind die Verhinderung des Zelltods, die Stimulation der Proliferation und die Vergrößerung des Zellvolumens. Es existieren drei Isoformen, die mit Akt1 (PKBα), Akt2 (PKBβ) und Akt3 (PKBγ) bezeichnet werden. Sie zeichnen sich durch eine große Sequenzhomologie und einen gleichen strukturellen Aufbau aus. Allen Isoformen ist eine Pleckstrin homologe (PH) Domäne am N-terminalen Ende gleich, die mit Lipiden der Membran interagieren kann, gefolgt von einer katalytischen Domäne und einer regulatorischen Domäne am C-Terminus (Kandel and Hay 1999). Akt wird durch zwei Mechanismen aktiviert: Zuerst erfolgt die Rekrutierung zur Plasmamembran und anschließend kommt es zu einer Phosphorylierung an zwei Aminosäuren des Proteins, Threonin³⁰⁸ und Serin²⁷³. Die Rekrutierung erfolgt durch die Bindung von PIP₃ (Phosphoinositol-3,4,5-trisphosphat) an die PH Domäne. Die Bildung des second Messengers PIP₃ aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat wird durch die aktivierte PI3K katalysiert. Damit die vollständige Aktivierung erfolgen kann,

wird eine weitere Kinase benötigt. Dazu wird PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase) aufgrund seiner ebenfalls vorhandenen PH Domäne zur Membran rekrutiert. Die PDK1 phosphoryliert nun Akt an Thr³⁰⁸, was notwendig und ausreichend für eine Aktivierung von Akt ist (Alessi et al. 1997). Allerdings wird eine maximale Aktivierung erst durch Phosphorylierung an Ser²⁷³ durch die PDK2 erreicht. Die PDK2 ist kein Homologes zur PDK1 und seine eigentliche Beschaffenheit ist weiterhin unklar (Hennessy et al. 2005). Der hier dargestellte Verlauf der Aktivierung stellt den hauptsächlichen Weg dar. Es sind aber auch alternative Wege für die Aktivierung von Akt beschrieben worden. Demnach kann eine PI3K-unabhängige Aktivierung durch die Proteinkinase A, durch die Ca²⁺- / Calmodulin-abhängige Kinase oder durch Assoziation mit dem Hitzeschockprotein 27 (HSP27) stattfinden (Konishi et al. 1997; Filippa et al. 1999; Perez-Garcia et al. 2004).

Die Regulation der Apoptose durch Akt kann auf direktem oder indirektem Weg erfolgen. Zum einen ist Akt in der Lage, Bad an Ser¹³⁶ zu phosphorylieren. Diese Phosphorylierung hindert Bad daran, mit Bcl-XL einen Komplex einzugehen. Dadurch kann Bcl-XL wieder seine antiapoptotischen Effekte ausüben. Eine weitere Möglichkeit von Akt besteht in der Phosphorylierung der Caspase 9. Diese wird dadurch ebenfalls in ihrer Funktion gehemmt und die Zelle vor dem Tod geschützt. Die Wege beschreiben eine Beeinflussung indirekten verschiedener Tranksriptionsfaktoren, wie z.B. NFkB und p53. Die antiapoptotischen Eigenschaften von NFkB können durch Akt positiv beeinflusst werden, indem es die IkB Kinase (IKK) aktiviert. Diese wiederum ist dann in der Lage, den NFkB Inhibitor IkB abzubauen. Die proapoptotische Funktion des Tumorsuppressors p53 kann durch Phosphorylierung und Aktivierung von MDM2 (murine double minute 2) gehemmt werden, da MDM2 den Abbau von p53 katalysiert (Vivanco and Sawyers 2002).

1.2.4.2 ERK

Neben der Proteinkinase Akt spielt die extrazellulär Signal-regulierte Kinase (ERK) eine wichtige Rolle in der Regulation verschiedener zellulärer Mechanismen. Dazu zählen unter anderem die Regulation der Proliferation, der Apoptose, der Migration und der Differenzierung.

ERK1/2 sind zwei Isoformen von ERK, die der Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) angehören. Diese Familie beinhaltet neben ERK1/2 die c-Jun-NH₂-terminale Kinasen (JNK), die p38 MAP Kinasen und ERK5. Die

Aktivierung erfolgt über eine Kaskade an Phosphorylierungen, die an der Zellmembran seinen Ursprung hat. Nach erfolgter Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen (RTK) kommt es zu einer Aktivierung von Ras unter Beteiligung von membrangebundenen GTP (Avruch et al. 1994). Eine der Raf Kinasen (a-, b-, c-Raf) erkennt diesen Komplex und wird nach Bindung an diesen aktiviert. Raf seinerseits phosphoryliert zwei Serinstellen der MAPK Kinasen 1 und 2 (MEK1/2), die wiederum ihrerseits ERK1/2 durch doppelte Phosphorylierung an Threonin- und Tyrosinstellen aktivieren. Nun können die aktivierten ERK durch Phosphorylierung verschiedener Zielproteine zahlreiche zelluläre Funktionen anstoßen. Dazu gehören die Phosphorylierung der nukleären Transkriptionsfaktoren c-Jun und c-Myc sowie Bad an Ser¹¹² und Bim an Ser⁶⁹ (Avruch 2007). Das Resultat ist eine verstärkte Hemmung der Apoptose. Darüber hinaus ist eine indirekte Aktivierung von NFkB und eine Phosphorylierung der Caspase 9 vergleichbar mit der Akt-vermittelten Wirkung beobachtet worden (McCubrey et al. 2007). Die Aktivierung von Proteinen im Zellkern setzt eine Translokalisation von ERK voraus. Neben dem Zurückhalten von ERK im Zellplasma können auch verschiedene Phosphatasen die Wirkung von ERK physiologisch hemmen und stellen somit einen internen Kontrollmechanismus dar (Ramos 2008). Da in vielen humanen Tumorarten eine erhöhte Aktivierung des Ras / Raf / MEK / ERK-Signalweges gemessen wurde, stellt auch diese Signalkaskade ein wichtiges Target für potentielle antitumorale Arzneistoffe dar (Fransen et al. 2004; Kornblau et al. 2006).

1.2.4.3 mTOR (mammalian target of rapamycin)

Als weiterer wichtiger Vertreter von Signalwegen, die das Vermehren und Überleben von Zellen regulieren, ist der mTOR-Signalweg zu nennen. Auch von mTOR ist eine gesteigerte Aktivität in verschiedenen Tumorarten gezeigt worden (Hidalgo and Rowinsky 2000; Sekulic et al. 2000). Speziell in den Bereichen der Angiogenese und der Autophagie kommt mTOR eine große Bedeutung zu (Memmott and Dennis 2009).

Der Name mTOR wurde für das Zielprotein des Immunsuppressivums Rapamycin (Sirolimus) entwickelt. Zusätzlich zeigte das nach Nierentransplantation eingesetzte Rapamycin antiproliferative Eigenschaften, was seinen Einsatz in der Tumortherapie denkbar machte. Die Serin- / Threoninkinase mTOR tritt in zwei Komplexen auf, mTORC1 und mTORC2. Der durch Rapamycin hemmbare Komplex mTORC1

besteht aus mTOR, Raptor, mLST8 und PRAS40. Dieser Komplex ist dann in der Lage, p70S6K (p70 ribosomal protein S6 kinase) zu aktivieren und 4E-BP1 (eIF4E binding protein 1) zu inhibieren, was eine gesteigerte Proteinsynthese und Zellwachstum nach sich zieht. mTORC2 besteht aus mTOR, Rictor, Sin1 und mLST8. Die zelluläre Aufgabe von mTORC2 ist noch nicht vollständig geklärt, allerdings wird ein positiver Feedback-Mechanismus für die mTOR Aktivierung diskutiert (Memmott and Dennis 2009).

Die Regulation von mTOR kann in zwei Kategorien aufgeteilt werden: Akt-abhängige und Akt-unabhängige Regulation. Akt kann mTORC1 direkt durch eine Phosphorylierung von PRAS40 aktivieren. Eine indirekte Aktivierung erfolgt über eine Hemmung von TSC2 (tuberous sclerosis complex 2). Die eigentliche Aufgabe von TSC2 ist die Hemmung der GTPase Rheb, die einen selektiven Aktivator von mTORC1 darstellt. Demzufolge kann Akt die hemmende Wirkung von TSC2 aufheben (Garami et al. 2003).

Zu den Akt-unabhängigen Wegen gehören die Aktivierung durch den Raf / MEK / ERK-Signalweg, freie Aminosäuren und die Lipidsignalkaskade der Phospholipase D / Phosphatidsäure. Eine Hemmung von mTOR ist bei Energieabfall in der Zelle unter der Beteiligung von AMPK (AMP-activated protein kinase) und durch hypoxische Zustände zu finden (Memmott and Dennis 2009).

1.2.4.4 Die Proteinkinase C

Die Proteinkinase C (PKC) stellt eine weitere wichtige Familie von Serin- / Threoninkinasen dar, die an diversen zellulären Vorgängen beteiligt ist. Je nach Isoform haben die Mitglieder Einfluss auf die Proliferation, Differenzierung und die Apoptose in Zellen (Blobe et al. 1994). Die Familie der PKC besteht aus 12 Isoenzymen, die eine regulatorische Einheit am N-terminalen Ende und eine katalytische Einheit am C-terminalen Ende besitzen und in drei Gruppen unterteilt werden (Nishizuka 1988). Zu den klassischen Vertretern, die durch Diacylglycerol (DAG) Ca²⁺-abhängig aktiviert werden, zählen die PKC α , PKC β I, PCK β II und PKC γ . Die Gruppe der neuen PKC umschließt die PKC δ , PKC ϵ , PKC η , PKC θ und PKC μ . Diese werden Ca²⁺-unabhängig durch DAG aktiviert. Die letzte Gruppe bilden die atypischen PKC, die Ca²⁺- und DAG-unabhängig wirken (PKC ζ , PKC λ , PKCi) (Dempsey et al. 2000). Die verschiedenen Isoformen treten in verschiedenen Expressionsraten und Lokalisationen in verschiedenen Zellen auf. Das erklärt die

teils gegensätzlichen Wirkungen. So werden z.B. den Isoformen α und β II zellschützende Effekte zugeschrieben (Goss et al. 1994; Lee et al. 1996), während die PKC δ je nach Zelltyp mit apoptotischen oder antiapoptotischen Effekten in Zusammenhang gebracht wird (Cross et al. 2000; Wert and Palfrey 2000; Mandil et al. 2001).

Auch in der Haut übernehmen die Isoformen der PKC wichtige Aufgaben. Die PKCα ist an der Differenzierung der epidermalen Zellen entscheidend beteiligt (Matsui et al. 1992; Breitkreutz et al. 2007). Zusätzlich konnte für die PKCα gezeigt werden, dass sie die Proliferation von Keratinozyten zu hemmen vermag. In diesem Zusammenhang wurden weitere Isoformen identifiziert. So hemmt die PKCδ gleichzeitig die Proliferation und wirkt apoptotisch. Ein zelltoxisches Verhalten der PKCε wurde ebenfalls bewiesen (Li et al. 2006; Schuppel et al. 2008; Jerome-Morais et al. 2009). Dies unterstreicht die vielfältigen Eigenschaften der PKC je nach Isoform und Zelltyp.

1.3 Sphingolipide

1.3.1 Biosynthese und Metabolismus

Sphingolipide sind zusammen mit Glycerol und Glycerophospholipiden Bestandteil jeder eukariotischen Lipiddoppelmembran und tragen somit zur Stabilität und Flexibilität der Zelle bei. Neben ihrer Funktion für die Membranintegrität ist allerdings festgestellt worden, dass einige dieser Lipide bioaktive Moleküle darstellen, die an verschiedensten zellulären Prozessen beteiligt sein können. Der prominenteste Vertreter Sphingosin-1-Phosphat (S1P) reguliert beispielsweise die Proliferation, die Migration, die Apoptose, die intrazelluläre Ca²⁺-Freisetung oder die Differenzierung (Spiegel and Milstien 2003). Wie bei vielen anderen intrazellulären Botenstoffen unterliegt die Konzentration von S1P einer strengen Regulation. So katalysiert das Enzym Sphingosinkinase (SphK) die Umwandlung von Sphingosin zu S1P (Alemany et al. 2007). Von der SphK konnten zwei Isoformen identifiziert werden: SphK1 und SphK2. Beide vermitteln die Bindung einer Phosphatgruppe an die primäre OH-Gruppe des Sphingosins. Die Kinasen unterscheiden sich nur gering in ihrer Sequenz, zeigen aber durch unterschiedliche Kinetiken, Expressionsraten und Lokalisationen abweichende Eigenschaften. Die SphK1 zeigt eine Präferenz für D-erythro-Sphingosin und D-erythro-Dihydrosphingosin, während die SphK2 auch

Phytosphingosin und *DL-threo*-Dihydrosphingosin phosphoryliert. Obwohl S1P durch beide Kinasen gebildet werden kann und dadurch zellprotektive Mechanismen angestoßen werden, ist für die SphK2 selbst ein apoptotischer Einfluss nachgewiesen worden. Dies wird vor allem auf seine vorhandene BH3-Domäne zurückgeführt. Damit ist eine Ähnlichkeit zu proapoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie gegeben, die sich auch in einer Hemmung von Bcl-XL durch die SphK2 manifestiert (Liu et al. 2003).

Damit ausreichend Sphingosin für die Bildung von S1P zur Verfügung steht, kann Sphingosin entweder durch de-novo-Synthese oder durch Abbau von Membranlipiden gewonnen werden. Der erste Schritt der Neusynthese ist die Konjugation von Serin und Palmitin-CoenzymA, vermittelt durch die Serinpalmitoyltransferase (Hannun et al. 2001). Das entstandene Produkt 3-Ketosphinganin wird dann zu Sphinganin (Dihydrosphingosin) reduziert. Die Dihydroceramidsynthase katalysiert im nächsten Schritt die Bildung von Dihydroceramiden durch den Anbau einer weiteren Fettsäure. Daraufhin erfolgt der Einbau einer Doppelbindung durch die Dihydroceramiddesaturase. Das so entstandene Ceramid kann durch die Ceramidase in Sphingosin umgewandelt werden. Ceramide stellen zentrale Moleküle für die Synthese vieler weiterer bioaktiver Stoffe dar. So können aus Ceramiden durch unterschiedliche Enzyme katalysiert Glykosphingolipide, Ceramid-1-Phosphat oder Sphingomyelin entstehen. Da alle diese Reaktionen einem Gleichgewicht unterliegen, können Sphingosin (durch den Abbau von Ceramiden durch die Ceramidase) bzw. Ceramide (durch Abbau von Sphingomyelin durch die Sphingomyelinasen) gebildet werden (Merrill 2002).

Der Abbau von S1P kann auf zwei Wegen erfolgen. Zum einen kann die Phosphatgruppe reversibel durch S1P-Phosphatasen (SPP1 und SPP2) abgespalten werden und es entsteht wieder Sphingosin. Oder es erfolgt ein irreversibler Abbau unter Beteiligung der S1P-Lyase zu Hexadecenal und Phosphoethanolamin (Saba and Hla 2004).

Für Ceramide und Sphingosin wurden hauptsächlich apoptotische Effekte beschrieben, während S1P mitogene und zellprotektive Eigenschaften besitzt. Aus dem vorher geschilderten Biosyntheseweg ist ersichtlich, dass eine Verschiebung des Gleichgewichts für die Zelle enorme Folgen haben kann. Man spricht in diesem Zusammenhang auch vom Sphingolipid-Rheostat.

Im menschlichen Körper lassen sich relativ hohe S1P Konzentrationen im Blut messen. Daher wurden als Hauptbildungsort für S1P hämatopoetische Zellen angenommen. Tatsächlich wurden die Blutplättchen als Bildungsort identifiziert. Diese speichern S1P und sind in der Lage, dieses nach Stimulation freizusetzen. Zudem exprimieren sie die SphK1 in großem Ausmaß und lassen das Vorhandensein der S1P-Lyase vermissen (Yatomi et al. 1997; Yatomi 2008). Da man allerdings auch in Abwesenheit von Plättchen S1P im Blut nachweisen konnte, musste es also auch alternative Bildungsorte geben. Als solche wurden Endothelzellen und Erythrozyten identifiziert. Letztere besitzen zwar eine geringere Aktivität der SphK, aber ihnen fehlen mit der S1P-Lyase und der S1P-Phosphatase sogar beide S1P degradierende Enzyme. Aufgrund der Überzahl der Erythrozyten im zu den Thrombozyten scheinen die roten Blutkörperchen Veraleich den Hauptbildungsort darzustellen (Ito et al. 2007; Pappu et al. 2007; Jessup 2008). Um die Lymphknoten verlassen zu können, müssen Lymphozyten auf in der Lymphe vorhandenes S1P reagieren können. Interessanterweise stammt das in der Lymphe gefundene S1P nicht aus hämatopoetischen Zellen sondern aus Endothelzellen. Es scheint kein Austausch von S1P zwischen diesen beiden Kompartimenten zu bestehen (Pappu et al. 2007).

Da S1P intrazellulär gebildet wird, stellte sich die Frage, wie dieses aus der Zelle gelangen kann. Mit der polaren Phosphatgruppe besitzt S1P ein Strukturmerkmal, das eine Diffusion aus der Zelle sehr unwahrscheinlich macht. Studien zum Transport von S1P offenbarten tatsächlich, dass das Ausschleusen von S1P unter Beteiligung von ABC-Transportern (**A**TP **b**inding **c**assette) erfolgt (Kobayashi et al. 2006; Sato et al. 2007; Kobayashi et al. 2009; Nieuwenhuis et al. 2009). Im Blut selbst liegt S1P hauptsächlich an HDL (high density lipoprotein) gebunden vor und kann somit zu den positiven Effekten des HDL beitragen (Nofer et al. 2004).



Abb. 2: Synthese und Abbau von S1P

1.3.2 S1P-Rezeptoren

Obwohl von S1P intrazelluläre Wirkungen bekannt sind (Goetzl et al. 2007), werden seine Effekte hauptsächlich über membranständige Rezeptoren vermittelt. Als der erste Vertreter dieser G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) wurde Edg-1 (endothelial differentiation gene) entdeckt. Er ist als Mitglied der edg-Genfamilie in der Lage, die Differenzierung von Endothelzellen zu stimulieren (Hla and Maciag 1990). Im Laufe der Zeit wurden mehr und mehr Mitglieder identifiziert. Mit der Entdeckung von S1P als physiologischer Ligand änderte sich die Bezeichnung in S1P-Rezeptoren (S1PR). Heutzutage kennt man fünf S1P-Rezeptorsubtypen, S1P₁ (Edg1), $S1P_2$ (Edg5), $S1P_3$ (Edg3), $S1P_4$ (Edg6) und $S1P_5$ (Edg8), die unterschiedlich exprimiert werden und an verschiedene G Proteine koppeln. So findet man die S1P₁₋₃-Rezeptoren weit verbreitet in Gehirn, Herz, Niere, Leber oder Skelettmuskeln. Dagegen wird der S1P₄-Rezeptor hauptsächlich im Immunsystem und in der Lunge exprimiert. Der S1P₅-Rezeptor kommt überwiegend im Gehirn und in der Milz vor (Rosen et al. 2009). In Keratinozyten und Fibroblasten konnten alle S1PR mit unterschiedlichen Expressionsraten gefunden werden (Keller et al. 2007; Schuppel et al. 2008). Zusätzlich zu diesen fünf Rezeptoren konnten drei weitere GPCRs identifiziert werden. Obwohl sie nur ca. 40% Homologie zu den S1PR aufweisen, können sie durch S1P aktiviert werden. Diese drei Rezeptoren sind GPR3, GPR6 und GPR12 (Uhlenbrock et al. 2002).

Die vielfältigen Funktionen des S1P erklären sich durch die verschiedenen Rezeptorsubtypen und die Kopplungen mit unterschiedlichen G Proteinen. Für alle S1PR ist die durch Pertussistoxin (PTX) hemmbare Kopplung mit G_{ai} nachgewiesen worden. Interessanterweise stellt diese Kopplung die einzige für S1P₁ dar. Trotzdem werden durch S1P₁ zahlreiche Signalwege beeinflusst, wie z.B. Hemmung der Adenylatzyklase, Aktivierung von ERK und damit verbundene Proliferationssteigerung sowie antiapoptotische Effekte durch Aktivierung von PI3K / Akt. Darüber hinaus wird die Migration nach Stimulation von Rac induziert (Okamoto et al. 1998; Kon et al. 1999). S1P₂ koppelt dagegen an $G_{\alpha i}$, G_{α} und $G_{12/13}$ und eine Stimulation dieses Rezeptorsubtyps führt zu einer Hemmung der Migration von Zellen. Dies stellt einen funktionellen Antagonismus dar, da nach Bindung von S1P an S1P₁ die Migration gefördert wird (Goparaju et al. 2005; Takashima et al. 2008). Zusätzlich wurde über eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und ERK berichtet. Von Interesse ist die Hemmung der Akt Phosphorylierung in humanen

dermalen Keratinozyten (Schuppel et al. 2008). Genau wie S1P₂ koppelt S1P₃ auch an G_{ai}, G_q und G_{12/13}. Nach Aktivierung dieses Rezeptorsubtyps kommt es ebenfalls zur Aktivierung der PLC und des PI3K / Akt-Signalweges. Außerdem erfolgt eine Stimulation von ERK, Rho und Rac. Dies hat eine Senkung der Herzfrequenz (Sanna et al. 2004), eine NO-abhängige Vasorelaxation (Nofer et al. 2004) und eine Vermittlung des antiapoptotischen Effektes von Glukokortikoiden in dermalen Fibroblasten (Nieuwenhuis et al. 2009) zur Folge. Bei S1P₄ und S1P₅ konnte eine Kopplung mit G_q nicht nachgewiesen werden. Auch S1P₄ vermittelt eine PLC, ERK und Rho Aktivierung (Meyer Zu Heringdorf 2004). Untersuchungen zum Einfluss auf die Migration von Zellen brachten bisher kontroverse Ergebnisse (Kohno et al. 2003; Wang et al. 2005). Am S1P₅-Rezeptorsubtyp wird ebenfalls die Vielschichtigkeit von S1P deutlich. Zum einen hemmt er die Proliferation in transfizierten CHO Zellen (Chinese hamster ovary), zum anderen schütz er Oligodendrozyten der Ratte Aktabhängig vor dem Zelltod (Jaillard et al. 2005).





Abb. 3: S1PR und mögliche Signalwege

1.3.3 S1P Agonisten und Antagonisten

Aufgrund der zahlreichen Effekte, die über S1PR vermittelt werden, stellen diese natürlich interessante Ziele für die Entwicklung neuer Arzneistoffe dar. Bisher wurden verschiedenste Agonisten und Antagonisten für S1PR entwickelt. Vor allem für den S1P₁-Rezeptorsubtyp gibt es verschiedene Substanzen, da dieser Subtyp eine große Rolle in der Lymphozytenmigration spielt. Ein selektiver Agonist, der durch Screening von tausenden Substanzen gefunden wurde, ist SEW2871 (Parrill et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls mit diesem Agonisten gearbeitet. Weitere Agonisten mit Präferenz für S1P₁ sind CYM-5442 (Gonzalez-Cabrera et al. 2008), AUY954 (Pan et al. 2006), KRP-203 (Shimizu et al. 2005). Daneben stehen mit Suramin (S1P_{3/5}), VPC23019 (S1P_{1/3}), W146 (S1P₁) und JTE019 (S1P₂) eine Reihe von Antagonisten mit unterschiedlicher Selektivität zur Verfügung (Japtok and Kleuser 2009).

Der mit Abstand wichtigste Vertreter ist allerdings FTY720. Diese Substanz steht im Mittelpunkt dieser Arbeit und wird deshalb im nächsten Abschnitt genauer vorgestellt.

1.3.4 FTY720

FTY720 (Fingolimod) ist ein neuer Arzneistoff mit immunmodulatorischen Eigenschaften. FTY720 wurde durch strukturelle Abwandlung des Ausgangsstoffs Myriocin (Syn. ISP-1) erhalten, der erstmals 1972 aus Schimmelpilzen isoliert wurde (Kluepfel et al. 1972). Aber erst im Jahre 1994 wurde im Rahmen eines Screening-Programms Myriocin aus dem Ascomyceten Isaria sinclairii isoliert und seine immunsuppressive Wirkung entdeckt (Fujita et al. 1994). Als möglicher Wirkmechanismus wurde eine Hemmung der Serinpalmitoyltransferase, die den ersten Schritt der de-novo-Synthese von Sphingosin katalysiert, beschrieben (Miyake et al. 1995). Um Substanzen mit weniger toxischen Nebenwirkungen zu erhalten, wurden chemische Derivatisierungen durchgeführt, was schließlich zu FTY720 führte (Adachi 1995). Dieses zeigte ebenfalls immunmodulatorische Wirkungen aber keine Hemmung der Serinpalmitoyltransferase (Chen et al. 1999). Im Gegensatz zu Myriocin löst FTY720 in therapeutischen Dosen keine Apoptose aus, sondern sorgt für eine Umverteilung der Lymphozyten. Nach Stimulation mit FTY720 kommt es zu einer Retention der Lymphozyten in sekundären Lymphorganen. Die Gesamtzahl der Lymphozyten wird dabei aber nicht verändert. Nach Absetzen der Therapie kommt

es zu einer vollständigen Regeneration der Lymphozytenzahl im Blut (Chiba et al. 1998; Yanagawa et al. 1998; Brinkmann et al. 2000; Matloubian et al. 2004). Der genaue Wirkmechanismus war lange Zeit unklar. Als Erstes wurde festgestellt, dass der immunmodulatorische Effekt durch PTX gehemmt werden kann (Brinkmann et al. 2000; Henning et al. 2001). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu S1P wurde vermutet, dass FTY720 seine Effekte über die entsprechenden S1PR ausüben kann. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass FTY720 nach Phosphorylierung zu FTY720-Phosphat (FTY720-P) einen Agonisten an allen S1PR außer S1P₂ darstellt. FTY720 selbst hatte keinen Einfluss. Zusätzlich konnte demonstriert werden, dass die Sphk das entscheidende Enzym für die Phosphorylierung ist (Brinkmann et al. 2002; Mandala et al. 2002). Interessanterweise wurde ein Jahr später die SphK2 als viel potentere der beiden Isoformen identifiziert (Billich et al. 2003; Paugh et al. 2003). Da im Blut sehr hohe Konzentrationen an S1P gemessen werden, kann der Agonismus von FTY720-P an S1PR nicht der alleinige Grund für dessen Wirkung sein. Eine Aufklärung erfolgte aufgrund der Feststellung, dass FTY720-P nach Bindung an S1PR zu einer lang anhaltenden Internalisierung dieser führt und daraus eine antagonistische Funktion resultiert (Graler and Goetzl 2004). Das ist der eigentliche Grund, warum Lymphozyten in Lymphknoten zurückgehalten werden. Normalerweise zirkulieren Lymphozyten zwischen Blut, Lymphknoten und Lymphe. Naive T-Lymphozyten wandern dabei S1P₁-abhängig in Lymphknoten ein. Da in der Lymphe eine höhere Konzentration an S1P herrscht, verlassen die T-Lymphozyten den Lymphknoten wieder. Kommt es allerdings im Lymphknoten zu einem Antigenkontakt, wird der S1P₁-Rezeptorsubtyp downreguliert. Daraufhin können die Lymphozyten nicht mehr auf den S1P-Gradienten migrieren und verbleiben im Lymphknoten. Nach einigen Tagen erscheint der S1P₁ Subtyp wieder auf der Oberfläche des Lymphozyten und ein Verlassen des Lymphknotens wird möglich. FTY720 imitiert also einen Antigenkontakt und sorgt so für eine Retention der Lymphozyten im Lymphknoten. S1P sorgt selbst auch für eine Internalisierung des S1P₁-Rezeptorsubtyps. Diese ist allerdings nur von kurzer Dauer, da der Rezeptor nicht abgebaut wird und nach kurzer Zeit wieder auf der Oberfläche erscheint. Hingegen führt die Stimulation mit FTY720 zu einer Polyubiquitinierung des Rezeptors. Dadurch wird dieser in Lysosomen abgebaut. Eine komplette Neusynthese des Rezeptors ist also notwendig, damit dieser wieder auf der Oberfläche exprimiert werden kann (Brinkmann et al. 2004; Matloubian et al. 2004;

Rosen et al. 2009). Außerdem konnte gezeigt werden, dass S1P und FTY720 die endotheliale Barriere stärken und somit die Migration der Lymphozyten zusätzlich behindern (Lee et al. 1999; Sanchez et al. 2003). Zusätzlich wurde festgestellt, dass kein Abbau von FTY720 durch die S1P-Lyase erfolgt, sondern diese sogar gehemmt wird (Bandhuvula et al. 2005).



Abb. 4: Synthese und Abbau von FTY720

Aufgrund dieses innovativen Wirkprinzips wurde ein möglicher Einsatz in der Therapie verschiedener immunologischer Erkrankungen denkbar. In Tiermodellen konnte schon eine sehr gute Wirksamkeit gezeigt werden und die Verwendung als Immunsuppressivum zur Verhinderung von Transplantatabstoßungen erschien vielversprechend (Chiba et al. 1996; Suzuki et al. 1996). Klinische Studien dazu wurden allerdings abgebrochen, da insgesamt kein Vorteil gegenüber etablierter Therapien festgestellt werden konnte (Tedesco-Silva et al. 2007). Zeitgleich durchlief FTY720 klinische Studien der Phase III zur Behandlung der Multiplen Sklerose (Kappos et al. 2006; O'Connor et al. 2009; Cohen et al. 2010; Kappos et al. 2010). Auf Grundlage der vielversprechenden Ergebnisse wurde die Zulassung Ende 2009 beantragt. Der Einsatz von FTY720 erklärt sich aus der Ätiologie der Multiplen Sklerose. Sie stellt eine Autoimmunkrankheit des Nervensystems dar, bei der T-Zellen die Myelinscheiden angreifen und so die Axone schädigen. Bei den bisher durchgeführten klinischen Studien traten natürlich unerwünschte Wirkungen auf. Die am meisten auffallende war dabei eine Absenkung der Herzfrequenz, die allerdings keiner Therapie bedarf. Außerdem wird das Auftreten von Makulaödemen diskutiert. Aufgrund der immunsuppressiven Wirkung kam es häufiger zu Infektionen der oberen Atemwege. Außerdem wurde von Kopfschmerzen, Problemen des Gastrointestinaltraktes und einem Anstieg der Alanin-Aminotransferase berichtet (Kappos et al. 2006; O'Connor et al. 2009).


Abb. 5: Wirkmechanismus von FTY720 (verändert nach Brinkmann et al. 2004)

1.3.5 Einfluss von FTY720 auf die Apoptose

S1P hat neben seinen vielen anderen Eigenschaften potente antiapoptotische Fähigkeiten. So wurde bereits gezeigt, dass S1P humane embryonale Stammzellen unter Beteiligung von ERK vor der Apoptose schützt (Wong et al. 2007). Ebenso wurde eine Akt- bzw. mTOR-Aktivierung in verschiedenen primären und entarteten Zellen gefunden (Maeurer et al. 2009). Zusätzlich wurde in Fibroblasten S1P als Mediator der antiapoptotischen Wirkung Als von Calcitriol identifiziert. Wirkmechanismus wurde eine Verschiebung des Verhältnisses von Bcl-2 / Bax auf die Seite des Bcl-2 beschrieben (Sauer et al. 2005). Mittlerweile konnten außerdem alle S1PR außer S1P₄ mit antiapoptotischen Vorgängen in Verbindung gebracht werden (Donati et al. 2007; Miron et al. 2008; Hofmann et al. 2009; Nieuwenhuis et al. 2009).

Interessanterweise ging man bei FTY720 ursprünglich von einer gegenteiligen Wirkung auf Zellen aus. Es wurde angenommen, dass die FTY720-induzierte Lymphopenie auf eine verstärkte Apoptose im Körper zurückzuführen ist. Der mögliche Einsatz von FTY720 als Zytostatikum in der Tumortherapie aufgrund der apoptotischen Eigenschaften trieb die Forschung auf diesem Gebiet voran. Seither wurden zahlreiche Studien veröffentlicht, die FTY720 zytotoxisches Potential in einer Vielzahl von Krebszellen zuschreiben. FTY720 löst Apoptose in Zellen des hämatopoetischen Systems aus, wie z.B. in Jurkat T-Zellen (Matsuda et al. 1999; Matsuoka et al. 2003) oder Zellen des multiplen Myeloms (Yasui et al. 2005). Darüber hinaus ist in Zellen des Pankreas (Shen et al. 2007), der Leber (Hung et al. 2008), der Niere (Ubai et al. 2007) oder der Prostata (Wang et al. 1999; Permpongkosol et al. 2002; Chua et al. 2005) ein apoptotischer Effekt von FTY720 gefunden worden. Allerdings wird für diese Effekte ein S1PR-unabhängiger Mechanismus angenommen, da z.B. PTX keinen Einfluss auf die ausgelöste Apoptose hatte (Brinkmann et al. 2001). Neben der Vielzahl der Zellen konnten ebenso verschiedene beteiligte Signalwege identifiziert werden. In Leukämie-Zellen wurde demonstriert, dass FTY720 die ERK Phosphorylierung hemmt und dessen Translokalisierung in den Zellkern verhindert (Li et al. 2004). Dies konnte durch weitere Arbeitsgruppen bestätigt werden, die zusätzlich eine Aktivierung von JNK und p38 als proapoptotische Vertreter der MAPK Familie zeigten (Matsuda et al. 1999; Nagaoka et al. 2008). Auch der PI3K / Akt-Signalweg wurde als Target für FTY720 identifiziert. In Zelllinien des Hepatoms konnte dieser Signalweg durch Stimulation mit FTY720 downreguliert werden (Lee et al. 2004). Als weitere interessante Möglichkeit, wie FTY720 in Krebszellen Apoptose einleitet, wurde die direkte Beeinflussung der Mitochondrien genannt. Inkubation von Lymphomzellen mit FTY720 führte zu einer Reduktion des mitochondriellen Membranpotentials, was durch künstliche Überexpression von Bcl-2 verhindert werden konnte (Nagahara et al. 2000).

Obwohl aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von FTY720-P zu S1P von zellschützenden Eigenschaften ausgegangen werden musste, zeigt die Literatur bisher vornehmlich apoptotische Effekte. Eine gegenteilige Wirkung konnte allerdings doch nachgewiesen werden. Die erwähnte Stärkung der endothelialen Barriere durch FTY720 scheint zum Teil auf einen antiapoptotischen Effekt in Endothelzellen zurückzuführen zu sein. In diesem Zusammenhang konnte die Förderung der Phosphorylierungen von ERK und Akt durch FTY720 demonstriert werden (Sanchez et al. 2003). Im Zuge der klinischen Prüfungen von FTY720 für die Therapie der multiplen Sklerose, wurde auch in diesem Bereich der Einfluss von FTY720 weiter untersucht. So wurde gezeigt, dass FTY720 unter Beteiligung des S1P₅-

23

1 Einleitung

Rezeptorsubtyps in der Lage ist, Oligodendrozyten vor dem Zelltod zu schützen. In diesem Fall konnten die Beobachtungen über S1P bestätigt werden (Coelho et al. 2007). Da in Fibroblasten bereits ein antiapoptotischer Einfluss von S1P messbar war, ist nach Stimulation mit FTY720 ein vergleichbarer Effekt denkbar.

1.4 Insulin

Insulin ist ein lebenswichtiges Hormon das in den β-Zellen der Langerhansschen Inseln der Bauchspeicheldrüse gebildet wird. Insulin wird durch sukzessive Abspaltung aus Präproinsulin bzw. Proinsulin synthetisiert und an Zink gebunden als hexamerer Komplex gespeichert. Insulin besteht aus einer A-Kette mit 21 Aminosäuren und einer B-Kette mit 30 Aminosäuren, die durch zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Ryle et al. 1955). Der stärkste Reiz für die Freisetzung von Insulin ist ein Anstieg der Glucosekonzentration im Blut. Eine geringere Glukosefreisetzung aus der Leber (Exton et al. 1973) durch Hemmung der Glykogenolyse und Glukoneogenese, sowie Induktion der Glykogensynthese ist nur ein Aspekt der zahlreichen Wirkungen des Insulins. Weiterhin sorgt es für eine verstärkte periphere Aufnahme von Glukose und Aminosäuren in die Zellen. Zusätzlich hemmt Insulin die Lipolyse (Kitabchi 1977). Außerdem wird durch Insulin das Wachstum zahlreicher Zellen stimuliert (Tapon et al. 2001).

IGF-I (insulin like growth factor) ist ein Wachstumsfaktor, der dem Insulin strukturell sehr ähnlich ist. Er wird aus der Leber nach Stimulation mit Somatotropin ausgeschüttet und zeigt vergleichbare Funktionen (Nakae et al. 2001).

1.4.1 Der Insulinrezeptor und seine Signaltransduktion

Wie viele andere Hormone vermitteln Insulin und IGF-I ihre Wirkungen über membranständige Rezeptoren. Der Insulinrezeptor (IR) und der IGF-I Rezeptor (IGF-IR) sind Rezeptortyrosinkinasen (RTK). Diese sind aus je zwei α - und β -Untereinheiten zusammengesetzt, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die β -Untereinheit trägt die Tyrosinkinase-Aktivität und kann so intrazelluläre Proteine phosphorylieren (Hubbard 1997). Nachdem Insulin an die α -Untereinheit gebunden hat, kommt es zur Aktivierung der Tyrosinkinasen, was in eine Autophosphorylierung des Rezeptors mündet. An die Phosphotyrosinstellen können

1 Einleitung

nun Substrate binden, die eine sogenannte SRC-Homologie 2 (SH2)-Domäne besitzen. Die wichtigsten Substrate sind die Insulin-Rezeptor-Substrate (IRS1-4) und SHC-Proteine (SH2-containing). Nach Rekrutierung dieser Proteine dienen diese nach Phosphorylierung an Tyrosinresten durch den Rezeptor als Dockingproteine für weitere Adapterproteine (Dupont and LeRoith 2001). Obwohl beide Liganden ihre eigenen Rezeptoren besitzen, zeigen sie Affinität zum jeweils anderen Rezeptor. Die Affinität ist allerdings 100-1000-fach geringer (Grothey et al. 1999).

Die wichtigsten Adapterproteine sind PI3K und Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2). Sie besitzen eine SH2-Domäne, über die sie zu den Dockingproteinen rekrutiert werden. Grb2 bindet das SOS (son of sevenless) Protein, das GDP durch GTP am Ras Protein austauscht. Diese Form von Ras aktiviert Raf-1, welches wiederum die restliche Signalkaskade des MAPK-Signalweges anstößt. Durch diese beiden Signalwege werden die für Insulin typischen Effekte vermittelt, Proliferation und Schutz vor dem Zelltod (Avruch 1998; Lawlor and Alessi 2001). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, das IGF-I Herzmuskelzellen durch Hemmung von Bax, der Caspase 3 und der DNA Fragmentierung vor der Apoptose schützt (Wang et al. 1998).

1.4.2 Funktionen des Insulins in der Haut

Diabetes Mellitus ist eine Krankheit, die mit einem erhöhten Blutglukosespiegel und Störungen des Kohlenhydrat- und Lipidmetabolismus einhergeht. Grund dafür ist ein absoluter oder relativer Insulinmangel. Bei 30 % aller Diabetes-Patienten findet man Erkrankungen der Haut (Perez and Kohn 1994). Daran wird die Bedeutung des Insulins in der Entwicklung der Haut deutlich. So konnte demonstriert werden, dass Insulin und IGF-I eine große Rolle in der Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten spielen (Tsao et al. 1982; Wertheimer et al. 2000; Sadagurski et al. 2006). Nachdem die Expression von IR und IGF-RI in der Haut bestätigt worden war (Verrando and Ortonne 1985; Misra et al. 1986), konnte gezeigt werden, dass IGF-I Knockout Mäuse eine stark gehemmte Entwicklung der Epidermis aufwiesen (Liu et al. 1993). Wird die Wirkung von IR oder IGF-IR verstärkt, kommt es sogar zu einer Hyperplasie der Haut bis hin zur Entstehung von Tumoren (Giovannucci 1999; DiGiovanni et al. 2000; Shen et al. 2001). Es war also nicht überraschend, dass in der Pathogenese hyperproliferativer Hauterkrankungen wie der Psoriasis eine gesteigerte Aktivität dieser Signalwege gefunden wurde (Edmondson et al. 2003). In humanen Keratinozyten konnte bereits dokumentiert werden, dass S1P in der Lage ist, durch eine Aktivierung der PKC die Insulin-induzierte Akt-Phosphorylierung zu hemmen (Schuppel et al. 2008). Die weitere Aufklärung des Crosstalks dieser beiden Signalwege ist daher notwendig.

1.5 Migration von Zellen und Metastasierung

Die Bildung von Metastasen ist die letzte Stufe der Tumorprogression. Metastasierungen werden für 90 % der Todesfälle nach Tumorerkrankungen verantwortlich gemacht. Das Verständnis der Vorgänge ist demnach von immenser Wichtigkeit für die Entwicklung möglicher Therapien.

Die Metastasierung verläuft in mehreren Abschnitten. Nach Bildung des Primärtumors lösen sich aus diesem Zellen ab. Dazu müssen Kontakte zu anderen Zellen sowie zur ECM abgebrochen werden. Als Nächstes migrieren die Zellen durch das Gewebe und die Endothelzellen in die Lymph- und Blutgefäße. In diesen beiden Kreisläufen angekommen, werden sie im ganzen Körper verteilt. Vermutlich durch transmembranäre Proteine der Endothelzellen, die Selectine, werden die Krebszellen an die Gefäßwand gelockt und haften dort, durch Integrine vermittelt, an die Gefäßwand. Nun folgt wieder eine Migration durch die Gefäßwand zum Zielort. Nachdem sie dort angekommen sind, werden erneut Kontakte zu umliegenden Zellen ausgebildet und die Proliferation ausgelöst (Rodeck et al. 1991; Deryugina et al. 1997; Borsig et al. 2002).

Offensichtlich kommt dem Migrationsprozess eine sehr große Bedeutung zu. Bei der Migration werden zwei Wege unterschieden. Zeigen Zellen eine gerichtete Bewegung auf einen Konzentrationsgradienten eines Stimulus, handelt es sich um Chemotaxis. Steigt die Fähigkeit zur ungerichteten Bewegung ohne einen vorhandenen Gradienten, spricht man dagegen von Chemokinese. Chemokine, Wachstumsfaktoren und Bestandteile der ECM sind potentielle Induktoren der Migration.

26

1.5.1 Der transformierende Wachstumsfaktor β

Die Familie des transformierenden Wachstumsfaktors β (TGF- β) besteht aus vielen Proteinen, die eine große Sequenzhomologie aufweisen und in die Aktivin-, GDF-(Growth and Differentiation Factor), BMP- (Bone Morphogenetic Protein) und TGF-β-Unterfamilien eingeteilt werden. TGF- β übt eine große Vielfalt an Funktionen aus, z.B. Regulation der Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose, Adhäsion und Motilität (Massague 1998). Alle Proteine der TGF-ß Superfamilie vermitteln ihre Wirkungen über membranständige Rezeptoren mit Aktivität einer Serin- / Threoninkinase. Die Rezeptoren werden in zwei funktionell unterschiedliche Gruppen eingeteilt: TGF-β Rezeptor I (TβR-I) und TβR-II. Es existieren sieben TβR-I, die mit ALK1-7 (activin receptor-like kinases) bezeichnet werden, sowie fünf TßR-II (Kingsley 1994). Die Signale von TGF-β werden durch ALK5 und TβR-II vermittelt. Dazu bindet TGF-ß zuerst an TßR-II, wobei es zu einer Komplexbildung mit TßR-I kommt. Die darauf folgende Autophosphorylierung ermöglicht TßR-II eine Phosphorylierung von TβR-I an Serin und Threoninresten in einer Region, die die Aminosäuren Serin und Glycin enthält (GS-Domain). Damit erhält der Komplex seine Kinaseaktivität und kann intrazelluläre Prozesse anstoßen.

Die Wirkungen des aktivierten Rezeptorkomplexes werden hauptsächlich durch Smad-Proteine vermittelt. Der Name Smad ergibt sich aus Kombination des Gens in *Drosophila melanogaster* Mad (Mother against decapentaplegic) und des C. elegans-Gens Sma (Small body size) (Itoh et al. 2000). Es existieren drei Gruppen von Smad Proteinen: die Rezeptor-regulierten Smad1, 2, 3, 5, 8 (R-Smad), das kooperative Smad4 (Co-Smad) und die inhibitorischen Smad6 und 7 (I-Smad). Nach erfolgter Rezeptoraktivierung bildet sich ein heterodimerer Smad-Komplex aus R-Smad und Co-Smad, der phosphoryliert wird, in den Nukleus transloziert und dort als Transkriptionsfaktor seine Wirkung entfaltet (Massague 1998).

Trotz der Dominanz dieser Signalkaskade sind Smad-unabhängige Effekte von TGF-β beschrieben worden. Abhängig vom Zelltyp ist TGF-β in der Lage, PI3K / Akt, ERK, JNK oder RhoA zu aktivieren (Frey and Mulder 1997; Engel et al. 1999; Bakin et al. 2000; Zhang 2009).

27

1.5.2 TGF- β und Krebs

Aufgrund der vielfältigen Eigenschaften von TGF- β war es nicht überraschend, eine Beteiligung in der Entstehung von Tumoren zu entdecken. Dies erschien zunächst eigenartig, denn im Anfangsstadium eines Tumors wirkt TGF- β als Tumorsuppressor durch Auslösen von Apoptose oder Verschiebung des Zellzyklus in die G1-Phase. Mit der Zeit wird aus TGF- β allerdings ein Tumorpromotor, was auf funktionsgestörte TGF- β Rezeptoren oder Smad Proteine zurückzuführen ist. Zusätzlich wurde eine gesteigerte Expression von TGF- β in Tumorzellen, einschließlich Zellen des Mammakarzinoms, gefunden (Derynck et al. 1987; Reiss and Barcellos-Hoff 1997; Massague 2008).

1.5.3 Estrogene

Estrogene sind die wichtigsten weiblichen Sexualhormone und gehören zur Klasse der Steroidhormone. Den Ursprung der Biosynthese bildet das Cholesterol, das in Androstendion umgewandelt wird. Aus diesem Androgen wird unter Katalyse durch die Aromatase Estron (E1) gebildet. Erfolgt zunächst eine Umwandlung von Androstendion in Testosteron, katalysiert die Aromatase die Bildung von 17β-Estradiol (E2). Der dritte Vertreter ist das Estriol (E3). Die Effekte der Estrogene sind vielfältig. So spielen sie unter anderem eine große Rolle in der Entwicklung der sekundären Geschlechtsmerkmale. Weiterhin haben sie Einfluss auf den Lipidstoffwechsel, das Skelett und das Nervensystem (Nelson and Bulun 2001). Aufgrund der proliferativen Eigenschaften konnte eine Beteiligung in der Tumorgenese der Ovarien, des Endometriums und der Brust nachgewiesen werden (Yager 2000; Yue et al. 2003).

1.5.4 Estrogenrezeptoren

Die Wirkungen des Estrogens werden hauptsächlich über zwei Rezeptoren vermittelt, Estrogenrezeptor α (ER α) und Estrogenrezeptor β (ER β) (Enmark et al. 1997). Es handelt sich um intrazelluläre Rezeptoren, an die die Liganden nach passiver Diffusion durch die Zellmembran und anschließender Diffusion durch Poren bzw. durch Transport in den Zellkern gelangen. Im Grundzustand ist der ER an das Hitzeschockprotein 90 (HSP90) gebunden, das ihn in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor hemmt. Die Bindung eines Liganden führt zur Dissoziation des HSP90 vom Rezeptor und nachfolgender Phosphorylierung. Daraufhin kommt es zu einer Dimerisierung und anschließender Konformationsänderung des Rezeptors. Damit kann er hochspezifisch an ERE (estrogen response elements) binden und erlangt seine volle transkriptionelle Aktivität (Tsai and O'Malley 1994; Katzenellenbogen et al. 1997).

1.5.5 ERE-unabhängige Effekte

Ursprünglich war nur ERα als Rezeptor für E2-vermittelte Wirkungen bekannt. Dann wurde ERβ entdeckt. Im Laufe der Zeit wurden allerdings mehr und mehr Effekte von E2 identifiziert, die innerhalb sehr kurzer Zeitspannen auftraten. Dieser Aspekt schließt aber traditionelle Effekte über eine Genregulation aus, da dies mehr Zeit in Anspruch nehmen würde. Als Ursache werden mehrere Möglichkeiten diskutiert. Zum einen scheinen Interaktionen zwischen dem ER und anderen intrazellulären Proteinen zu existieren. So konnte durch E2 ein schneller Anstieg der Proteinphosphatase 2A (PP2A)-Aktivität gemessen werden. Kovalent an bovines Serumalbumin (BSA) gebundenes und damit nicht membrangängiges E2-BSA war dazu nicht in der Lage (Belcher et al. 2005).

Zum anderen ist inzwischen die Existenz verschiedener membranständiger Rezeptoren belegt, die Estrogen-vermittelte Effekte übertragen. Dabei herrscht allerdings in der Literatur Uneinigkeit über die genaue Beschaffenheit. So wurde beispielsweise von membranständigen ER (mER) berichtet, die Homologien zu ERa und ERβ aufweisen (Pappas et al. 1995; Razandi et al. 2004; Pedram et al. 2006). In den letzten Jahren erlangte ein anderer Rezeptor mehr Bedeutung in diesem Kontext. GPR30, ein sogenannter Orphan Receptor, ist ein GPCR, an den E2 binden und seine Wirkungen vermitteln kann (Thomas et al. 2005). Stimulation von GPR30 konnte mit einer Aktivierung von ERK, cAMP, Ca²⁺ und PI3K in Verbindung gebracht werden (Filardo et al. 2002; Revankar et al. 2005; Sukocheva et al. 2006). Zusätzlich über diese Rezeptoren ein Crosstalk mit anderen Rezeptoren ist von Wachstumsfaktoren berichtet worden. So führte eine Stimulation mit E2 zu einer schnellen Aktivierung von PI3K / Akt und ERK unter Beteiligung von IGF-IR, EGFR (endothelial growth factor receptor) und Her-2/neu (human EGF receptor 2 / neu)

29

1 Einleitung

(Kahlert et al. 2000; Filardo et al. 2002; Stoica et al. 2003). Ebenfalls wurde ein Crosstalk von E2 und TGF- β berichtet (Matsuda et al. 2001; Malek et al. 2006).

Um die Effekte von E2 in der vorliegenden Arbeit zu untersuchen, wurden zwei Brustkrebszelllinien verwendet. MCF-7 Zellen werden aufgrund ihres Rezeptorprofils als hormonabhängig und MDA-MB-231 Zellen als hormonunabhängig bezeichnet (Watanabe et al. 1997; Vladusic et al. 2000). Darüber hinaus zeigen beide Zelllinien ein unterschiedliches Migrationsverhalten. So zeigen MCF-7 Zellen nur schwach ausgeprägte invasive Eigenschaften, während MDA-MB-231 Zellen stark migratorisch sind. Als Grund hierfür wird eine stärkere Bildung von ECM abbauenden Proteinen in MDA-MB-231 Zellen genannt (Holst-Hansen et al. 1996).

1.6 Zielsetzung

Über ihre Eigenschaften als Membrankomponenten hinaus üben Sphingolipide zahlreiche Funktionen aus. Neben den Effekten auf die Proliferation, die Migration und die Differenzierung spielt die Beeinflussung der Apoptose eine entscheidende Rolle. So konnte in verschiedenen Erkrankungen der Haut, wie der Psoriasis, der Sklerodermie, der Keloide oder des Hautkrebses eine veränderte Regulation der Apoptose beobachtet werden. Da bereits gezeigt wurde, dass S1P und Insulin eine große Bedeutung in der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse der Haut zukommt, sollten die apoptotischen Vorgänge in Fibroblasten und Keratinozyten genauer untersucht werden. Dazu wurde als S1P-Analogon hauptsächlich der Immunmodulator FTY720 verwendet. Nach aktueller Datenlage ist dessen Zulassung zur Therapie der multiplen Sklerose wahrscheinlich. Daher ist eine umfangreiche Aufklärung seiner vielfältigen Wirkungen unabdingbar. Genauso ist eine Abklärung eines möglichen Einsatzes für die Therapie von Wundheilungsstörungen oder Hautkrebs sowie eine Charakterisierung potentieller negativer Eigenschaften in diesem Zusammenhang von großer Wichtigkeit. Da FTY720 janusköpfige Effekte bezüglich der Apoptose von Zellen zeigt, stand die Untersuchung des apoptotischen Potentials sowie der beteiligten Rezeptoren und Signalwege im Vordergrund. Zusätzlich war eine genauere Aufklärung der Interaktion von S1P und Insulin von Interesse. Daher gliedert sich die vorliegende Arbeit wie folgt:

- Untersuchungen zur Beteiligung von FTY720 an der Apoptose von Fibroblasten
- Aufklärung der beteiligten S1P-Rezeptorsubtypen
- Aufklärung des zugrunde liegenden intrazellulären Signalweges
- Charakterisierung der Interaktion von S1P und Insulin in Keratinozyten in Bezug auf die Apoptose

In den Industrienationen ist Brustkrebs bei Frauen die häufigste Krebserkrankung. An seiner Entstehung sind verschiedene Faktoren beteiligt. Dazu zählen beispielsweise die Estrogene, die neben ihren wichtigen physiologischen Aufgaben ein kanzerogenes Potential in Geweben der Brust und des Endometriums besitzen. Ein weiteres entscheidendes Molekül ist TGF- β . Dieses wirkt anfangs zwar als Tumorsuppressor, in späteren Stadien allerdings als Tumorpromotor. Zusätzlich zu ihren Einflüssen auf die Proliferation und die Apoptose besitzen TGF- β und 17 β -Estradiol promigratorisches Potential. Da die Migration von entscheidender Bedeutung für die Entstehung von Metastasen ist und schon ein Crosstalk zwischen TGF- β und 17 β -Estradiol berichtet wurde, soll in der vorliegenden Arbeit diese Interaktion genauer untersucht werden.

 Charakterisierung der Interaktion von 17β-Estradiol und und TGF-β in Bezug auf die Migration von Brustkrebszellen

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Analysenwaage AK 160 Autoklav Agagel-Standard Agarosegeldetektionssystem Bio Doc Brutschrank Heracell 240

Elektrophoresekammern Entwicklungskassette FACS-Calibur Fluoreszenzmikroskop Keyence BZ8000 Lamin-Air Sterilarbeitsbank

LightCycler 480 Mikroplattenreader Fluostar Optima Magnetrührer IKAMAG RCT Neubauer-Zählkammer pH Meter 766 Calimatec Phasenkontrast-Mikroskop Pipetten Eppendorf Reference Pipetten Eppendorf Research Pipettierhilfe Pipetboy Schüttelmaschine LS10 Schüttler IKA MT-2 Spektralphotometer, Gene-Ray Standard Power Pack Tank-Blot Trockenschrank UT5042EK

Ultraschallbad Sonorex RK 100 Vakuumgerät Vacuboy Vortex Wasserbad DC3/W26 Wasser Deionisierungsanlage MilliQ Zentrifuge Eppendorf 5415D Zentrifuge Megafuge 1.0 R

Mettler-Toledo, Giessen Guwina-Hofmann, Berlin Biometra, Göttingen Biometra, Göttingen Heraeus Instruments. Düsseldorf Biometra, Göttingen Kodak, München Becton & Dickinson, Heidelberg Keyence, Neu-Isenburg Heraeus Instruments, Düsseldorf Roche Diagnostics, Mannheim BMG, Offenburg Janke & Kunkel, Staufen Zeiss, Jena Knick, Nürnberg Zeiss, Jena Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Integra Biosciences, Fernwald Gerhardt, Bonn Karow, Berlin Biometra, Göttingen Biometra, Göttingen Biometra, Göttingen Heraeus Instruments. Düsseldorf Bandelin, Berlin Integra Biosciences, Fernwald Heidolph, Schwabach Haake, Karlsruhe Millipore, Eschborn Eppendorf, Hamburg Heraeus Instruments, Düsseldorf

2.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Acrylamid Rotiphorese® Gel 40 Agarose (Elektrophorese-Grad) Agarosegelmarker Alexa Fluor 594 Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper Alexa Fluor 488 Anti-Maus-IgG-Antikörper Ammoniumpersulfat Annexin V-FITC Aprotinin Borsäure **Bradford Reagenz** Bromphenolblau Calciumchlorid (CaCl₂) Chloroform Coomassieblau 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) Deckgläschen, Ø 18 mm Desoxycholinsäure Dikaliummonohydrogenphosphat, K₂HPO₄ Dihydrosphingosin-1-phosphat Dimethylsulfoxid, DMSO Dithiothreitol, DTT Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM Einmalküvetten, reduziert Einmalspritzen (Braun Injekt 20 ml) Eisessia Eppendorfgefäße Safe-Lock (0,5, 1,5, 2 ml) Ethanol Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) FACS Clean FACS Flow FACS Rinse Fetales Kälberserum (FKS) Filme, Kodak X-OMAT, XAR-5 Filmentwickler Filmfixierer Filterpapier, \oslash 10 cm 9-Fluorenylmethylchloroformiat (FMOC-CI) Fluoromount[®] **FTY720** FTY720-P Fugene[®] HD Gentamycin Glycerol Glycin HPLC-Zubehör: Säule: Kromasil 100-5C18 (250 mm/4,6 mm ID)

Carl Roth GmbH, Karlsruhe Sigma-Aldrich, Schnelldorf New England Biolabs, Frankfurt Invitrogen, Darmstadt Invitrogen, Darmstadt Sigma-Aldrich, Schnelldorf Axxora, Lörrach Sigma-Aldrich, Schnelldorf Sigma-Aldrich, Schnelldorf Biometra, Göttingen Sigma-Aldrich, Schnelldorf Sigma-Aldrich, Schnelldorf LiChrosolv_® VWR. Darmstadt Sigma-Aldrich, Schnelldorf Sigma-Aldrich, Schnelldorf Roth, Karlsruhe Sigma-Aldrich, Schnelldorf LiChrosolv_® VWR, Darmstadt Biomol, Hamburg VWR, Darmstadt New England Biolabs, Frankfurt Sigma-Aldrich, Schnelldorf VWR, Darmstadt VWR, Darmstadt VWR. Darmstadt VWR, Darmstadt LiChrosolv_® VWR, Darmstadt Sigma-Aldrich, Schnelldorf Becton & Dickinson, Heidelberg Becton & Dickinson, Heidelberg Becton & Dickinson, Heidelberg Biochrom, Berlin Sigma-Aldrich, Schnelldorf Sigma-Aldrich, Schnelldorf Sigma-Aldrich, Schnelldorf Sigma-Aldrich, Schnelldorf Sigma-Aldrich, Schnelldorf Sigma-Aldrich, Schnelldorf **Biozol Diagnostica**, Eching **Toronto Research Chemicals** North York, On, Canada Roche, Penzberg Biochrom, Berlin Sigma-Aldrich, Schnelldorf Sigma-Aldrich, Schnelldorf

Säule: Kromasil 100-5C18 (250 mm/4,6 mm ID) CS, Langerwehe Vorsäule: Kromasil 100-5C18 (20 mm/4,0 mm ID) CS, Langerwehe

Autosamplergefäße: 1,1 ml, konisch HRP-gekoppelter Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper HRP-gekoppelter Anti-Maus-IgG-Antikörper Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure (HEPES) Insulin IGF-I Isopropanol JC-1 **JTE013** Kaliumacetat Kaliumchlorid, KCl KDEL Marker (monoklonal Maus IgG_{2a}) Kaliumhydrogenphosphat (KH₂PO₄) Keratinozytenbasalmedium (KBM) Supplements zur Herstellung von KGM: Amphotericin B -boviner Hypophysenextrakt (BPE) epidermaler Wachstumsfaktor (hEGF) -Gentamicinsulfat -Hydrocortison -Insulin Kollagen A Kontroll siRNA Leupeptin L-Glutamin LightCycler 480[®] Multiwell Platte 96 LightCycler 480[®] Sealing Foil LumiGlo[®] Chemilumineszenz Reagenz Luria Broth LY294002 Magermilchpulver Sucofin® Mercaptoethanol Methanol, LiChrosolv®, gradient grade Monoklonaler Bcl-2-Antikörper (IgG Maus) Monoklonaler Phospho-p44/42 MAPK (Tvr202/Tvr204) Antikörper (IgG Maus) Natriumchlorid (NaCl) Natriumdodecylsulfat, SDS Natriumfluorid (NaF) Natriumhydrogenphosphat, Na₂HPO₄ Natriumhydroxid, NaOH Natriumorthovanadat, Na₃VO₄ Nω-Nitro-L-argininmethylesterhydrochlorid (L-NAME) Nonidet P-40 N,N,N',N'-Tetramethylenethylendiamin (TEMED) Objektträger Optimem 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) Parafilm® M

VWR Merck, Darmstadt New England Biolabs, Frankfurt New England Biolabs, Frankfurt Gibco BRL, Karlsruhe

Sigma-Aldrich, Schnelldorf Sigma-Aldrich, Schnelldorf Sigma-Aldrich, Schnelldorf Invitrogen, Karlsruhe Tocris, Ellisville, USA GE Healthcare, Freiburg Sigma-Aldrich, Schnelldorf Invitrogen, Darmstadt Sigma-Aldrich, Schnelldorf Cambrex BioScience, Verviers, Belgien

Biochrom, Berlin Santa Cruz, Heidelberg Sigma-Aldrich, Schnelldorf Sigma-Aldrich, Schnelldorf Roche Diagnostics, Mannheim Roche Diagnostics, Mannheim New England Biolabs, Frankfurt Sigma-Aldrich, Schnelldorf Sigma-Aldrich, Schnelldorf TSI, Zeven Sigma-Aldrich, Schnelldorf VWR Merck, Darmstadt Santa Cruz, Heidelberg New England Biolabs, Frankfurt

Sigma-Aldrich, Schnelldorf Sigma-Aldrich, Schnelldorf Sigma-Aldrich, Schnelldorf Sigma-Aldrich, Schnelldorf Sigma-Aldrich, Schnelldorf Sigma-Aldrich, Schnelldorf Sigma-Aldrich, Schnelldorf

Sigma-Aldrich, Schnelldorf Sigma-Aldrich, Schnelldorf Menzel-Gläser, Braunschweig Invitrogen, Karlsruhe Sigma-Aldrich, Schnelldorf Carl Roth GmbH, Karlsruhe Paraformaldehyd Penicillin PD98059 Pepstatin Pertussistoxin (PTX) Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) Phosphatgepufferte Salzlösung, Ca²⁺- und Mg²⁺-frei Phosphorsäure (H₃PO₄), konzentriert Polyklonaler GPR30-Antikörper Antikörper (IgG Kaninchen) Polyklonaler Phospho-Akt-Antikörper (IgG Kaninchen) Polyklonaler Phospho-mTOR-Antikörper (IgG Kaninchen) Polyklonaler Phospho-Bcl-2-Antikörper (IgG Kaninchen) Polyklonaler β-Actin-Antikörper (IgG Kaninchen) Polyvinyliden-difluorid (PVDF)-Transfermembran Primer Propidiumiodid (PI) Proteingrößenmarker QIAshredder® Rapamycin Reagenzgläser Pyrex 16x100 mm mit Deckel RevertAid[™] First Strand cDNA Synthesis Kit **RNeasy MiniKit** Ro-31-8220 Rottlerin Rundboden-Röhrchen, Falcon Salzsäure, konzentriert Serumalbumin vom Rind, Fettsäure-frei (BSA) SEW2871 Silikonlösung in Isopropanol Sphingosin-1-Phosphat, S1P Sterilfilter Minisart®, 0,22 µm Stickstoff, flüssig Streptomvcin SYBR Green PCR Master Mix Transformierender Wachstumsfaktor- β (TGF- β) Trichloressigsäure Tris Base Tris-HCI Trypsin Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) Tween 20 U0126 Zellkulturflaschen TPP (25 cm² und 75 cm²) Zellkulturplatten 6-Loch, Flachboden, TPP Zellkulturschalen TPP, 10 cm Zellkulturschaber Zentrifugenröhrchen TPP (15 und 50 ml)

Paraformaldehyd Sigma-Aldrich, Schnelldorf Sigma-Aldrich, Schnelldorf Sigma-Aldrich, Schnelldorf Merck Biosciences, Darmstadt Sigma-Aldrich, Schnelldorf Sigma-Aldrich, Schnelldorf VWR, Darmstadt **Biozol Diagnostica**, Eching New England Biolabs, Frankfurt New England Biolabs, Frankfurt Santa Cruz, Heidelberg Santa Cruz, Heidelberg Millipore, Eschborn **TIB Molbiol**, Berlin Sigma-Aldrich, Schnelldorf New England Biolabs, Frankfurt Qiagen, Foster City, USA New England Biolabs, Frankfurt Dunn Labortechnik, Ansbach Fermentas, St. Leon-Rot Qiagen, Foster City, USA Sigma-Aldrich, Schnelldorf Sigma-Aldrich, Schnelldorf VWR, Darmstadt VWR, Darmstadt Sigma-Aldrich, Schnelldorf Merck Biosciences, Darmstadt Serva, Heidelberg Biomol, Hamburg Sartorius, Göttingen Air Liquide, Berlin Sigma-Aldrich, Schnelldorf Roche Diagnostics, Mannheim Sigma-Aldrich, Schnelldorf Sigma-Aldrich, Schnelldorf Sigma-Aldrich, Schnelldorf Sigma-Aldrich, Schnelldorf Biochrom, Berlin Sigma-Aldrich, Schnelldorf Sigma-Aldrich, Schnelldorf Sigma-Aldrich, Schnelldorf Biochrom, Berlin Biochrom, Berlin **Biochrom**. Berlin Biochrom, Berlin Biochrom, Berlin

2.1.3 Nährmedien und Lösungen

2.1.3.1 Zellkulturmedien und Lösungen zur Zellkultur

Wachstumsmedium für humane Fibroblasten

7,5 %	FKS
2 mM	L-Glutamin
100 u/ml	Penicillin
100 µg/ml	Streptomycin
in	DMEM Medium

Am Vortag der Versuche fand ein Mediumwechsel auf serumfreies Basalmedium statt.

Wachstumsmedium für murine Fibroblasten, MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen

10 %	FKS
2 mM	L-Glutamin
100 u/ml	Penicillin
100 µg/ml	Streptomycin
in	DMEM Medium

Wachstumsmedium für humane Keratinozyten

Für die Kultivierung humaner Keratinozyten wurde das Wachstumsmedium (KGM, 0,15 mM Ca²⁺) aus KBM durch Zugabe folgender Substanzen hergestellt:

30 µg/ml	BPE
0,1 ng/ml	hEGF
0,5 µg/ml	Hydrocortison
5 µg/ml	Insulin
50 ng/ml	Amphotericin
50 µg/ml	Gentamycinsulfat

Bei Experimenten mit Insulin-Stimulationen wurde ein Mediumwechsel auf Insulinfreies KGM durchgeführt.

Isolierlösung A zur Gewinnung von murinen Keratinozyten

Zur Isolierung muriner Keratinozyten wird eine Trypsin-haltige Lösung wie folgt hergestellt:

30 mM	HEPES
4 mM	Glucose
3 mM	KCI
130 mM	NaCl
1 mM	Na ₂ HPO ₄
0,25 %	Trypsin
In	Aqua bidest

Der pH wird auf 7,4 eingestellt und die Lösung anschließend steril filtriert.

Stopplösung B zur Gewinnung von murinen Keratinozyten

Um den Trypsiniervorgang zu stoppen, wird eine FKS-haltige Lösung hergestellt:

30 mM	HEPES
4 mM	Glucose
3 mM	KCI
130 mM	NaCl
1 mM	Na ₂ HPO ₄
In	Aqua bidest.

Der pH wird auf 7,4 eingestellt und die Lösung anschließend steril filtriert. Am Ende werden 10 ml steriles FKS zu 490 ml der Stopplösung gegeben.

Wachstumsmedium für murine Keratinozyten

Für die Kultivierung humaner Keratinozyten wurde das Wachstumsmedium (KGM, 0,05 mM Ca²⁺) aus Ca²⁺-freiem KBM durch Zugabe folgender Substanzen hergestellt:

30 µg/ml	BPE
0,1 ng/ml	hEGF
0,5 µg/ml	Hydrocortison
5 µg/ml	Insulin
50 ng/ml	Amphotericin
50 µg/ml	Gentamycinsulfat

Bei Experimenten mit Insulin-Stimulationen wurde ein Mediumwechsel auf Insulinfreies KGM durchgeführt.

Transportmedium

100 u/ml Penicillin100 μg/ml Streptomycinin DMEM

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

0,2 g/l	KCI
8,0 g/l	NaCl
0,2 g/l	KH_2PO_4
1,44 g/l	Na ₂ HPO ₄
in	Aqua bidest.

Trypsin-EDTA-Lösung

1,67 mg/ml	Trypsin
0,67 mg/ml	EDTA
in	PBS-Lösung

Stoppmedium

10 %	FKS
100 u/ml	Penicillin
100 µg/ml	Streptomycin
in	DMEM

Antibiotikalösung

100 u/ml	Penicillin
100 µg/ml	Streptomycin
in	PBS-Lösung

Einfriermedium

10 %	DMSO
10 %	FKS
In	DMEM

2.1.3.2 Lösungen zur Zelllyse

RIPA-Puffer

Tris/HCI, pH 7,5
NaCl
Nonidet P-40
Desoxycholinsäure
SDS
EDTA
Ca2+- und Mg2+- freier PBS-Lösung

supplementiert mit

1 mM	PMSF
1 mM	Na ₃ VO ₄
5 mM	NaF
1 µg/ml	Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin

2.1.3.3 Lösungen zur Poteinbestimmung

Bradford-Reagenz (5x)

- 125 mg Coomassieblau (Serva Blue G)
- 125 ml Ethanol, 96 %
- 250 ml H₃PO₄, 85 %
- 125 ml Aqua bidest.

Die Lösung wurde unmittelbar vor Gebrauch 1:5 mit Aqua bidest. verdünnt.

2.1.3.4 Lösungen für die Elektrophorese und Western-Blot-Analyse

Trenngelpuffer (pH 8,8)

224,8 g/l	Tris-Base
in	Aqua bidest.

Sammelgelpuffer (pH 6,8)

60 g/l	Tris-HCI
in	Aqua bidest.

Sammelgel (5 % Polyacrylamid)

2,3 ml	Aqua bidest.
0,4 ml	SDS (1 % in Aqua bidest.)
0,8 ml	Sammelgelpuffer
4 µl	TEMED
20 µl	APS (0,1 g/ml in Aqua bidest.)
0,5 ml	Acrylamid Rotiphorese® Gel 40

Trenngel (x % Polyacrylamid)

Tab. 1: Trenngelzusammensetzungen

	7,5 %	10 %	12,5 %
Aqua bidest.	6,15 ml	5,4 ml	4,65 ml
SDS (1 % in Aqua bidest.)	1,2 ml	1,2 ml	1,2 ml
Sammelgelpuffer	2,4 ml	2,4 ml	2,4 ml
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl
APS (0,1 g/ml in Aqua bidest.)	60 µl	60 µl	60 µl
Acrylamid	2,25 ml	3 ml	3,75 ml

Laufpuffer (10x, pH 8,3)

144 g/l	Glycin
30,2 g/l	Tris-Base
10 g/l	SDS
in	Aqua bidest.

Blotpuffer (10x, pH 8,3)

144 g/l	Glycin
30 g/l	Tris-Base
in	Aqua bidest

TBS Puffer (10x)

12,14 g/l	Tris-HCI
87,66 g/l	NaCl
in	Aqua bidest

Zur Herstellung von TBST wurde 0,1 % Tween 20 hinzugefügt und der pH Wert von 8 eingestellt.

Blockpuffer

5 %	Magermilchpulver Sucofin®
in	TBST

Strip-Puffer

3,51 g	Tris-HCI
0,34 g	Tris-Base
3,57 ml	β-Mercaptoethanol
10 g	SDS
ad 500 ml	Aqua bidest.

2.1.3.5 Lösungen für die FACS-Analyse

Bindungspuffer (pH 7,4)

8,18 g/l	NaCl
20 g/l	HEPES
5 g/l	CaCl ₂
in	Aqua bidest.

Der Puffer wurde autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

2.1.3.6 Plasmide

Humaner GPR30 Rezeptor im pCMV5-Vektor, Ampicillinresistenz, freundlicherweise bereitgestellt durch Dr. Christine Otto (Charité Berlin)

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung und Kultivierung von Zellen

2.2.1.1 Gewinnung und Kultivierung humaner Fibroblasten

Humane dermale Fibroblasten wurden aus juveniler Vorhaut, die bei Zirkumzisionen in der kinderchirurgischen Ambulanz der Berliner Ärzte Dr. Jung, Dr. Knoblauch, Dr. Schildknecht sowie dem St. Joseph-Krankenhaus, Berlin Tempelhof, anfiel und dem Arbeitskreis nach Genehmigung der Ärztekammer Berlin zur Verfügung gestellt wurde, isoliert. Die Hautstücke wurden Tag der Operation in Transportmedium gekühlt in das Institut gebracht, wo anschließend die Isolation der Zellen erfolgte. Der Zellverband des Gewebes wurde durch eine einstündige Inkubation mit Trypsin-EDTA-Lösung gelockert. Um die Ablösungsreaktion der Zellen zu beenden, wurde zur Haut Stoppmedium hinzu gegeben. Darauf wurde das Hautstück noch zweimal in PBS geschwenkt, so dass eine Fibroblastensuspension erhalten wurde.

Die gewonnenen Fibroblasten wurden bei 4°C über 5 min mit 1000 U / min abzentrifugiert, nachfolgend in Fibroblastenwachstumsmedium aufgenommen und bei 37 °C, 5 % CO₂ kultiviert. Bei Erreichen eines Konfluenzgrades von etwa 50 bis 70 % wurden die Zellen durch Trypsin-EDTA-Zugabe von den Zellkulturflaschen abgelöst und im Verhältnis 1:3 als sogenannte erste Passage neu eingesät. Für alle Experimente wurden Fibroblasten von mindestens drei Spendern vereinigt und bis zur vierten Passage verwendet.

2.2.1.2 Gewinnung und Kultivierung muriner S1P₃-Knockout- und Wildtyp-Fibroblasten

Murine Fibroblasten wurden aus der Rückenhaut entsprechenden Knockout- bzw. Wildtyp-Tiere isoliert. Die Tiere wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. van der Giet zur Verfügung gestellt. Hergestellt wurden diese Knockout-Tiere von Dr. Jerold Chun (Ishii, Friedman et al. 2001). Die Mäuse wurden rasiert und danach für ca. 30s in 70% Ethanol geschwenkt. Als nächstes wurde mit einer Pinzette und einer Schere die Rückenhaut entnommen ohne dabei Fett- oder Muskelgewebe zu extrahieren. Die Hautstücke wurden je zwei Mal in Gentamycin-Lösung (10 mg/ml) für 5min belassen um Kontaminationen auszuschließen. Die eigentliche Isolierung der murinen Fibroblasten unterschied sich nicht wesentlich von der Isolierung humaner Fibroblasten. Die Hautstücke wurden über Nacht bei 4°C mit Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert, anschließend mit Stoppmedium behandelt und in PBS geschwenkt, um eine Fibroblastensuspension zu erhalten. Die Suspension wurde bei 4°C über 5 min mit 1000 Umdrehungen zentrifugiert und das erhaltene Zellpellet wurde in murinen Fibroblastenwachstumsmedium suspendiert und anschließend bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert. Ebenso wie die humanen Fibroblasten wurden die murinen Fibroblasten nach Erreichen eines Konfluenzgrades von 50 bis 70% mit einer Splitratio von 1:3 passagiert und bis zur 15. Passage für die Experimente genutzt. Die murinen Fibroblasten wurden mittels Real-Time RT-PCR typisiert (35 Zyklen 95°C für 30 s, 56°C für 1 min, 72°C für 1 min). Dafür wurden die folgenden Primersequenzen genutzt:

- 5'-CACAGCAAGCAGACCTCCAGA-3'
- 5'-TGGTGTGCGGCTGTCTAGTCAA-3'
- 5'-ATCGATACCGTCGATCGACCT-3'

2.2.1.3 Gewinnung und Kultivierung humaner Keratinozyten

Humane epidermale Keratinozyten wurden ebenfalls aus juveniler Vorhaut isoliert. Dazu wurde das Transportmedium entfernt, die Haut mit eiskalter PBS-Lösung gewaschen und 1h bei 37 °C oder alternativ 16h über Nacht bei 4 °C in Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert. Die Serinprotease löste die epidermalen Zellen aus dem Zellverband. Zur Beendigung der Enzymreaktion wurden die Hautstücke in Stoppmedium geschwenkt. Die Zellsuspension wurde in ein steriles 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde die Haut zwei weitere Male mit kalter PBS-Lösung gewaschen und die Lösungen im Zentrifugenröhrchen vereinigt und zentrifugiert (300 x g, 5 min, 4 °C). Nach Dekantierung des Überstands, Resuspension des Zellpellets in kalter PBS-Lösung und erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in KGM resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer Pipette vereinzelt und in 25 cm²-Zellkulturflaschen mit 5 ml vorgewärmtem Medium eingesät. Die auf diese Weise gewonnenen Keratinozyten befanden sich in der Vorkultur und wurden als Zellen der 0. Passage bezeichnet und bei 37 °C, 5 % CO₂ und mindestens 95 % Luftfeuchte kultiviert. Nach 24h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um nicht anhaftende Zellen und tote Blutzellen zu entfernen.

2.2.1.4 Gewinnung und Kultivierung muriner Keratinozyten

Auch für die Isolierung muriner Keratinozyten wurde die Rückenhaut der gelieferten Mäuse genutzt. Die Gewinnung der Hautstücke verlief exakt genauso wie zur Isolierung muriner Fibroblasten. Nach Behandlung mit Gentamycin-Lösung wurden die Hautstücke allerdings zuerst mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten und über Nacht bei 4°C in Isolierlösung A belassen. Die Stückchen wurden nun in Stopplösung B aufgenommen und mit einer Pinzette und einem Skalpell die Epidermis mit noch anhaftenden Haaren abgeschabt. Diese Suspension wurde nun in ein Röhrchen übertragen und dort mit einer Pipette mehrmals gründlich durchmischt. Nach der sich anschließenden Zentrifugation für 5min bei 1000g und 4°C wurden die Zellen in Wachstumsmedium für murine Keratinozyten resuspendiert und direkt in 6-Loch-Platten eingesät, da eine Passagierung dieser Zellen nicht ausreichend möglich ist.

2.2.1.5 Passagierung

Nachdem ein Konfluenzgrad von etwa 50 - 70 % erreicht war (üblicherweise nach fünf bis zwölf Tagen), wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS-Lösung gewaschen und durch Zusatz von 1,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung bis zum Ablösen im Brutschrank inkubiert. Das Ablösen der adhärenten Zellen wurde durch die Protease zu verhindern. Das Ablösen wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 4,5 ml Stoppmedium beendet. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Flasche wurde mit PBS-Lösung gespült und die vereinigten Zellsuspensionen anschließend zentrifugiert (300 x g, 5min, 4 °C). Nach einem Waschgang mit PBS-Lösung, um serumfreie Kulturbedingungen zu garantieren, wurden die Zellen in ihrem jeweiligen Wachstumsmedium resuspendiert und vereinzelt. Anschließend wurden die Zellen in 75 cm²-Zellkulturflaschen ausgesät, in denen 13 ml Wachstumsmedium vorgelegt worden war. Diese Zellen wurden nun als Zellen der 1. Passage bezeichnet. Die

Verbreiterung erfolgte jeweils im Verhältnis 1:3, sobald ein Konfluenzgrad von 60 – 90 % erreicht war. Um interindividuelle Unterschiede auszuschließen, wurden für entsprechende Experimente Keratinozyten bzw. Fibroblasten von mindestens drei Spendern vereinigt. Da die Mitoseaktivität der Zellen ab der 5. Passage deutlich abnimmt, fanden in den Experimenten vorzugsweise subkonfluente Zellen der 1. bis 3. Passage mit hoher Mitoseaktivität Verwendung.

2.2.1.6 Quantifizierung und Einsaat von Zellen für die Versuche

Bei der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen kommt der bei der Einsaat eingesetzten Zellzahl eine große Bedeutung zu. Mangelnder Zell-Zell-Kontakt lässt die Zellen nur langsam wachsen. Um reproduzierbare Bedingungen für die Experimente zu gewährleisen, ist die Aussaat einer definierten Zellzahl notwendig. Der Konfluenzgrad kann dabei für die jeweiligen Experimente variieren. Für die Zählung einer Zellsuspension stand ein Hämozytometer (Neubauer Zählkammer: 0,0025 mm² / 0,1 mm) zur Verfügung. Nachdem ein Deckgläschen unter Ausbildung von Newtonringen auf die Zählkammer gedrückt worden war, wurden 10 µl der gut homogenisierten Zellsuspension in den Zwischenraum zwischen Deckglas und Zählkammer gefüllt. Die Zellzahl pro ml wurde bestimmt, indem die vier großen Quadrate ausgezählt, der Mittelwert berechnet und mit 10⁴ multipliziert wurde. So konnten definierte und identische Zellzahlen für die jeweiligen Versuche in das vorgelegte und vorgewärmte Medium eingesät werden.

2.2.1.7 Lagerung und Reaktivierung der Zellen

Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -196 °C in flüssigem Stickstoff. Dazu wurde eine Zellsuspension durch Behandlung mit Trypsin-EDTA-Lösung, Stoppmedium und nachfolgenden Waschschritten aus der Kulturflasche gewonnen und nach der Zentrifugation bei 300 x g, 4 °C für 5min mit einer Zelldichte von 1 - 2 x 10⁶ Zellen pro ml in Einfriermedium resuspendiert. 1,5 ml dieser Zellsuspension wurde in gekühlte Cryoröhrchen überführt und über Nacht in der Cryobox bei -80 °C gelagert, bevor sie in -196 °C kalten flüssigen Stickstoff überführt wurden.

Die Reaktivierung der Zellen erfolgte durch schnelles Auftauen unter sanften Schwenken des Cryoröhrchens im 37 °C warmen Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen in eine 75 cm² Kulturflasche mit 13 ml vorgelegtem Wachstumsmedium überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt, einmal mit PBS-Lösung gewaschen und 13 ml frisches Wachstumsmedium in die Kulturflasche gegeben. Keratinozyten und Fibroblasten wurden nur in der 1. und 2. Passage cryokonserviert, murine Fibroblasten bis zur 6. Passage.

2.2.2 Lösungen der Testsubstanzen

S1P wurde in Methanol zu 5 x 10⁻⁴ M gelöst und bei -80 °C gelagert. Vor dem Gebrauch wurde die Stammlösung zur verbesserten Lösung für 15min unter Eiskühlung in einem Ultraschallbad behandelt. Für Zellkulturexperimente mit S1P wurde das Methanol der Stammlösung unter Stickstoff abgedampft, der Rückstand in einer sterilen Lösung von 0,4 % BSA in PBS-Lösung aufgenommen und zur vollständigen Lösung nochmals für 15min auf Eis in einem Ultraschallbad behandelt. FTY720 wurde in Methanol in einer Konzentration von 1 x 10⁻⁴ M bei -80°C aufbewahrt. FTY720-P wurde in einer Konzentration von 10⁻³ M in DMSO/HCI gelöst und bei -20 °C aufbewahrt. SEW2871 wurde zu 10⁻³ M in DMSO gelöst und wie die Stammlösungen von TPA (10 mg/ml in DMSO), JTE013 (1 mM in Ethanol), VPC23019 (1mM in DMSO) und Rottlerin (1 mM in DMSO) bei -20 °C aufbewahrt. Actinomycin D wurde in einer Konzentration von 2 mg/ml in DMSO gelöst und wie die Stammlösungen von Ro-31-8220 (100 µM in Agua bidest.) unter Lichtausschluss bei -20 °C gelagert. TNF-α wurde zu 10 µg/ml in 1 % BSA in PBS-Lösung aufgenommen und aliquotiert bei -80 °C aufbewahrt. Die Lösungen von Wortmannin (2 mM in DMSO) und LY294002 (20 nM in DMSO) wurden bei -80 °C gelagert. Gefriergetrocknetes PTX wurde in Aqua bidest. zu 100 µg/ml gelöst und auf die gleiche Weise wie die Stammlösung von PI (5 mg/ml in Aqua bidest.) bei 4 °C aufbewahrt; letztere unter Lichtausschluss. Eine Stammlösung des L-NAME wurde am Tag des Experiments frisch in einer Konzentration von 100 mM in Aqua bidest. gelöst. JC-1 wurde in DMSO zu 100 µg/ml, Rapamycin in DMSO zu 100 µM und PD98059 zu 25 mM gelöst und bei -20 °C unter Lichtausschluss gelagert. E2 wurde in Ethanol zu einer Konzentration von 5 x 10⁻³ M gelöst. Die Lösung wurde vor jedem Versuch frisch hersgestellt. TGF-β wurde in 0,1 % BSA / PBS und 4 mM zu einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst, aliguotiert und bei -80 °C gelagert. Die Stammlösung wurde direkt vor Gebrauch min 0,4 % BSA / PBS verdünnt.

Wenn nicht anders angegeben wurden die in dem Experiment benötigten Konzentrationen unmittelbar vor Testbeginn durch Verdünnung mit Medium hergestellt. In den Kontrollexperimenten wurden die entsprechenden Lösungsmittelmengen eingesetzt.

2.2.3 Reinigung von E2-BSA mittels Behandlung mit Dextran behandelter Aktivkohle

Der Gehalt an freiem Estradiol in E2-BSA soll laut Herstellerangaben 2 % nicht überschreiten. Um diesen freien Anteil vollständig zu entfernen, wurde E2-BSA mit Aktivkohle behandelt, die zuvor mit Dextran beschichtet worden war. Dazu wurden 400 mg Aktivkohle in 50 mM Tris-Puffer (pH 7,4) zu einer Konzentration von 8 % (m/v) suspendiert, für 3-4h gerührt und über Nacht bei 4 °C gelagert. Nicht benetzte Aktivkohle wurde abgesaugt, 40 mg (Endkonzentration 0,8 %, m/v) Dextran wurden zugegeben und bei Raumtemperatur für 20min gerührt. Die Suspension wurde für 10min bei 3500g bei 4 °C zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in der E2-BSA Lösung [5 mg E2-BSA in 50 mM TrisPuffer (pH 8,5)] suspendiert und über Nacht bei 4 °C gerührt. Am nächsten Tag wurde die Suspension für 20min bei 8000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde für die weitere Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.3 Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate

Zur Sortierung und Charakterisierung von Zellen und Zellbestandteilen können durchflusszytometrische Verfahren, auch FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting)-Analysen genannt, genutzt werden. Eine im Durchflusszytometer vermessene Zelle verursacht Streulicht durch Beugung und Streuung eines monochromatischen Laserstrahls in Abhängigkeit zellulärer Eigenschaften. Dabei ist Vorwärtsstreulicht (FSC) ein Maß für die Größe einer Zelle und Seitwärtsstreulicht (SSC) ein Maß für deren Granularität. Darüber hinaus ist neben der Charakterisierung zellulärer Größen die quantitative Analyse von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen durch Markierung mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern bzw. fluoreszierenden Farbstoffen möglich. Zur Detektion apoptotischer und nekrotischer Marker wurden die Zellen mit

48

(FITC)-markiertem

V

und

dem

Annexin

Fluorescein-Isothiocyanat

2 Material und Methoden

Fluoreszenzfarbstoff PI markiert und anschließend hinsichtlich der Fluoreszenzintensität analysiert. Der gebundene Fluoreszenzfarbstoff wurde durch den Laser angeregt und das emittierte Licht detektiert, was zu einer Bestimmung der Zellzahl gefärbter und ungefärbter Zellen führte.

In der frühen Phase der Apoptose wird Phosphatidylserin von der Innenseite der Plasmamembran zur Außenseite transloziert, an das spezifisch Annexin V zu binden vermag (Vermes et al. 1995). Früh-apoptotische Zellen sind nur mit Annexin V anfärbbar, wohingegen spät-apoptotische und nekrotische Zellen durch eine gleichzeitige Färbung mit PI detektierbar sind, da PI nur in Zellen mit durchlässiger Zytoplasmamembran eindringt. Es erfolgte auf diese Weise eine Bestimmung der früh- und spät-apoptotischen Zellen.

Zur Bestimmung der Apoptoserate wurden Keratinozyten (5 x 10⁴ Zellen) und Fibroblasten (1 x 10⁵ Zellen) je Vertiefung einer 6-Loch-Platte in den entsprechenden Wachstumsmedien eingesät. Dabei ist eine geringe Konfluenz der Kultur besonders wichtig für das erfolgreiche Auslösen der Apoptose. Am Folgetag wurde das Medium gegen 1 ml des jeweiligen Basalmediums ausgetauscht. Vor der Induktion der Apoptose erfolgte eine entsprechende Stimulation mit den Testsubstanzen und Kontrollvehikeln. Die Apoptose wurde durch Stimulation mit 20 ng/ml TNFa und 0,1 µg/ml Actinomycin D ausgelöst. Nach 20h erfolgte die Präparation der Zellen für die FACS-Analyse. Dazu wurde das Medium mit den darin enthaltenen apoptotischen und nekrotischen Zellen abgenommen und in ein Rundboden-Röhrchen überführt. Die anhaftenden Zellen wurden mit Trypsin / EDTA und Stoppmedium geerntet und ebenfalls ins Röhrchen überführt. Danach erfolgte ein Waschen der Vertiefungen der Kulturplatten. Die vereinigten Zellsuspensionen wurden bei 300 x g und 4 °C für 5min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellsuspensionen mit kaltem Bindungspuffer gewaschen und in 185 μΙ Bindungspuffer resuspendiert. Es folgte eine Inkubation der Zellsuspensionen mit Annexin V-FITC in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml für 10min in der Dunkelheit. Die Gegenfärbung mit PI in einer Endkonzentration von 1 µg/ml erfolgte durch Inkubation für 1min unmittelbar vor der Messung der jeweiligen Probe.

49

2.2.4 Proteinanalytische Methoden

2.2.4.1 Zelllyse

Nach der jeweiligen Behandlung der Zellen wurde das Medium abgesaugt, zweimal mit 2 ml eiskalter PBS gewaschen und für 10min bei 4 °C unter Zusatz von 50 µl RIPA-Lysepuffer inkubiert. Nach dem Einwirken des Lysepuffers wurden die Zellen auf Eis abgekratzt und die gewonnene Suspension wurde bei 15000 g und 4 °C für 30min zentrifugiert. Aus dem Überstand erfolgte die Proteingehaltsbestimmung.

2.2.4.2 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der einzelnen Probe wurde mit Hilfe einer modifizierten Methode nach Bradford gemessen (Bradford 1976). Der im Bradford Reagenz enthaltene Farbstoff Coomassie Brilliant B lagert sich an Proteine. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung des Extinktionsmaximums von 465 nm (rotbraun) zu 595 nm (blau). Es wurde eine Standardgerade aus Mischungen verschiedene Volumina einer BSA-Lösung (50 µg / 100 µl Aq. Bidest.) mit 5 µl RIPA-Lysepuffer, die mit diesem Wasser auf 100 µl aufgefüllt, und mit jeweils 1 ml Bradford Reagenz vermischt wurden, erstellt. Für die Bestimmung an Protein der Proben wurden 5 µl Zelllysat mit 95 µl bidestilliertem Wasser und 1 ml Bradford Reagenz gemischt. Die sich anschließende Bestimmung erfolgte kolorimetrisch über die Extinktion bei 595 nm. Aus dem so gewonnenen Extinktionswert wurde mittels der zuvor erstellten Standardgeraden die Proteinkonzentration ermittelt.

2.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das Volumen, das 20 µg Protein enthielt, wurde mit einem halb so großen Volumen an Laemmli-SDS-Probenpuffers gemischt und für 5min auf 95 °C erhitzt. Die so gewonnenen Proben wurden in die Geltaschen eines diskontinuierlichen Systems aus zwei unterschiedlichen Polyacrylatgelen aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 35 mA im oberen Gel, dem Sammelgel, und bei 55 mA im unteren Gel, dem Trenngel in einer mit Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer. Für die Detektion der Proteine wurden Polyacrylattrenngele entsprechend der Größe verwendet:

Protein	Größe	Polyacrylatgehalt
P-Akt	60 kDa	10 %
P-ERK1/2	44/42 kDa	10 %
P-mTOR	289 kDa	7,5 %
P-Bcl-2 / Bcl-2	28 kDa	12,5 %
P-Smad2	60 kDa	10 %

 Tab. 2: Bei der SDS-PAGE eingesetzte Polyacrylamidkonzentrationen

2.2.4.4 Western Blot und Entwicklung

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden zur Immundetektion auf PVDF-Membranen übertragen, die zunächst zur verbesserten Bindekapazität in Methanol hydrophobisiert wurden. Vor der Schichtung des Blot-Sandwichs wurden Gele, Membranen und Filterpapier in Blotpuffer equilibriert. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte bei 100 mA über Nacht in einem mit 1100 ml Blotpuffer befüllten Tank-Blot. Anschließend wurden die Membranen durch Inkubation in 5 %iger Magermilchlösung in TBST bei 37 °C geblockt, um unspezifische Bindungen von Proteinen an der Membran zu verhindern. Nach drei Waschschritten mit TBST für jeweils 5min bei Raumtemperatur wurden die Membranen mit dem primären Antikörper (1:1000 in Agua bidest. verdünnt) behandelt, um die Zielproteine spezifisch zu markieren. Die Inkubation erfolgte für 2h bei Raumtemperatur auf dem Schaukelschüttler. Danach wurde die Lösung des Primärantikörpers entfernt und die Membran erneut dreimal mit TBST gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation (HRP)-gekoppelten mit dem entsprechenden Meerrettich-Peroxidase Sekundärantikörper (1:1000 in Blocklösung verdünnt) für 1h bei Raumtemperatur. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBST erfolgte die Detektion der gebundenen Antikörper mit Hilfe des LumiGlo® Chemilumineszenz Reagenzes. Dazu wurde die Membran für 1min mit Lumineszenzfarbstoff sowie Peroxid-Lösung (jeweils 1:20 Verdünnung) behandelt. Die Bindung des sekundären Antikörpers führte zu Bereichen, die Lumineszenz zeigten und bei Kontakt mit einem lichtempfindlichen Film in einer Expositionskassette eine Schwarzfärbung erzeugten. Für die Detektion von weiteren Proteinen auf der gleichen Membran wurden die Antikörper durch Inkubation der Membran in 50 ml Strip-Puffer bei 50 °C entfernt und einem erneuten Immunoblot unterzogen.

51

2.2.5 Kultur von E. coli

2.2.5.1 Plattenkultur

Agar-Agar wurde in einer Konzentration von 15 g/l in LB-Medium (25 g Luria Broth in 1 I Aqua bidest) gelöst und anschließend im Autoklaven sterilisiert. Nach dem Abkühlen auf 55 °C wurde für die Selektion von transformierten Escherichia coli (E. coli) Ampicillin mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml in die Agar-Agar-Lösung zugegeben. Da das verwendete Plasmid eine Ampicillinresistenz aufwies, war auf dem Ampicillin-haltigen (100 µg/ml) Medium die Gewinnung der transformierten E. coli möglich, während das Wachstum von nicht transformierten E. coli durch das Antibiotikum unterbunden wurde. Das warme Medium, welches gegebenenfalls für die Selektion von Transformanden mit Ampicillin (100 µg/ml) supplementiert war, wurde in sterilen Petrischalen ausgegossen. Nach dem Erkalten des Mediums wurden die Petrischalen bei 4 °C über mehrere Wochen unter Lichtausschluss gelagert. Das Animpfen einer Plattenkultur erfolgte durch Ausstreichen einer Glycerol- oder Flüssigkultur in Form eines Gittermusters mit Hilfe einer sterilen Impföse. Nach dem Ausplattieren wurden die Platten bei 37 °C über Nacht inkubiert. Bis zur eigentlichen Verwendung wurden die mit E. coli kultivierten Platten bei 4 °C unter Lichtausschluss gelagert.

2.2.5.2 Flüssigkultur

Eine Einzelkolonie wurde mit einer sterilen Impföse aus einer Plattenkolonie abgenommen und in 3 ml steriles LB-Medium, welches gegebenenfalls für die Selektion von Transformanden mit Ampicillin (100 µg/ml) supplementiert war, okuliert. Die Kulturen wurden über Nacht in einem Schüttler bei 37 °C inkubiert. Diese Vorkultur wurde zum Animpfen von größeren Kulturen im Verhältnis von 1:100 bis 1:1000 genutzt.

2.2.5.3 Lagerung und Reaktivierung von E. coli

1 ml einer Übernacht-Flüssigkultur wurde mit 1 ml einer 70 %igen Glycerol-Lösung vermischt und zunächst bei -80 °C in einem Cryoröhrchen eingefroren. Nach 2d erfolgte die Überführung der Bakterien in -196 °C kalten flüssigen Stickstoff. Für die

Reaktivierung dieser Glycerolkultur wurden die auf Eis aufgetauten Bakterien mit einer Impföse in eine Plattenkultur oder eine Flüssigkultur übertragen.

2.2.6 Herstellung kompetenter E. coli

Damit E. coli Bakterien in der Lage sind, exogene DNA aufzunehmen, müssen sie 'kompetent' gemacht werden. Dazu werden E. coli Kulturen in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 20min auf Eis inkubiert. Dann folgt eine Zentrifugation bei 4000 U / min für 20min bei 4 °C. Das gewonnene Zellpellet wurde in steriler 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und 20min auf Eis inkubiert. Nach wiederholter Zentrifugation bei 4000 U / min für 20min für 20min bei 4 °C wurde das Zellpellet wiederum in CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach einer erneuten Inkubation auf Eis für 3h folgte wieder eine Zentrifugation unter gleichen Bedingungen. Das Zellpellet konnte nun in einer 100 mM CaCl₂ / Glycerol-Lösung eingefroren werden.

2.2.7 Transformation und Expression in E. coli

Zur Transformation von Plasmid-DNA wurden 50 µl kompetente E. coli Zellen aufgetaut und mit 1 µg plasmidischer DNA auf Eis versetzt. Nach 30min Inkubation auf Eis erfolgte die Plasmidaufnahme der Bakterien durch einen Hitzeschock für 30 s bei 42 °C auf dem Heizblock. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium und Inkubation für 30min bei 37 °C wurden die Zellen zur Selektion von Transformanden auf Ampicillinhaltigen Agarplatten (100 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine transformierte Kolonie wurde mit einer Impföse von der Agarplatte geerntet und zunächst in einer 3 ml Ampicillin-haltigen Flüssigkultur (100 µg / ml) über Nacht vermehrt. Diese Vorkultur wurde dann für das Animpfen einer 200 -250 ml Flüssigkultur im Verhältnis von 1:100 bis 1:1000 verwendet. Die transformierten Bakterien wurden bei 37 °C bis zum Erreichen einer optischen Dichte von OD = 0,6 inkubiert und anschließend für 60min bei 4000 U / min abzentrifugiert. Für die Präparation der Plasmid-DNA wurde das QIAfilterTM Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Plasmid-DNA wurde wie folgt gewonnen: nachdem die Zellen unter alkalischen Bedingungen in Puffer P1 für 5min lysiert wurden, erfolgte die Neutralisation der Lysereaktion durch Zugabe von Puffer P3, der zusätzlich die Komplexierung von denaturierten Proteinen, chromosomaler DNA und Zelltrümmern bewirkte. Dieser Komplex wurde durch Filtration von der in Lösung befindenden plasmidischen DNA über die QIAfilter[®] Cartridge getrennt. Eine weitere Aufreinigung erfolgte durch Filtration über eine mit Puffer QBT equilibrierte Quiagentip 100 Säule, in der Plasmid-DNA auf dem Anionen-Austauscher Harz zurückgehalten wurde und Verunreinigungen mit dem Filtrat entfernt wurden. Das mit dem Puffer QF eluierte Plasmid wurde mit Isopropanol ausgefällt, abzentrifugiert und nochmals mit 70-prozentigem Ethanol zum Entsalzen gewaschen. Nach Entfernen des Ethanols wurde das Plasmid in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCI, 1 mM EDTA, pH 7,5) gelöst, fotometrisch bei 260 nm vermessen und für die langfristige Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.8 Transfektion von MDA-MB-231 Zellen mit Plasmid

Für die Transfektion wurden in 6-Well-Platten 5*10⁴ Zellen / Well im Wachstumsmedium ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das gewünschte Plasmid (mit einer Endkonzentration von 1 µg / ml in der Zellkultur) zu einem Volumen von 100 µl OptiMEM zugegeben und mit Fugene HD[®]-Transfektionsreagenz im Verhältnis 1:2,5 (1 µg DNA entspricht 2,5 µl Fugene HD[®]-Transfektionsreagenz) versehen. Nach 15min Inkubation bei Raumtemperatur wurden pro Zellansatz 100 µl des Transfektionsgemisches zupipettiert und die behandelten Zellen für 24h im Brutschrank inkubiert.

2.2.9 Transfektion von Fibroblasten und Keratinozyten mit siRNA

Keratinozyten wurden in einer Zelldichte von 5 x 10⁴ Zellen pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte in Wachstumsmedium ausgesät. Die siRNA wurde in einer Konzentration von 10 µM in RNase-freiem Aqua bidest. gelöst. Als Kontrolle diente ein Nukleotidduplex gleicher Größe mit zufälliger Sequenz, der selbst nicht zum Abbau einer bekannten zellulären RNA führt. Die Zellen wurden mit 40 nM der entsprechenden siRNA unter Verwendung des N-TER[™] Nanoparticle siRNA Transfection System entsprechend den Herstellerangaben transfiziert.

SphK2	sense	5'-GAGGGUAGUGCCUGAUCAA-3'
	antisense	5'-UUGAUCAGGCACUACCCUC-3'
ΡΚϹδ	sense	5'-GUUGAUGUCUGUUCAGUAU-3'
	antisense	5'-AUACUGAACAGACAUCAAC-3'

Tab. 3: Sequenzen der verwendeten siRNA

Für die Transfektion in der 6-Loch-Platte wurde in einem Tube eine Lösung aus siRNA bzw. Kontroll-siRNA und siRNA Dilution Buffer hergestellt. In einem weiteren Tube wurde die fertige N-TER Peptide Lösung hergestellt. Nachdem der Inhalt beider Tubes vereinigt wurde, wurde die Mischung 20min bei Raumtemperatur stehen gelassen, damit sich die siRNA / Peptid-Nanopartikel bilden konnten. Anschließend wurde die Nanopartikellösung mit dem entsprechenden Wachstumsmedium (ohne FKS) verdünnt. Das Medium der Zellen wurde nun abgesaugt und durch das soeben hergestellte Transfektionsmedium ersetzt. Nach Inkubation von 24h im Brutschrank wurde das Medium durch das jeweilige Wachstumsmedium ersetzt. Anschließend wurde mit der Stimulation der Zellen begonnen.

2.2.10 Isolierung der RNA

Für die Real-Time PCR wurde die Isolierung der Gesamt-RNA aus den Zellen mit dem RNA Isolierungskit (Rneasy Kit[®]) der Firma Qiagen (Foster City, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Zellen wurden direkt in der Versuchsschale mit 300 µl Lyse-Puffer lysiert. Danach wurden die Proben auf eine QIAshredder[®]-Säule gegeben und bei 14000 x g für 3min bei 4 °C zentrifugiert. Es folgte die Mischung des RNA-haltigen Zentrifugats mit 70 %igem Ethanol im Verhältnis 1:1. Anschließend wurde dieses Gemisch auf eine RNeasy spin[®]-Säule gegeben und für 15s bei 8.000 x g zentrifugiert. Dadurch wurde die Bindung der RNA an das Säulenmaterial erreicht. Danach wurde die Säule mit RW1 Puffer und schließlich zweimal mit RPE-Puffer gewaschen. Die Gesamt-RNA wurde aus der Säule mit 40 µl RNAse-freiem Wasser eluiert.

Daraufhin wurde jede Probe 1:40 in Tris-Puffer verdünnt und in der Quarzküvette bei 260 nm und 280 nm vermessen. Folgende Formel wurde zur Berechnung verwandt:

[RNA] = A x 40 x F	[RNA] :	Konzentration der mRNA in μg / ml
	A :	Absorption bei 260 nm
	F :	Verdünnungsfaktor

Zur Überprüfung der Reinheit der einzelnen Proben wurde der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm gebildet. Dieser durfte nicht kleiner als 1,8 sein. Die Proben wurden bis zum Transkribieren in cDNA bei -80 °C gelagert.

2.2.11 Synthese von cDNA

Eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) katalysiert die Reaktion, bei der zu jeder RNA-Matrize ein komplementärer DNA-Strang gebildet wird. Das Enzym wurde erstmals in Retroviren entdeckt. Inzwischen wurden Reverse Transkriptasen aus verschiedenen Organismen isoliert. In dieser Arbeit wurde die Moloney Murine Leukemia Reverse Transkriptase (M-MuLV RT, auch RevertAid[™]) verwendet, die über eine geringe RNAse-Aktivität verfügt. Eine definierte Menge der isolierten Gesamt-RNA (0,1 bis 5 µg) wurde umgeschrieben. Dazu wurde das RevertAid First Strand cDNA Synthesis KitTM von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Jede Lösung wurde gemischt und kurz zentrifugiert, um Flüssigkeitsreste zu sammeln. Der Versuch wurde gekühlt, weil RNAsen eine verminderte Aktivität bei niedrigen Temperaturen zeigen. Der RNA-Abbau wurde so auf ein minimales Maß reduziert. Zusätzlich verringert eine Kühlung eine unkontrollierte cDNA-Synthese. Nach Angaben des Herstellers wurde die gewonnene RNA in ein Reaktionsröhrchen vorgelegt. Zu dieser Matrize wurde eine Oligo-dT-Primer-Lösung (c = $0.5 \mu g$ / ml) gegeben und mit molekularbiologisch reinem Wasser zu 12,0 µl aufgefüllt. Diese Mischung wurde für 5 min bei 70°C denaturiert. Der Oligo-dT-Primer bindet an die Poly(A)-Sequenz der eukaryontischen mRNA und dient als Startpunkt für die Reaktion. Im folgendem wurden der Reaktionspuffer (20 mM Tris-HCl pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), der Ribonuklease-Inhibitor (RiboLockTM, 20 u / μ l) und ein dNTP (Desoxynukleosidtriphosphat)-Mix (Mischung aus je 10 mM Lösungen von dATP, dTTP, dGTP, dCTP) zugesetzt. Die Negativkontrollen enthielten anstatt der RNA das verwendete Wasser. Zu jedem Ansatz wurde M-MuLV RT (200 u/µl) hinzupipettiert. Alle Proben wurden für 60min bei 42°C inkubiert. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurden die Reaktionsansätze für 10min bei 70°C inkubiert. Nach dem Abkühlen konnten die Proben direkt vermessen oder bei -20 °C für den späteren Gebrauch gelagert werden.

2.2.12 Real-Time Polymerase Kettenreaktion

Die hier genutzte Real Time RT-PCR ist eine spezielle Form der PCR. Allgemein stellt die PCR eine *in vitro* Methode zur Vermehrung von DNA bekannter Nukleotidsequenz (Saiki et al. 1985) dar. Als Startmoleküle dienen zwei

Oligonukleotidprimer, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge binden und die Zielseguenz flankieren. Unter den richtigen Reaktionsbedingungen und dem Zusatz einer dNTP-Mischung verlängert die DNA-Polymerase entlang der einzelsträngigen denaturierten DNA-Matrize und synthetisiert so neue DNA-Sequenzen, die komplementär zur Ausgangs-DNA sind. Die PCR ist ein zyklisches Verfahren, dass sich aus den Phasen Denaturierung, Anealling und Elongation zusammensetzt. In dieser Arbeit wurden mittels Real-Time RT-PCR die basale Genexpression sowie Veränderungen dieser nach Silencing untersucht. Der hier verwendete Lightcycler 480[®] von Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) misst die Laser-induzierten Fluoreszenzsignale am Ende bzw. während eines PCR-Zyklus und quantifiziert so die Menge des PCR-Produkts. In den Experimenten dieser Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green eingesetzt. Da er in die doppelsträngige DNA interkaliert, korreliert die Fluoreszenzzunahme mit der DNA-Menge. Die spezifischen Primerpaare für die Real-Time PCR wurden mittels Primer Design Software der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) entworfen. Für jedes Primerpaar wurde eine Standardkurve aufgenommen, um die Effizienz zu bestimmen. Der ideale Effizienz-Wert liegt bei 2. Der gemessene Wert geht in die Berechnung der Mengenbestimmung mit ein. Bei jedem Versuch wurde ein interner Standard zugesetzt. Dieser Kalibrator enthielt für alle Versuche eine bestimmte Menge an humaner bzw. muriner cDNA und machte verschiedene Experimente untereinander vergleichbar. Alle Proben wurden in einer Dreifachbestimmung untersucht. Zum Vermessen wurden die DNA-Proben in eine 96-Lochplatte einpipettiert und mit einer Lösung aus SYBR® Green Mix (FastStart Tag DNA-Polymerase, Reaktionspuffer, dNTP-Mix (dATP, dUTP, dGTP, dCTP), SYBR® Fluoreszenzfarbstoff Greeen und MgCl₂) und spezifischen Primern (Endkonzentration 0,5 µM) vorsichtig vermischt. Nachdem die Proben zentrifugiert waren, erfolgte die eigentliche Real-Time PCR nach folgendem Programm: initiale Denaturierung für 5min bei 95 °C, 45 Zyklen bestehend aus Denaturierung für 10s bei 95 °C, Annealing für 7s bei 55 °C und Elongation für 6s bei 72 °C. Anschließend wurde eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt, um die Bildung von unspezifischen Primerdimeren ausschließen zu können. Die Ergebnisse wurden auf das Referenzgen Cyclophilin A normalisiert und auf den Kalibrator standardisiert.

57
SphK2	vorwärts	5'-CCTGGCTGCTAGAGTTG-3'	
	rückwärts	5'-CCCTCATTGATCAGGCAC-3'	
ΡΚϹδ	vorwärts	5'-TGGGATGTGCAAAGAGAAC-3'	
	rückwärts	5'-GGCCAATGAGCATCTCGTA-3'	
ERα	vorwärts	5'-TCCAAAGAGAAGACCCTATCAATGTA-3'	
	rückwärts	5'-AGTAAGTCCCTTATTTGTTCAGC-3'	
ERβ	vorwärts	5'-TCGCTAGAACACACCTTACC-3'	
	rückwärts	5'-TTCACACGACCAGACTCCATA-3'	
GPR30	vorwärts	5'-CTCATGTGGACTGGGACC-3'	
	rückwärts	5'-TGAACGTCACCAGCCTC-3'	
Cyclophilin A	vorwärts	5'-TTTGCTTAATTCTACACAGTACTTAGAT-3'	
	rückwärts	5'-CTACCCTCAGGTGGTCTT-3'	

Tab. 4: Sequenzfolge der verwendeten Primerpaare

2.2.13 Gehaltsbestimmung von FTY720

Zur Bestimmung der gebildeten Menge an FTY720-P in Fibroblasten wurden $2*10^5$ Zellen / Vertiefung in eine 6-Well-Platte eingesät. Nach Ende der Stimulation mit FTY720 wurde das Medium abgenommen und die adhärenten Zellen mit 1 M NaCl Lösung auf Eis abgeschabt. Die Proben wurden in ein silikonisiertes Glasröhrchen überführt und das Volumen mit 1 M NaCl auf 1 ml eingestellt. Dann wurden 1 ml Methanol und 200 µl 18,5 %-ige HCl zugefügt und die Proben für 45s gevortext. Nach Zugabe von 2 ml CHCl₃ wurde wieder für 45s gevortext und die Proben anschließend bei 4000 U / min für 5min bei 4 °C zentrifugiert. Die untere Chloroform-Phase wurde mit einer silikonisierten Glaspipette abgenommen und in ein neues Glasröhrchen überführt. Die verbleibende wässrige Phase wurde ein zweites Mal mit Chloroform gevortext und wiederum zentrifugiert. Die Chloroform-Phase wurde wieder entnommen und mit der ersten vereinigt. Die vereinigten Phasen wurden nun in einem Speed-Vac Vacuum – getrocknet. FMOC-Cl (18 mg) wurde in 5ml Dioxan gelöst. Die Vacuum – getrockneten Proben wurden nun mit 200 µl Dioxan, 200 µl 70 mM K₂HPO₄ – Lösung und 200 µl FMOC-Cl – Lösung versetzt.

Die Chromatographische Detektion von FTY720 und FTY720-P wurde mit einem Merck–Hitachi Elite LaChrom System durchgeführt. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1,3 ml / min. Der verwendete Eluent ist in folgender Tabelle dargestellt.

Gradient	Zeit (min)	Methanol (%)	K ₂ HPO ₄ (%)	H ₂ O (%)
	0	82	9	9
	10	84	8	8
	25	86	7	7
	30	88	6	6
	35	91	4,5	4,5
	40	94	3	3
	45	95	0	5
	68	95	0	5

Tab. 5: Gradient der verwendeten Fließmittel

10 µl der Proben wurden per Cut-injection Methode injiziert. Die Trennung erfolgte auf einer mit Kromasil gefüllten Reversed-Phase-Säule (RP-18) und einer Kromasil Vorsäule. Die Säule wurde auf 35 °C temperiert und die Detektion erfolgte mit einem Fluoreszenz-Detektor bei einer Anregungswellenlänge von 263 nm und einer Emissionswellenlänge von 316 nm. Die Chromatogramme wurden mit der HPLC-System-Manager-Software ausgewertet.

2.2.14 Immunologische Färbung von MDA-MB-231 Zellen

Die Einsaat von MDA-MB-231 Zellen erfolgte in 6-Well-Platten mit eingesetzten Deckgläsern in einer Zelldichte von 5 x 10⁴ Zellen / Loch. Am nächsten Tag wurden die Zellen transfiziert und nach einem weiteren Tag mit eiskaltem PBS zweimal gewaschen. Es folgte die Fixierung mit 3,7 %-iger Formaldehydlösung für 10min, daran schloss sich nach zweimaligem Waschen mit PBS das Blocken für 30min mit der 1 %-iger BSA / PBS-Lösung an. Nach zweimaligem Waschen mit einer 1 %-igen BSA / PBS-Lösung wurden die Zellen für 30min entweder mit einer primären Antikörperlösung (1:100 in 1 % iger BSA / PBS-Lösung) behandelt. Zur Entfernung der überschüssigen Antikörperlösung wurden die Zellen wiederum dreimal mit 1 %-iger BSA / PBS-Lösung gewaschen und dann unter Lichtausschluss mit einer Sekundärantikörperlösung (1:800 in 1 %-iger BSA / PBS-Lösung) 30min lang inkubiert. Im Falle des GPR30-Rezeptors wurde als Sekundärantikörper ein Alexa Fluor 594 Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper verwendet, für KDEL wurde ein Alexa Fluor 488 Anti-Maus-IgG-Antikörper benutzt. Nach dem letzten Färbeschritt mit DAPI für 15min wurden die Zellen abschließend zweimal mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden aus der 6-Well-Platte entfernt und mit einem Tropfen Fluoromount[®] auf Objektträgern fixiert und unter Lichtausschluss gelagert. Die mikroskopische Aufnahme erfolgte am Keyence BZ8000.

2.2.15 JC-1

Zur Analyse der Veränderung des transepithelialen, mitochondrialen Potentials wurde der Fluoreszenzfarbstoff JC-1 eingesetzt. Dieser lipophile, kationische Farbstoff besitzt die Fähigkeit selektiv in den Mitochondrien einer Zelle zu akkumulieren. Je nach vorliegender Polarisierung der Mitochondrienmembran nimmt der Farbstoff zwei Zustände ein: bei einem hohen $\Delta \psi_m$ (vitale Zellen) erfolgt die Bildung von JC-1-Komplexen, sogenannten JC-1-Aggregaten, die einen intensiv orangenen Farbeindruck hervorrufen. Ein niedriges $\Delta \psi_m$ (apoptotische Zellen), korreliert dagegen mit der Bildung von JC-1-Monomeren, welche einen grünen Farbeindruck hervorrufen.

In einem ersten Schritt wurden 1 x 10^5 Fibroblasten oder Keratinozyten in einer 6-Loch-Platte ausgesät und nach dem Anwachsen der Zellen auf Basalmedium umgestellt. Nach der Stimulation der Zellen mit FTY720 oder FTY720-P und der Zugabe von TNF- α / Act für 20h konnte der Fluoreszenzfarbstoff JC-1 hinzugefügt werden. Nach der Entfernung des Mediums und dem Hinzufügen von 1 ml PBS-Lösung, wurden jeweils 1 µl der Lösung in die Vertiefung einer 6-Loch-Platte (Endkonzentration der JC-1-Lösung c = 5 µg/ml) gegeben und diese, unter Ausschluss von Licht, für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgten aufgrund der schlechten Löslichkeit von JC-1 in wasserhaltigen Medien mehrere Waschschritte mit auf 37 °C temperierter PBS-Lösung. Die so vorbereitete Probe konnte nun im Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Aussagekräftige Ausschnitte des Präparates wurden unter Auswahl der gleichen Belichtungszeit und Vergrößerungsstufe zudem digitalisiert.

2.2.16 Migration

Zur Bestimmung der Migration von MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen diente eine modifizierte Boyden-Kammer. Zellkultureinsätze mit Polycarbonatmembranen mit einer Porengröße von 8 µM wurden für 1h bei 37 °C mit je 75 µl einer Fibronektin-Lösung (3 µg/ml) beschichtet und anschließend unter der Sterilbox getrocknet. Für

die weitere Verwendung konnten die beschichteten Zellkultureinsätze bei 4 °C gelagert werden. Die zuvor in 75 cm² Flaschen kultivierten Zellen wurden wenn erforderlich mit E2 oder E2-BSA für 30min sensitiviert, mit PBS gewaschen, trypsiniert, abgestoppt und im frischen Wachstumsmedium mit einer Konzentration von 1x10⁶ Zellen / ml resuspendiert. 500 µl dieser Zellsuspension wurden in die Filter pipettiert, die zuvor in 24 Lochplatten mit je 500 µl der Testsubstanz enthaltenden Wachstumsmedien eingesetzt wurden. Nach 5h Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ wurden die Zellen für 2min mit 96 %-igem Ethanol fixiert und die sich an der Oberseite der Membran befindenden Zellen mit einem Wattestäbchen entfernt. Die migrierten Zellen wurden mit GIEMSA-Lösung für 1h bei 37 °C angefärbt und anschließend unter einem Lichtmikroskop in 10 unterschiedlichen Feldern pro Probe ausgezählt.

2.2.17 Statistik

Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD). Die gewonnenen Ergebnisse wurden in mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten verifiziert. Für die Prüfung auf Signifikanz diente der Students-t-Test. Die Anzahl der Sternchen gibt das Signifikanzniveau der Irrtumswahrscheinlichkeit wieder (* p \leq 0,05 bzw. ** p \leq 0,01 Signifikanzniveau). Die Normalverteilung der Stichprobenmenge ist eine notwendige Bedingung für den Students-t-Test. Daher wurde als erstes überprüft, ob die gewonnenen Daten normalverteilt vorliegen. Für diese Untersuchung wurde der Shapiro-Wilk-Test herangezogen. Eine weitere Bedingung zur Durchführung des Students-t-Tests ist die Varianzhomogenität der Daten. Mittels F-Test wurde auf Varianzhomogenität geprüft. Konnte die Homogenität der Varianzen nachgewiesen werden, wurde die Signifikanz mittels Welch-Test überprüft, für den keine Varianzhomogenität vor, wurde die Signifikanz mittels Welch-Test überprüft, für den keine Varianzhomogenität vorliegen muss.

3.1 Einfluss von FTY720 auf die Apoptose in humanen Fibroblasten

3.1.1 Zytotoxizität von FTY720

In zahlreichen physiologischen Prozessen ist das Gleichgewicht zwischen Wachstum und Apoptose von Zellen von entscheidender Bedeutung. In der Haut ist dies vor allem bei physiologischen Prozessen wie der Wundheilung, aber auch bei pathologischen Veränderungen, die eine Hyperproliferation von Hautzellen beinhalten, ein wichtiger Punkt. Viele exogene und endogene Substanzen greifen in dieses empfindliche Gleichgewicht ein, wie z.B. S1P und FTY720. Es wurde bereits gezeigt, dass S1P in Keratinozyten und Fibroblasten eine große Rolle bei der Proliferation und Apoptose spielt. FTY720 wird hauptsächlich durch die Sphk2 phosphoryliert und erlangt dadurch strukturelle Ähnlichkeit zu S1P. Daher lag ebenso ein Einfluss von FTY720 auf die Apoptose dieser Zellen nahe. Allerdings existieren viele Studien, die FTY720 eine apoptotische Wirkung auf maligne Zellen zuschreiben. Aus diesem Grund wurden zunächst Untersuchungen zu potentiellen apoptotischen Fähigkeiten von FTY720 durchgeführt. Als erste Zellart wurden dermale Fibroblasten ausgewählt, kultiviert und mit humane steigenden Konzentrationen von FTY720 behandelt. Nach 24h wurden die apoptotischen Zellen mit Hilfe einer Doppelfärbung durch Annexin-V-FITC und Propidiumiodid mittels bestimmt. Die Abbildungen 6A Durchflusszytometrie und 6B zeiaen in repräsentativen Dot Plots deutlich, dass die Stimulation mit FTY720 zu einer sehr starken zytotoxischen Reaktion führte, denn der Anteil an Annexin und PI markierten, spätapoptotischen Zellen betrug nun über 80%. Interessant ist der rapide Anstieg der apoptotischen Zellen bei einer Erhöhung der Konzentration von 1 µM auf 10 µM FTY720 (Abb. 6C). Da FTY720 phosphoryliert wird, sollte nun das Verhalten des schon phosphorylierten Stoffes FTY720-P untersucht werden. Eine Stimulation mit diesem Molekül führte allerdings zu keiner Steigerung der apoptotischen Zellzahl (Abb. 6D).



Abb. 6: Apoptotische Effekte von FTY720. Fibroblasten wurden für 20h mit Kontrollvehikel (A), mit 10 μ M FTY720 (B), in den genannten Konzentrationen mit FTY720 (C) oder in den genannten Konzentrationen mit FTY720-P (D) behandelt. Anschließend wurde die Apoptoserate durchflusszytometrisch bestimmt. A und B stellen Dot Plots eines exemplarischen Experiments dar (FL1-H: Fluoreszenzintensität Annexin V-FITC; FL2-H: Fluoreszenzintensität Pl). Die in C und D dargestellten Apoptoseraten sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen \pm SD. Die unabhängige Wiederholung der Experimente lieferte gleiche Ergebnisse. *p \leq 0,05.

3.1.2 FTY720-P schützt Fibroblasten vor Apoptose

Im Gegensatz zu den beschriebenen zytotoxischen Effekten von FTY720 in Krebszellen, berichteten Coelho *et al.* von einem antiapopototischen Effekt von FTY720 in Oligodendrozyten. In Bezug auf Fibroblasten wurde außerdem schon gezeigt, dass S1P in der Lage ist, diese Zellen vor dem Zelltod zu schützen (Hammer et al. 2004). Da von FTY720-P antiapoptotische Effekte zu erwarten waren, wurden

Fibroblasten im nächsten Schritt mit TNF- α in Gegenwart des Transkriptionsinhibitors Actinomycin D inkubiert, um Apoptose auszulösen. Die Vorinkubation mit steigenden Konzentrationen von FTY720 führte zu keinem messbaren antiapoptotischen Verhalten. Bei einer Konzentration von 10 µM stieg der Anteil apoptotischer Zellen sogar noch weit über den mit TNF- α / Actinomycin allein behandelten Zellen hinaus an (Abb. 7A). Zum Vergleich wurde nun wieder mit FTY720-P vorinkubiert und hier zeigte sich nun ein vollkommen anderes Bild. Steigende Konzentrationen des Stoffes korrelierten mit einer stärkeren Abnahme an apoptotischen Zellen. Selbst bei einer Konzentration von 10 µM besaß FTY720-P signifikante zytoprotektive Eigenschaften (Abb. 7B). Die Zeitabhängigkeit dieser Effekte sollte ebenso untersucht werden. Schon nach 10min Vorinkubation mit FTY720-P war eine Tendenz zu erkennen, die nach 1h Signifikanz und bei 6h ein Maximum erreichte (Abb. 7C). FTY720 hingegen zeigte erst bei 24h Vorinkubation eine Tendenz, die allerdings nicht signifikant war (Abb. 7D). Diese ungewöhnliche Diskrepanz zwischen den beiden Substanzen sollte in den nächsten Experimenten untersucht werden.



Abb. 7: Antiapoptotische Effekte von FTY720-P. Fibroblasten wurden nach einer Vorinkubation von 1h in den genannten Konzentrationen mit FTY720 (A), mit FTY720-P (B), von den genannten Zeiten mit 1 μ M FTY720-P (C) oder 1 μ M FTY720 (D) mit TNF- α und Actinomycin D für 20h behandelt. Anschließend wurde die Apoptoserate durchflusszytometrisch nach Färbung mit Annexin V und PI bestimmt. Die dargestellten Apoptoseraten sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen \pm SD. Die unabhängige Wiederholung der Experimente lieferte gleiche Ergebnisse. *p \leq 0,05 bezogen auf TNF- α / Act

3.1.3 Bildung von FTY720-Phosphat in Fibroblasten

Als erstes sollte nun festgestellt werden, ob in humanen dermalen Fibroblasten überhaupt eine Umwandlung von FTY720 zu FTY720-P stattfindet. Dazu wurden Fibroblasten ausgesät und mit 1 µM FTY720 über verschiedene Zeiträume inkubiert. Dann wurden das Medium abgenommen und die Zellen abgeschabt. Nach weiterer Behandlung der so gewonnenen Proben wurden diese nach Inkubation mit dem

Fluoreszenzfarbstoff 9-Fluorenylmethylchloroformiat mittels HPLC quantifiziert. Pro Probe wurden jeweils Werte für FTY720 und FTY720-P ermittelt. In Abb. 8 ist zu erkennen, dass mit steigender Stimulationszeit mit FTY720 dessen Konzentration in den Zellen zunahm, was auf eine Aufnahme in die Zellen deutet. Gleichzeitig stieg die Konzentration des phosphorylierten Produktes FTY720-P. Allerdings war auch nach längerer Zeit die Ausgangssubstanz zu finden. Dies bedeutet eine nicht vollständige Umwandlung von FTY720 in dessen Phosphat. Diese Ergebnisse stehen aber im Widerspruch zu den nicht vorhandenen zytoprotektiven Eigenschaften von FTY720. Denkbar ist also ein gegensätzlicher Effekt von FTY720-P zu seiner Muttersubstanz. Abhängig von der Konzentration der jeweiligen Substanz führt eine Stimulation von Fibroblasten entweder zu einem zelltoxischen oder -schützenden Resultat.



Abb. 8: Bildung von FTY720-P aus FTY720. Fibroblasten wurden mit FTY720 behandelt. Nach Ablauf der angegebenen Stimulationszeiten wurden das Medium und die Zellen getrennt voneinander gesammelt. Nach Aufarbeitung und Derivatisierung der Proben wurden diese mittels HPLC vermessen, wie in "Material und Methoden" beschrieben. Die ermittelten Konzentrationen entsprechen den Konzentrationen pro Vertiefung der 6-Loch-Platte

3.1.4 Beteiligung der Sphk2

Da jetzt gezeigt werden konnte, dass FTY720-P in Fibroblasten gebildet wird, sollte als nächstes die Beteiligung der Sphk2 untersucht werden. Die partielle Bildung von FTY720-P könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass FTY720 bei einer Konzentration von 1µM noch kein zytotoxisches Verhalten zeigt. Aus diesem Grund wurden Fibroblasten mit siRNA gegen SphK2 behandelt. diese um herunterzuregulieren. Das erfolgreiche Silencing wurde mittels Real-Time RT-PCR bestimmt und ist in Abb. 9A dargestellt. Nach erfolgter Transfektion wurden Fibroblasten mit 1 µM FTY720 stimuliert und nach 24h die Apoptoserate gemessen. Nun ist bereits bei dieser Konzentration ein apoptotischer Effekt von FTY720 zu verzeichnen, was auf eine fehlende Gegenregulation von FTY720-P hindeutet (Abb. 9B).



Abb. 9: Apoptotische Effekte nach Downregulation der SphK2. Fibroblasten wurden mit Kontroll- oder SphK2-siRNA behandelt. Die Quantifizierung der spezifischen mRNA-Transkripte erfolgte über eine Real-Time PCR Analyse. Die angegebenen Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SD einer Doppelbestimmung normalisiert gegen Cyclophilin A als Referenzgen (A). Nach erfolgter Transfektion wurden Fibroblasten mit 1 µM FTY720 für 20h stimuliert und anschließend die Apoptoserate durchflusszytometrisch nach Färbung mit Annexin V und PI bestimmt. Die dargestellten Apoptoseraten sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen \pm SD. Die unabhängige Wiederholung der Experimente lieferte gleiche Ergebnisse. *p ≤ 0,05.

3.1.5 Beteiligung von S1P-Rezeptorsubtypen am antiapoptotischen Effekt von FTY720-P

Die zelltoxischen Effekte von FTY720 in vielen Zellen werden S1PR-unabhängigen Vorgängen zugeschrieben (Brinkmann et al. 2001). Da FTY720 nach Phosphorylierung aber ein bekannter Agonist an S1PR außer S1P₂ ist, sollte in den nächsten Experimenten geklärt werden, welcher Rezeptorsubtyp an der antiapoptotischen Wirkung von FTY720-P beteiligt ist. Dafür wurden Fibroblasten zunächst mit dem selektiven S1P₁-Agonisten SEW2871 behandelt und dann die

Apoptose mit TNF- α / Actinomycin ausgelöst. Aus Abb. 10 ist ersichtlich, dass SEW2871 nicht in der Lage war, die Apoptoserate zu beeinflussen. Somit konnte der S1P₁-Rezeptor als beteiligter Subtyp ausgeschlossen werden.



Abb. 10: Antiapoptotische Effekte von SEW2871. Fibroblasten wurden mit den angegebenen Konzentrationen SEW2871 für 1h vorinkubiert und dann die Apoptose mit TNF- α und Actinomycin für 20h ausgelöst. Anschließend wurde die Apoptoserate durchflusszytometrisch nach Färbung mit Annexin V und PI bestimmt. Die dargestellten Apoptoseraten sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen \pm SD. Die unabhängige Wiederholung der Experimente lieferte gleiche Ergebnisse.

Als nächstes sollte der S1P₃-Rezeptorsubtyp genauer untersucht werden, da dieser am stärksten in humanen dermalen Fibroblasten exprimiert wird (Keller et al. 2007). Dazu wurden Fibroblasten mit dem unspezifischen S1P₃ Antagonisten Suramin vorstimuliert. Daraufhin folgte die Inkubation mit FTY720-P für 1h, bevor die Apoptose ausgelöst wurde. Wie in Abb. 11A zu erkennen ist, war FTY720-P nun nicht mehr in großem Ausmaß in der Lage, die Zellen vor der Apoptose zu schützen. Ein vergleichbarer Versuch wurde mit dem spezifischen S1P₁- / S1P₃-Antagonisten VPC23019 durchgeführt. Auch hier konnte FTY720-P nach Vorinkubation mit dem Hemmstoff die Zellen nur noch in sehr geringem Maße vor dem Tod schützen (Abb. 11B).



Abb. 11: Antagonismus des S1P₃**-Rezeptorsubtyps.** Fibroblasten wurden entweder mit 0,3 mM Suramin (A) oder mit 10 µM VPC23019 (B) für 30min vorinkubiert und dann mit 1 µM FTY720-P für 1h behandelt, bevor die Apoptose mit TNF-α und Actinomycin über 20h ausgelöst wurde. Anschließend wurde die Apoptoserate durchflusszytometrisch nach Färbung mit Annexin V und PI bestimmt. Die dargestellten Apoptoseraten sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen ± SD. Die unabhängige Wiederholung der Experimente lieferte gleiche Ergebnisse. *p ≤ 0,05.

Da die Spezifität der verwendeten Antagonisten keine abschließenden Aussagen über den beteiligten Rezeptor zuließ, wurden im nächsten Schritt S1P₃-Rezeptor-Knockout-Fibroblasten herangezogen, um den S1P₃-Rezeptorsubtyp exakter charakterisieren zu können. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden als erstes Versuche mit Wildtyp-Fibroblasten durchgeführt. Auch in diesen Zellen war FTY720-P konzentrationsabhängig in der Lage, die Apoptoserate signifikant zu verringern (Abb. 12A). Wurden nun allerdings Fibroblasten aus S1P₃-Knockout-Mäusen verwendet, war keine Absenkung der Anzahl apoptotischer Zellen trotz Stimulation mit FTY720-P zu verzeichnen (Abb. 12B). Somit konnte ganz klar der S1P₃-Rezeptorsubtyp als der entscheidende Subtyp identifiziert werden.

70



Abb. 12: S1P₃-Rezeptorsubtyp ist entscheidend. Wildtyp-Fibroblasten (A) oder S1P₃^(-/)-Fibroblasten (B) wurden nach einer Vorinkubation von 1h in den genannten Konzentrationen mit FTY720-P und danach mit TNF- α und Actinomycin D für 20h behandelt. Anschließend wurde die Apoptoserate durchflusszytometrisch nach Färbung mit Annexin V und PI bestimmt. Die dargestellten Apoptoseraten sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen ± SD. Die unabhängige Wiederholung der Experimente lieferte gleiche Ergebnisse. *p ≤ 0,05 bezogen auf TNF- α / Act

3.1.6 Beteiligung von $G_{\alpha i}$ -gekoppelten Rezeptoren

Es ist bekannt, dass exogen zugeführtes S1P an seine G-Protein-gekoppelten Rezeptoren bindet, um einen Effekt auszulösen (Spiegel and Milstien 2003). Die Signalvermittlung kann dann über verschiedene G_{α} -Untereinheiten erfolgen. Alle fünf S1PR interagieren mit $G_{\alpha i}$ Untereinheiten, die durch PTX gehemmt werden können. Behandlung mit PTX führt zu einer Ribosylierung von ADP und damit zu einer andauernden Bindung von GDP an die G_{α} -Untereinheit. Dadurch wird eine weitere Signalkaskade im Innern der Zelle unterbunden (Murayama and Ui 1983). Um eine Beteiligung dieser Untereinheiten am antiapoptotischen Effekt von FTY720-P zu zeigen, wurden Fibroblasten mit 200 ng/ml PTX vorinkubiert. Als Folge davon war FTY720-P nicht mehr fähig, die Zellen vor der Apoptose zu schützen (Abb. 13).



Abb. 13: Beteiligung von G_{ai} **-Proteinen.** Fibroblasten wurden mit 200 ng/ml PTX für 3h vorinkubiert und dann mit 1 µM FTY720-P für 1h behandelt, bevor die Apoptose mit TNF- α und Actinomycin über 20h ausgelöst wurde. Anschließend wurde die Apoptoserate durchflusszytometrisch nach Färbung mit Annexin V und PI bestimmt. Die dargestellten Apoptoseraten sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen \pm SD. Die unabhängige Wiederholung der Experimente lieferte gleiche Ergebnisse. *p ≤ 0,05.

3.1.7 Aktivierung von Akt in humanen Fibroblasten

Die Proteinkinase Akt ist der prominenteste Vertreter von Signalproteinen, die die Zelle vor Apoptose schützen können. Akt wird vornehmlich durch die PI3K aktiviert und stößt wiederum selbst weitere protektive Mechanismen an (Hennessy et al. 2005). In Fibroblasten wurde bereits gezeigt, dass S1P in der Lage ist, eine Phosphorylierung von Akt hervorzurufen (Baudhuin et al. 2004). Zusätzlich konnte für den zellschützenden Effekt von FTY720 in Oligodendrozyten eine Beteiligung von Akt nachgewiesen werden (Coelho et al. 2007). Demzufolge sollte nun im nächsten Schritt eine Beteiligung dieser Kinase untersucht werden. Als erstes wurde das Ausmaß der Akt-Phosphorylierung bestimmt. Dazu wurden Fibroblasten ausgesät und mit 1 µM FTY720 bzw. FTY720-P über einen Zeitraum von 1h stimuliert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen lysiert und die Proteine mittels Western Blot-Analyse quantifiziert. Wie in Abb. 14A gut zu erkennen ist, führte die Stimulation mit FTY720-P zu einer starken Zunahme der Phosphorylierung mit einem Maximum bei 10min. Auch konzentrationsabhängig konnte eine Regulation der Phosphorylierung beobachtet werden. Hier zeigte sich schon eine starke Phosphorylierung bei einer Konzentration von 0,001 µM (Abb. 14B). Interessanterweise führte auch die Stimulation mit der unphosphorylierten Substanz zu einer markanten Zunahme der Akt-Phosphorylierung. Das Maximum lag auch hier bei einer Zeit von 10min, allerdings sorgte erst eine Konzentration von 1 μ M FTY720 für eine starke Aktivierung (Abb. 14C/D). Diese Ergebnisse gehen einher mit der Theorie, dass FTY720 teilweise phosphoryliert wird und das entstandene Produkt seinerseits nach Aktivierung von S1PR Akt phosphoryliert.



Abb. 14: Phosphorylierung von Akt durch FTY720 und seinem Phosphat. Fibroblasten wurden mit 1 μM FTY720-P über die angegebenen Zeiträume (A), für 10min mit den angegebenen Konzentrationen FTY720-P (B), mit 1 μM FTY720 über die angegebenen Zeiträume (C) oder für 10min mit den angegebenen Konzentrationen FTY720 (D) behandelt. Anschließend wurde durch Western Blot Analyse Phopho-Akt (Ser⁴⁷³) bestimmt. Der Versuch wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

Ob die Akt-Kinase auch eine Rolle in der Vermittlung des antiapoptotischen Effektes von FTY720-P spielt, sollte als nächster Punkt untersucht werden. Dazu wurde mit dem PI3K-Hemmstoff LY294002 gearbeitet. Eine Hemmung der PI3K führte zu einer verminderten Phosphorylierung von Akt durch FTY720-P (Abb. 15A). Ebenso wurde der antiapoptotische Effekt von FTY720-P in Fibroblasten nach Vorstimulation mit LY294002 vollständig aufgehoben (Abb. 15B).



Abb. 15: Beteiligung der PI3K. Entweder wurden Fibroblasten mit 50 μ M LY294002 für 30min vorinkubiert und dann mit 1 μ M FTY720-P für 10min behandelt, bevor die Akt-Phosphorylierung durch Western Blot bestimmt wurde (A). Der Versuch wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt. Oder Fibroblasten wurden mit 50 μ M LY294002 für 30min vorinkubiert und dann mit 1 μ M FTY720-P für 1h behandelt, bevor die Apoptose mit TNF-a und Actinomycin über 20h ausgelöst wurde (B). Anschließend wurde die Apoptoserate durchflusszytometrisch nach Färbung mit Annexin V und PI bestimmt. Die dargestellten Apoptoseraten sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen \pm SD. Die unabhängige Wiederholung der Experimente lieferte gleiche Ergebnisse. *p \leq 0,05.

3.1.8 Aktivierung von Akt in S1P₃-Knockout-Fibroblasten

Wenn Akt an der zellschützenden Funktion von FTY720-P beteiligt ist, sollte die Phosphorylierung der Kinase in S1P₃ defizienten Fibroblasten aufgehoben sein. Überraschenderweise kam es aber nach Stimulation mit beiden Substanzen jeweils zu einer ähnlichen Phosphorylierung von Akt wie in normalen Fibroblasten. Auch hier war ein Maximum nach einer Stimulationszeit von 10min sowie bei einer Konzentration von 1 μ M zu erkennen (Abb. 16A-D). Diese Resultate wurden durch Western Blots bestätigt, in denen der spezifische S1P₁-Rezeptor Agonist SEW2871 eingesetzt wurde. Dieser löste konzentrationsabhängig nach 10min ebenfalls eine Phosphorylierung des Akt-Proteins aus (Abb. 16E). Nach diesen Ergebnissen musste der Akt-Signalweg als beteiligter Mediator ausgeschlossen werden.



Abb. 16: Phosphorylierung von Akt durch SEW2871, sowie FTY720 und seinem Phosphat. Fibroblasten wurden mit 1 μ M FTY720-P über die angegebenen Zeiträume (A), für 10min mit den angegebenen Konzentrationen FTY720-P (B), mit 1 μ M FTY720 über die angegebenen Zeiträume (C), für 10min mit den angegebenen Konzentrationen FTY720 (D) oder für 10min mit den angegebenen Konzentrationen SEW2871 (E) behandelt. Anschließend wurde durch Western Blot Analyse Phopho-Akt (Ser⁴⁷³) bestimmt. Der Versuch wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

3.1.9 Einfluss von FTY720 auf den MAPK-Signalweg

Neben dem PI3K-Akt-Signalweg spielt auch die MAP Kinase Signalkaskade eine entscheidende Rolle in der Regulation der Apoptose von Zellen. Darüber hinaus wurde schon eine Beteiligung von ERK1/2 an S1P-vermittelten Effekten beschrieben (Wong et al. 2007). Aus diesem Grund wurden Fibroblasten wiederum mit FTY720 und dem phosphorylierten Molekül über verschiedene Zeiträume inkubiert. Die Phosphorylierung von ERK1/2 wurde mittels Western Blot bestimmt und ist in Abb. 17A dargestellt. Beide Substanzen zeigten eine zeitabhängige Phosphorylierung des ERK1/2 Proteins. Um eine mögliche Beteiligung dieser Kinase am Prozess der antiapoptotischen Wirkung von FTY720-P zu untersuchen, wurden Fibroblasten jeweils mit den spezifischen MAPK-Inhibitoren U0126 und PD98059 vorinkubiert, dann mit FTY720-P stimuliert und die Apoptose mit TNF-a / Actinomycin ausgelöst. Keiner der beiden Inhibitoren hatte einen Einfluss auf die zytoprotektive Wirkung von FTY720-P (Abb. 17B/C), was diesen Signalweg ebenso ausschloss. Als Bestätigung dieser Resultate wurden Western Blot Analysen mit S1P₃-KnockoutFibroblasten durchgeführt. Wie zu erwarten war, riefen beide Moleküle eine starke Phosphorylierung von ERK1/2 in diesen Zellen hervor (Abb. 17D).



Abb. 17: Beteiligung der MAPK. Humane Fibroblasten (A) oder S1P₃^(-/-)-Fibroblasten (D) wurden mit 1 μ M FTY720 oder FTY720-P über die angegebenen Zeiten stimuliert und die ERK1/2 Phosphorylierung mittels Western Blot bestimmt. Der Versuch wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt. Oder Fibroblasten wurden entweder mit 50 μ M PD98059 für 90min (B) oder mit 10 μ M U0126 für 45min (C) vorinkubiert und dann mit 1 μ M FTY720-P für 1h behandelt, bevor die Apoptose mit TNF- α und Actinomycin über 20h ausgelöst wurde (B). Anschließend wurde die Apoptoserate durchflusszytometrisch nach Färbung mit Annexin V und PI bestimmt. Die dargestellten Apoptoseraten sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen \pm SD. Die unabhängige Wiederholung der Experimente lieferte gleiche Ergebnisse.

3.1.10 Einfluss von FTY720 auf den mTOR-Signalweg

Der mTOR-Signalweg spielt eine große Rolle in den Bereichen der Autophagie und der Proliferation. Die Aktivierung dieses Signalwegs triggert zytoprotektive Effekte in verschiedenen Zelltypen. mTOR kann durch verschiedene Stimuli aktiviert werden, wobei Akt den wichtigsten Aktivator darstellt. Akt-unabhängige Wege sind allerdings beschrieben worden (Memmott and Dennis 2009). Bis jetzt ist keine direkte Interaktion von FTY720 und mTOR gezeigt worden. In humanen NIH 3T3 Fibroblasten (Chung et al. 1997; Huang et al. 1999) und vaskulären Glattmuskelzellen (VSMC) (Kluk and Hla 2001) ist S1P jedoch in der Lage, diesen Signalweg zu aktivieren, um mitogene Effekte auszulösen. Kürzlich konnte aber auch eine Akt-unabhängige Aktivierung von mTOR durch S1P beobachtet werden (Maeurer et al. 2009). Demzufolge war es von Interesse, diese Signalkaskade genauer zu untersuchen. Die Messung der mTOR-Phophorylierung zeigte, dass FTY720-P genauso wie FTY720 in der Lage war, dieses Signalprotein zeitabhängig zu aktivieren (Abb. 18A). Um eine Beteiligung von mTOR an der Apoptose von Fibroblasten zu analysieren, wurden Fibroblasten mit Rapamycin stimuliert. Rapamycin ist ein selektiver Hemmstoff für diesen Signalweg. Aber eine Vorstimulation mit diesem Stoff führte zu keiner Veränderung am antiapoptotischen Effekt von FTY720-P (Abb. 18B). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte ebenfalls eine Phosphorylierung durch FTY720 und dem Phosphat in S1P₃-Knockout-Fibroblasten nachgewiesen werden (Abb. 18C). Somit konnte auch dieser potentielle Weg ausgeschlossen werden.



Abb. 18: Beteiligung des mTOR Signalweges. Humane Fibroblasten (A) oder S1P3^(-/-)-Fibroblasten (C) wurden mit 1 μ M FTY720 oder FTY720-P über die angegebenen Zeiten stimuliert und die mTOR Phosphorylierung mittels Western Blot bestimmt. Der Versuch wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt. Oder Fibroblasten wurden mit 100 nM Rapamycin für 60min (B) vorinkubiert und dann mit 1 μ M FTY720-P für 1h behandelt, bevor die Apoptose mit TNF-a und Actinomycin über 20h ausgelöst wurde (B). Anschließend wurde die Apoptoserate durchflusszytometrisch nach Färbung mit Annexin V und PI bestimmt. Die dargestellten Apoptoseraten sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen \pm SD. Die unabhängige Wiederholung der Experimente lieferte gleiche Ergebnisse.

3.1.11 Beteiligung von Stickstoffmonoxid

Regulator für das Überleben Als weiterer wichtiger von Zellen wurde Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert. Je nach Menge an gebildetem NO und Dauer der Exposition kann das Molekül proapoptotisch oder antiapoptotisch wirken (Chung et al. 2001). Für S1P wurde in diesem Zusammenhang dokumentiert, dass es HUVECs (human umbilical vein endothelial cells) durch Bildung von NO vor der Apoptose schützt (Kwon et al. 2001). Die Beteiligung von NO sollte im nächsten Schritt untersucht werden. Dazu wurde L-NAME eingesetzt. Das ist ein Arginin-Analogon, das alle NO-Synthasen (NOS) blockiert und somit die NO Bildung unterdrückt. Wie in Abb. 19 zu sehen ist, kam es auch nach Vorstimulation mit diesem Inhibitor zu keiner Erhöhung der Zahl apoptotischer Zellen. Ein weiterer potentieller Vermittler konnte damit ausgeschlossen werden.



Abb. 19: Hemmung der NO Synthasen. Fibroblasten wurden mit 1 nM L-NAME für 30min vorinkubiert und dann mit 1 μ M FTY720-P für 1h behandelt, bevor die Apoptose mit TNF- α und Actinomycin über 20h ausgelöst wurde. Anschließend wurde die Apoptoserate durchflusszytometrisch nach Färbung mit Annexin V und PI bestimmt. Die dargestellten Apoptoseraten sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen \pm SD. Die unabhängige Wiederholung der Experimente lieferte gleiche Ergebnisse.

3.1.12 Mitochondrielles Membranpotential

Da die klassischen extrinsischen Signalwege nicht mit dem antiapoptotischen Effekt in Verbindung gebracht werden konnten, sollte nun der Fokus auf den intrinsischen Signalweg der Apoptose gelegt werden. Es ist darüber hinaus nicht vollständig aufgeklärt, ob beide Signalwege getrennt aktiviert werden können oder ob sie immer miteinander in Verbindung stehen. Das mitochondrielle Membranpotential spielt eine entscheidende Rolle in diesem Zusammenhang. Ein Absinken des Potentials ist verbunden mit dem Auslösen der Apoptose. Von FTY720 ist schon gezeigt worden, dass es in behandelten T-Lymphozyten zu einem Verlust des mitochondriellen Membranpotentials führt (Nagahara et al. 2000; Fujino et al. 2001). Im Falle der zellschützenden Wirkung von S1P konnte gezeigt werden, dass der Lipidmediator die Membrandepolarisation in humanen Neuroblastomzellen zu reduzieren vermag (Agudo-Lopez et al. 2010). Um das Membranpotential der Mitochondrien zu messen, wurde der Fluoreszenzfarbstoff JC-1 benutzt. Dabei handelt es sich um ein kationisches Molekül, das bei intaktem Potential aggregiert und Licht mit einer Wellenlänge von 590 nm emittiert (rot). Sinkt das Potential ab, bilden sich Monomere und die Emissionswellenlänge verschiebt sich zu 525 nm (grün). In Abb. 20A ist zu sehen, dass in unbehandelten Fibroblasten nur sehr wenig diffuses Grün, aber sehr

viele rote Punkte vorhanden sind. Dies zeugt von einem intakten Membranpotential, wie es in gesunden Zellen zu erwarten ist. Nach Auslösen der Apoptose durch Stimulation mit TNF- α / Act hat sich die Emissionswellenlänge fast vollständig zu 525 nm verschoben (diffuses Grün). Wurden nun die Zellen mit FTY720-P vorinkubiert, konnte die Substanz ein Absinken des Potentials verhindern, was sich in einer vermehrten Emission von Licht der Wellenlänge 590 nm (rote Punkte) bemerkbar machte. Interessanterweise war FTY720 nicht in der Lage, einen Einfluss auf das Potential zu nehmen. Dies stellt den ersten Unterschied im Signalweg zwischen diesen beiden Molekülen dar. Der Versuch wurde nun auch mit S1P₃-Knockout-Fibroblasten durchgeführt. Wie in Abb. 20B gut zu erkennen ist, verliert FTY720-P in diesen Zellen seine Fähigkeit, das Membranpotential der Mitochondrien zu stabilisieren. Damit konnte eine Beteiligung der Mitochondrien an der antiapoptotischen Wirkung von FTY720-P nachgewiesen werden.



Abb. 20: Beteiligung des intrinsischen Signalweges der Apoptose. Humane Fibroblasten (A) oder $S1P_3^{(4)}$ -Fibroblasten (B) wurden mit 1 µM FTY720 oder 1 µM FTY720-P für 1h behandelt, bevor die Apoptose mit TNF-a und Actinomycin über 20h ausgelöst wurde. Anschließend wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff JC-1 (5 µg/ml) für 30min angefärbt. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einer 40x Vergrößerung an einem Keyence BZ8000 Fluoreszenzmikroskop gemacht. Rote Punkte in einer Zelle stehen für ein hohes mitochondrielles Membranpotential, während eine diffuse grüne Färbung apoptotische Zellen mit niedrigem Potential markiert. Die unabhängige Wiederholung der Experimente lieferte gleiche Ergebnisse.

3.1.13 Aktivierung von Bcl-2 durch FTY720-P

Es ist allgemein akzeptiert, dass das mitochondrielle Membranpotential durch eine Subgruppe der Proteine der Bcl-2 Familie stabilisiert werden kann. Bcl-2 selbst gehört zu dieser Subgruppe und ist in der Lage, nach Phosphorylierung das

proapoptotische Protein Bax zu inhibieren und damit die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und die Aktivierung weiterer proapoptotischer Proteine zu unterbinden (Kluck et al. 1997). Von FTY720 ist bekannt, dass sein zytotoxisches Verhalten in Krebszellen des Pankreas sowie der Niere auf eine Downregulation von Bcl-2 zurückzuführen ist (Shen et al. 2007; Ubai et al. 2007). Im Gegensatz dazu führt eine Stimulation in humanen primären Makrophagen durch S1P zu einer positiven Regulation von Bcl-2, die mit einem antiapoptotischen Effekt einhergeht (Weigert et al. 2006). Übereinstimmend wurde dazu schon gezeigt, dass S1P nach 48h in humanen Fibroblasten den Bcl-2 / Bax-Rheostat zum Bcl-2 hin verschiebt (Sauer et al. 2005). Da in der vorliegenden Arbeit bereits eine Beteiligung der Mitochondrien gezeigt werden konnte, sollte nun geprüft werden, ob auch das Bcl-2 Protein eine Rolle spielt. Damit Bcl-2 seine Wirkung entfalten kann, muss es phosphoryliert werden. Um diesen Aspekt genauer zu untersuchen, wurden Fibroblasten mit FTY720 und dessen Phosphat stimuliert und das Ausmaß der Phosphorylierung mittels Western Blot bestimmt. Die Inkubation mit FTY720-P resultierte in einer markanten Zunahme an phosphoryliertem Bcl-2 in einem Bereich von 10 - 30min, während FTY720 nur eine schwache Zunahme bewirkte. Wurden nun S1P₃ knockout Fibroblasten stimuliert, konnte keiner der beiden Stoffe eine Reaktion hervorrufen. Dies deutet auf eine Beteiligung dieses antiapoptotischen Proteins in Fibroblasten hin (Abb. 21).



Abb. 21: Phosphorylierung von Bcl-2 durch FTY720 und seinem Phosphat. Humane Fibroblasten (A) oder $S1P_3^{(+)}$ -Fibroblasten (B) wurden mit 1 µM FTY720 oder FTY720-P über die angegebenen Zeiträume stimuliert. Anschließend wurde durch Western Blot-Analyse Phopho-Bcl-2 bestimmt. Der Versuch wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

3.2 Einfluss von FTY720 und S1P auf die Apoptose in humanen Keratinozyten

3.2.1 Zytotoxizität von FTY720

Keratinozyten stellen die größte Zellpopulation in der Epidermis dar. Neben den Fibroblasten spielen sie ebenfalls eine große Rolle in der Wundheilung. Genauso können aber auch pathologische Veränderungen in der Proliferation oder der Apoptose auftreten. Für S1P wurde schon bewiesen, dass es die Proliferation von Keratinozyten hemmt (Schuppel et al. 2008). Gleichzeitig zeigt S1P in Keratinozyten einen antiapoptotischen Effekt (Vogler et al. 2003). Daher war es naheliegend, analog zu den Experimenten zur Apoptose in Fibroblasten, den Einfluss von FTY720 auf Keratinozyten zu untersuchen. Auch in Keratinozyten hatte FTY720 bis zu einer Konzentration von 1 µM keinen Effekt auf das Überleben. Nach einer Stimulation mit 10 µM FTY720 zeigte sich wiederum ein stark zytotoxisches Ergebnis (Abb. 22).



Abb. 22: Zytotoxisches Potential von FTY720. Keratinozyten wurden für 20h den genannten Konzentrationen von FTY720 behandelt. Anschließend wurde die Apoptoserate durchflusszytometrisch bestimmt. Die Apoptoseraten sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen ± SD. Die unabhängige Wiederholung der Experimente lieferte gleiche Ergebnisse. *p ≤ 0.05.

3.2.2 FTY720-Phosphat schützt Keratinozyten vor Apoptose

Da S1P Keratinozyten vor der Apoptose schützt, war zu erwarten, dass FTY720-P auch dazu in Lage ist. Die Stimulation der Keratinozyten mit FTY720-P sorgte zeitund konzentrationsabhängig führ eine starke Abnahme der apoptotischen Zellen (Abb. 23B/C). Im Gegensatz dazu konnte FTY720 die Keratinozyten nicht vor dem Zelltod bewahren. Vielmehr erfolgte eine Steigerung der Apoptoserate nach Stimulation mit 10 μ M FTY720 über TNF- α / Act hinaus (Abb. 23A/D). Dies geht einher mit den in Fibroblasten gefundenen Resultaten.



Abb. 23: Antiapoptotische Effekte von FTY720-P. Keratinozyten wurden nach einer Vorinkubation von 1h in den genannten Konzentrationen mit FTY720 (A), mit FTY720-P (B), von den genannten Zeiten mit 1 μ M FTY720-P (C) oder 1 μ M FTY720 (D) mit TNF- α und Actinomycin D für 20h behandelt. Anschließend wurde die Apoptoserate durchflusszytometrisch nach Färbung mit Annexin V und PI bestimmt. Die dargestellten Apoptoseraten sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen \pm SD. Die unabhängige Wiederholung der Experimente lieferte gleiche Ergebnisse. *p ≤ 0,05 bezogen auf TNF- α / Act

3.2.3 Einfluss des S1P₃-Rezeptorsubtyps auf den antiapoptotischen Effekt von FTY720-P

In Analogie zu den Fibroblasten sollte nun als nächstes der involvierte Rezeptorsubtyp identifiziert werden. Erste Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe deuteten auf eine Beteiligung des S1P₃-Subtyps hin. Vorinkubation mit dem S1P₁- / S1P₃-spezifischen Antikörper VPC23019 führte tatsächlich zu einer Reduktion des antiapoptotischen Effekts von FTY720-P. Um nun sicher den Subtyp bestimmen zu können, konnte erstmals mit S1P₃^{-/-}-Keratinozyten gearbeitet werden. Deren Gewinnung stellte sich als sehr schwierig dar, da entweder zu wenig Keratinozyten aus der Haut herausgelöst werden konnten oder diese nicht anwuchsen. Behandlung dieser Zellen mit FTY720-P vor dem Auslösen der Apoptose mit TNF- α / Act hatte keinen Einfluss mehr, was diesen Subtyp als entscheidend markierte (Abb. 24).



Abb. 24: S1P₃-Rezeptorsubtyp ist entscheidend. Humane Keratinozyten wurden nach einer Vorinkubation mit VPC23019 für 30min mit 1 µM FTY720-P für 1h (A) oder S1P₃^(-/-)-Keratinozyten wurden mit 10 µM S1P oder 1 µM FTY720-P für 1h (B) stimuliert und danach mit TNF- α und Actinomycin D für 20h behandelt. Anschließend wurde die Apoptoserate durchflusszytometrisch nach Färbung mit Annexin V und PI bestimmt. Die dargestellten Apoptoseraten sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen ± SD. Die unabhängige Wiederholung der Experimente lieferte gleiche Ergebnisse. *p ≤ 0,05

3.2.4 Mitochondrielles Membranpotential in Keratinozyten

Nachdem in der vorliegenden Arbeit mit Fibroblasten bereits gezeigt werden konnte, dass das mitochondrielle Membranpotential eine entscheidende Rolle spielt, sollte dies nun auch in Keratinozyten untersucht werden. Dazu wurden Keratinozyten mit FTY720-P oder FTY720 vorinkubiert und danach die Apoptose ausgelöst. Wie in Abb. 25 zu erkennen ist, besitzen die Zellen der Kontrolle ein hohes Membranpotential. Nach Stimulation mit TNF- α / Act sinkt dieses ab. Vorstimulation mit FTY720-P sorgte auch in Keratinozyten für eine Stabilisierung des Potentials während FTY720 dazu nicht in der Lage war.



FTY720-P + TNF- α / Act



TNF-α / Act

FTY720 + TNF-α / Act





Abb. 25: Beteiligung des intrinsischen Signalweges der Apoptose. Keratinozyten wurden mit 1 μ M FTY720 oder 1 μ M FTY720-P für 1h behandelt, bevor die Apoptose mit TNF- α und Actinomycin über 20h ausgelöst wurde. Anschließend wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff JC-1 (5 μ g/ml) für 30min angefärbt. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einer 20x Vergrößerung an einem Keyence BZ8000 Fluoreszenzmikroskop gemacht. Rote Punkte in einer Zelle stehen für ein hohes mitochondrielles Membranpotential, während eine diffuse grüne Färbung apoptotische Zellen mit niedrigem Potential markiert. Die unabhängige Wiederholung der Experimente lieferte gleiche Ergebnisse.

3.2.5 Bidirektionales Verhalten von S1P in Keratinozyten

Es konnte bereits gezeigt werden, dass S1P in Keratinozyten die Akt-Kinase über den S1P₂-Rezeptorsubtyp hemmt. Damit bildet S1P einen Gegenspieler zum Insulin, das eine Phosphorylierung von Akt hervorruft. Eine Interaktion dieser beiden Agonisten in Bezug auf die Apoptose lag somit nahe. Von S1P und Insulin ist allerdings bekannt, dass beide für sich antiapoptotische Effekte in Keratinozyten besitzen. Eine mögliche Interaktion sollte nun näher untersucht werden. Als erstes sollte gezeigt werden, ob die Aktivierung von Akt durch Insulin auch für seinen antiapoptotischen Effekt bedeutend ist. Inkubation mit dem PI3K-Hemmstoff LY294002 führte zu einer vollständigen Hemmung des zytoprotektiven Einflusses von Insulin (Abb. 26A). Wurden nun Keratinozyten zuerst mit S1P und dann mit Insulin behandelt, wurde der antiapoptotische Effekt von Insulin abgeschwächt. Vorinkubation mit FTY720-P, das keine Affinität zu S1P₂ besitzt, änderte die Anzahl apoptotischer Zellen nicht (Abb. 26B).



Abb. 26: Interferenz von S1P und Insulin. Keratinozyten mit 50 μ M LY294002 für 30min vorinkubiert und dann mit 1 μ M Insulin für 10min behandelt, bevor die Apoptose mit TNF-a und Actinomycin über 20h ausgelöst wurde (A). Keratinozyten wurden mit 10 μ M S1P für 1h oder mit 1 μ M FTY720-P für 1h behandelt, danach mit 1 μ M Insulin für 15min stimuliert, bevor die Apoptose mit TNF-a und Actinomycin über 20h ausgelöst wurde (B). Anschließend wurde die Apoptoserate durchflusszytometrisch nach Färbung mit Annexin V und PI bestimmt. Die dargestellten Apoptoseraten sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen \pm SD. Die unabhängige Wiederholung der Experimente lieferte gleiche Ergebnisse. *p ≤ 0,05.

3.2.6 Beteiligung der Proteinkinase Cδ am apoptotischen Effekt von S1P

Da in Keratinozyten schon bewiesen wurde, dass S1P über eine Aktivierung der PKCδ zu einer Hemmung der Akt-Kinase führt, war es nun von Interesse zu erfahren, ob diese Isoform der PKC am kontroversen Verhalten von S1P beteiligt ist. Zunächst wurden Keratinozyten mit dem Pan-PKC-Aktivator 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-

acetat (TPA) behandelt. Vorinkubation mit diesem Stoff vor dem Einsatz des Insulins sorgte für eine Abschwächung des zellschützenden Effekts des Wachstumshormons (Abb. 27A). Um die Isoform exakt zu bestimmen, wurde im nächsten Experiment mit Rottlerin gearbeitet. Das ist ein unspezifischer Inhibitor der PKCδ. Vorinkubation mit diesem Stoff führte zu einer Verstärkung des antiapoptotischen Effektes von S1P bzw. einer Verminderung seines hemmenden Einflusses auf das Insulin (Abb. 27B).



Abb. 27: Beteiligung der PKC. Keratinozyten mit 250 nM TPA für 15min vorinkubiert und dann mit 1 μ M Insulin für 10min behandelt, bevor die Apoptose mit TNF- α und Actinomycin über 20h ausgelöst wurde (A). Keratinozyten wurden zunächst mit 10 μ M Rottlerin für 1h inkubiert, dann mit 10 μ M S1P für 1h oder mit 1 μ M FTY720-P für 1h behandelt, danach mit 1 μ M Insulin für 15min stimuliert, bevor die Apoptose mit TNF- α und Actinomycin über 20h ausgelöst wurde (B). Anschließend wurde die Apoptoserate durchflusszytometrisch nach Färbung mit Annexin V und PI bestimmt. Die darge-stellten Apoptoseraten sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen \pm SD. Die unabhängige Wiederholung der Experimente lieferte gleiche Ergebnisse. *p \leq 0,05.

Da die Selektivität von Rottlerin angezweifelt wird, wurde zusätzlich mit siRNA gegen die PKCδ gearbeitet (Soltoff 2007). Das erfolgreiche Silencing wurde mittels Real-Time PCR bestimmt und ist in Abb. 28A dargestellt. Das Ausschalten dieser Isoform ließ die Apoptoserate nach Stimulation mit S1P noch weiter sinken. Ein ähnlicher Effekt war auch bei zusätzlicher Behandlung mit Insulin zu erkennen. S1P war dort nicht mehr fähig, als Gegenspieler für Insulin in Bezug auf die Apoptose zu fungieren (Abb. 28B).



Abb. 28: Beteiligung der PKCδ. Keratinozyten wurden mit Kontroll- oder PKCδ-siRNA behandelt. Die Quantifizierung der spezifischen mRNA-Transkripte erfolgte über eine Real-Time PCR Analyse. Die angegebenen Werte repräsentieren die Mittelwerte ± SD einer Doppelbestimmung normalisiert gegen Cyclophilin A als Referenzgen (A). Nach erfolgter Transfektion wurden Keratinozyten mit 10 μM S1P für 1h stimuliert und dann entweder mit 1 μM Insulin für 15min behandelt oder sofort die Apoptose mit TNF-α / Act ausgelöst. Anschließend wurde die Apoptoserate durchflusszytometrisch nach Färbung mit Annexin V und PI bestimmt. Die dargestellten Apoptoseraten sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen ± SD. Die unabhängige Wiederholung der Experimente lieferte gleiche Ergebnisse. *p ≤ 0,05.

3.3 Einfluss von Estradiol und TGF-β auf die Migration von Brustkrebszellen

3.3.1 Expressionsmuster von Estradiol-sensitiven Rezeptoren

Die klassischen Wege, auf denen Estradiol seine Effekte vermitteln kann, sind gut charakterisiert. Aber neben der Aktivierung von ERE über ERα und ERβ, gewinnen mehr und mehr nicht-genomische Effekte an Bedeutung, die eine viel schnellere Signaltransduktion nach sich ziehen. GPR30 ist als solcher Rezeptor beschrieben worden, der nach Bindung von Estradiol diverse Signalkaskaden zu aktivieren vermag (Thomas et al. 2005). Um herauszufinden, über welchen der genannten Rezeptoren Estradiol seine Effekte ausübt, sollte als erstes ein Rezeptorprofil von den verwendeten Brustkrebszelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 erstellt werden. Das Ergebnis der quantitativen Real-Time PCR ist in Abb. 29 dargestellt. Es konnte hier bestätigt werden, dass in MCF-7 Zellen alle Rezeptoren in großem Ausmaß exprimiert werden. In MDA-MB-231 Zellen dagegen waren der ERα und GPR30 nur in Spuren zu finden (Carmeci et al. 1997).



Abb. 29: Expressionsmuster in Brustkrebszellen. Rezeptorspezifische mRNA-Transkripte von MCF-7 oder MDA-MB-231 Zellen wurden mittels Real-Time PCR quantifiziert. Die angegebenen Werte repräsentieren die Mittelwerte ± SD einer Doppelbestimmung normalisiert gegen Cyclophilin A als Referenzgen (A).

Α

3.3.2 Non-genomische Effekte von Estradiol

Von Estradiol ist bereits bekannt, dass es die Migration von MCF-7 Zellen steigert. Gleichzeitig ist es allerdings in der Lage, die von TGF-β-induzierte Migration zu hemmen. Dem Mechanismus liegt eine Hemmung des durch TGF-ß aktivierten Smad Proteins durch Estradiol zu Grunde (Malek et al. 2006). Da diese Hemmung in einem kurzen Zeitrahmen erfolgt, lag eine Beteiligung von membranständigen Rezeptoren, insbesondere des GPR30-Rezeptors nahe. Im Folgenden sollte nun die Wirkung von Estradiol genauer untersucht werden. Schnell angestoßene Signalwege von Estradiol beinhalten oft die Aktivierung des MAPK-Signalweges. Dies wurde schon in mehreren Studien mit MCF-7 Zellen belegt (Filardo et al. 2000; Imamichi et al. 2005; Zivadinovic and Watson 2005). Darüber hinaus ist schon dokumentiert worden, dass eine Aktivierung von ERK1/2 eine Hemmung von Smad verursachen kann (Kretzschmar et al. 1999). Es war nun also von Interesse zu untersuchen, ob Estradiol über eine GPR30-vermittelte ERK1/2 Aktivierung Smad und dadurch die induzierte Migration hemmen kann. Wie in Abb. 30A zu sehen ist, stimuliert Estradiol konzentrationsabhängig die Phosphorylierung von ERK1/2. Zusätzlich wurde das membranundurchlässige Konjugat E2-BSA verwendet, um eine intrazelluläre Wirkung auszuschließen. Auch E2-BSA war in der Lage eine Phosphorylierung der Kinase hervorzurufen. Darüber hinaus konnte diese Aktivierung mit dem spezifischen MAPK-Inhibitor U0126 verhindert werden (Abb. 30B). Um nun zu prüfen, ob die schon beschriebene Hemmung der Smad-Phosphorylierung durch Estradiol auch durch membranassoziierte Rezeptoren verläuft, wurde wiederum E2-BSA eingesetzt. Smad-Phosphorylierung (Abb. 30C).



Abb. 30: Phosphorylierung von ERK1/2 und Smad2 durch E2 und E2-BSA. MCF-7 Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen Estradiol über 30min stimuliert (A) oder die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen U0126 für 30min vorinkubiert und dann mit 0,01 μ M E2-BSA für 30min stimuliert (B) und anschließend die ERK1/2 Phosphorylierung bestimmt. Die Phosphorylierung von Smad2 wurde nach Vorinkubation von MCF-7 Zellen mit 1 μ M E2 bzw. E2-BSA für 30min und anschließender Stimulation mit 0,5 ng/ml TGF- β für 30min bestimmt (C). Die Versuche wurden zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

3.3.3 Beteiligung $G_{\alpha i}$ -gekoppelter Rezeptoren

Um die Vermutung zu bestätigen, dass Estradiol unabhängig von nukleären ER seine Effekte vermittelt, wurde im nächsten Schritt PTX eingesetzt. Die Hemmung der G_{ai}-Proteine durch PTX führte zu einer Wiederherstellung der TGF- β -induzierten Smad-Phosphorylierung. E2 bzw. E2-BSA waren so in ihrer Eigenschaft gehemmt, die Smad Aktivierung zu verhindern (Abb. 31A/B). Zusätzlich sollte nun untersucht werden, ob die Beteiligung der G-Proteine eine Rolle in der Hemmung der durch TGF- β ausgelösten Migration durch Estradiol spielt. Vorinkubation mit Estradiol führte ebenso zu einer Hemmung der Migration wie die Vorinkubation mit E2-BSA. Wurde allerdings mit PTX vorstimuliert, waren die Zellen wieder in der Lage, auf den Stimulus von TGF- β zu migrieren (Abb. 31C/D).



Abb. 31: Beteiligung von G_{ai} **-Proteinen.** MCF-7 Zellen wurden mit 200 ng/ml PTX für 3h vorinkubiert, mit 1µM Estradiol (A) bzw. E2-BSA (B) für 30min stimuliert und dann mit 1 ng/ml TGF- β versetzt und anschließend die Smad2-Phosphorylierung bestimmt. MCF-7 Zellen wurden mit 200 ng/ml PTX für 3h vorinkubiert und dann mit 1 µM E2 (C) oder mit 1 µM E2-BSA (D) für 30min behandelt. Die Zellen wurden in der oberen Kammer eines Transwellsystems kultiviert. Die untere Kammer enthielt Medium und wurde für die Bestimmung der chemotaktischen Wirkung mit 1 ng/ml TGF- β supplementiert. Nach 5h erfolgte die Auszählung der durch die Membran gewanderten Zellen. Die angegeben Werte sind Mittelwerte \pm SD von Zweifachbestimmungen. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und führte zu vergleichbaren Ergebnissen. * p ≤ 0,05.

3.3.4 Beteiligung des MAPK Signalwegs

In der vorliegenden Arbeit wurde bestätigt, dass Estradiol über membranassozierte Rezeptoren vielfältige Wirkungen ausübt. Einerseits kommt es zu einer Aktivierung von ERK1/2, aber auch zu einer Hemmung von Smad2. Eine mögliche Interaktion sollte nun genauer untersucht werden. Dazu wurden MCF-7 Zellen wieder mit Estradiol bzw. E2-BSA vorstimuliert und dann mit TGF-β behandelt. Zum Vergleich wurde nun aber der MAPK Hemmstoff U0126 eingesetzt. Seine Präsenz führte zu einer Wiederherstellung der TGF-β-induzierten Smad-Phosphorylierung (Abb. 32A/B). Eine Beteiligung am Mechanismus der Migration der Brustkrebszellen
sollte anschließend geprüft werden. Vorstimulation mit U0126 führte auch hier zu einer höheren Migrationsrate durch TGF- β (Abb. 32C/D). Somit konnte gezeigt werden, dass Estradiol über ein G-Protein ERK1/2 zu aktivieren vermag und auf diesem Weg die TGF- β -induzierte Smad-Phosphorylierung sowie die dadurch vermittelte Migration hemmt.



Abb. 32: Beteiligung von des MAPK-Signalweges. MCF-7 Zellen wurden mit 10 μ M U0126 für 30min vorinkubiert, mit 1 μ M Estradiol (A) bzw. E2-BSA (B) für 30min stimuliert und dann mit 1 ng/ml TGF- β versetzt und anschließend die Smad2-Phosphorylierung bestimmt. MCF-7 Zellen wurden mit 10 μ M U0126 für 30min vorinkubiert und dann mit 1 μ M E2 (C) oder mit 1 μ M E2-BSA für 30min behandelt. Die Zellen wurden in der oberen Kammer eines Transwellsystems kultiviert. Die untere Kammer enthielt Medium und wurde für die Bestimmung der chemotaktischen Wirkung mit 1 ng/ml TGF- β supplementiert. Nach 5 h erfolgte die Auszählung der durch die Membran gewanderten Zellen. Die angegeben Werte sind Mittelwerte \pm SD von Zweifachbestimmungen. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und führte zu vergleichbaren Ergebnissen. * p \leq 0,05.

3.3.5 Transfektion und Lokalisierung von GPR30 in MDA-MB-231 Zellen

Über die genaue Beschaffenheit und Lokalisierung des GPR30-Rezeptors wird kontrovers diskutiert. Um nun die Lokalisierung des GPR30-Rezeptors zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenz-Färbungen eingesetzt. Die Untersuchungen zur Genexpression ergaben, dass der GPR30-Rezeptor in MDA-MB-231 Zellen nur in sehr geringen Mengen exprimiert wird. Dies konnte durch Anfärben mit einem spezifischen Anti-GPR30-Antikörper bestätigt werden (Abb. 33, **A**). Für eine Bestimmung des genauen Ortes in der Zelle, wurden MDA-MB-231 Zellen nun mit einem für GPR30-codierenden Plasmid transfiziert. Dann wurden die Zellen gleichzeitig mit einem anti-GPR30-Antikörper und einem KDEL-Marker inkubiert. KDEL ist eine C-terminale Sequenz des endoplasmatischen Retikulums, die durch den fluoreszenzmarkierten Marker sichtbar gemacht werden kann. Nach erfolgter Transfektion ist nun eine starke Expression des GPR30-Rezeptors zu erkennen (rote Punkte, Abb. 33, **B**). Dieser ist mit dem endoplasmatischen Retikulum kolokalisiert (grüne Färbung, **C**), was im Overlay (**D**) durch eine gelbe Färbung dargestellt ist.



anschließend mit Sekundärantikörpern mit unterschiedlichen Fluorophoren (2,5 µg/ml eines Alex Fluor 594 anti-Kaninchen bzw. 2,5 µg/ml eines Alexa Fluor 488 anti-Maus Antikörpers) sowie 1 µg/ml DAPI auf Deckgläschen inkubiert. Diese wurden mit Fluoromount auf Objektträgern fixiert. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einer 20x Vergrößerung an einem Keyence BZ8000 Fluoreszenzmikroskop gemacht. Die unabhängige Wiederholung der Experimente lieferte gleiche Ergebnisse.

4.1 Einfluss von FTY720 auf die Apoptose von Fibroblasten

Die Apoptose von Zellen ist ein essentieller Bestandteil der Entwicklung und der Erhaltung eines Organismus. Wenn man bedenkt, dass ein durchschnittlicher erwachsener Mensch ca. 60 Milliarden Zellen pro Tag bildet, wird die Bedeutung umso klarer, wenn diese Produktion wieder ausgeglichen werden muss. Gleichzeitig besteht natürlich die Gefahr, dass eine Verschiebung dieses Gleichgewichts durch spontane Veränderungen oder den Einfluss exogener Stoffe zur Entstehung von Tumoren beitragen kann (Cotter 2009). Um die Mortalitätsraten von Tumorerkrankten zu senken, geht die Suche nach Zytostatika immer weiter. Als ein potentieller Vertreter wurde das FTY720 zufällig identifiziert. Vorher wurden immunsuppressive Eigenschaften entdeckt, die auf einen Rückgang der peripheren Lymphozyten zurückzuführen waren. Da man von einem apoptotischen Einfluss auf Lymphozyten ausging, wurden im weiteren Verlauf vor allem Krebszellen auf ihre Empfindlichkeit gegenüber FTY720 untersucht. Wie nun aber mittlerweile bewiesen wurde, besitzt dieser Arzneistoff ein vollkommen anderes Wirkprinzip als herkömmliche zur Immunsuppression eingesetzte Arzneimittel. Immunsuppressiva wie Cyclosporin A oder Tacrolimus hemmen über das Interleukin-System die Funktion von Lymphozyten. Andere Arzneistoffe hemmen die Proliferation oder lösen Apoptose von Lymphozyten aus und unterdrücken so eine Immunantwort. FTY720 hingegen sorgt für eine Umverteilung der Lymphozyten in sekundäre Lymphorgane ohne deren Gesamtpopulation zu verändern (Brinkmann et al. 2000; Matloubian et al. 2004). Bis dieser Mechanismus entdeckt wurde, galt die Theorie des apoptotischen Potentials von FTY720.

4.1.1 Apoptotische Eigenschaften von FTY720

Mitte der 90er Jahre wurde das immunmodulatorische Potential von FTY720 entdeckt. Nach Behandlung mit FTY720 stellte man eine stark verringerte Lymphozytenzahl in der Peripherie fest. Als Grund hierfür wurde eine induzierte Apoptose angenommen, da *in vitro* Versuche an Rattenzellen dies zeigten (Suzuki et al. 1996). Noch im selben Jahr wurden weitere Daten veröffentlicht, die diese These untermauerten (Enosawa et al. 1996; Suzuki et al. 1996). Da nun offensichtlich eine neue potentielle zytostatische Substanz gefunden wurde, war es naheliegend, einen

möglichen Einsatz als Tumortherapeutikum zu untersuchen. Dazu wurden zunächst Zellen des Blutsystems getestet. So konnte in HL-60 (Humane promyelozytische Leukämie) Zellen ein apoptotischer Einfluss von FTY720 bestätigt werden. Dieser wurde durch eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und intrazellulärer Ca²⁺-Freisetzung vermittelt und war PTX-unabhängig (Shinomiya et al. 1997). Auch in einer Lymphomzelllinie der Maus konnte ein zytotoxischer Effekt von FTY720 festgestellt werden (Matsuda et al. 1998). Neben der Überprüfung des zytostatischen Potentials war die Aufklärung der beteiligten Signalwege natürlich von großer Bedeutung. Beispielsweise wurden in humanen Jurkat T-Zellen die Caspase 3 und die JNK als Apoptose vermittelnde Signalwege gefunden. Dies konnte durch Aktivierung von ERK unterbunden werden (Matsuda et al. 1999). Die Caspase 3 wurde auch in Zellen des Prostatakarzinoms als beteiligter Faktor identifiziert (Wang et al. 1999; Permpongkosol et al. 2002). Als weitere mögliche Vermittler wurden die Mitochondrien und die Freisetzung von Cytochrom c aus diesen in Lymphozyten gefunden. In diesem Fall konnte eine Überexpression von Bcl-2 die Apoptose verhindern (Nagahara et al. 2000). Ebenfalls im Jahre 2000 gelang es Nagahara et al. die Apoptose von T-Zellen auch in vivo in Ratten und Mäusen nachzuweisen (Nagahara et al. 2000). Im Laufe der Zeit wurden zahlreiche Krebszellen mit FTY720 behandelt und die Ergebnisse hinsichtlich der Apoptose ausgewertet. So konnte in Zellen des multiplen Myeloms (Yasui et al. 2005), des Glioms (Sonoda et al. 2001), der Leber (Lee et al. 2004; Ho et al. 2005; Hung et al. 2008); der Niere (Ubai et al. 2007), der Brust (Azuma et al. 2002; Azuma et al. 2003) sowie der Blase (Tanaka et al. 2002; Azuma et al. 2003) ein zytotoxisches Verhalten von FTY720 gezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Immunmodulator FTY720 näher charakterisiert werden. Daher wurden Fibroblasten und Keratinozyten mit FTY720 stimuliert und die apoptotischen Zellen gemessen. In Übereinstimmung mit der Literatur wurde ebenfalls ein stark zytotoxisches Potential von FTY720 beobachtet. Interessant ist hierbei auch die ausgeprägte Zunahme der Zahl der toten Zellen bei einer Erhöhung der Konzentration von 1 µM auf 10 µM FTY720. Dieser Konzentrationsbereich ist vergleichbar mit denen der Literatur zu entnehmenden Daten. Auch dort wurden zellschädigende Effekte ausschließlich bei Konzentrationen größer 1 µM festgestellt. Von Bedeutung ist hier, dass der Einsatz des phosphorylierten Metaboliten FTY720-P zu keinerlei Reaktion der Zellen führte. Insgesamt wird deutlich, dass FTY720-

relativ unspezifisch ein großes Spektrum an Zellen angreift. Da für S1P ausnahmslos antiapoptotische Effekte beschrieben wurden, stellen diese Ergebnisse einen großen Gegensatz dar.

4.1.2 Antiapoptototische Eigenschaften von FTY720-P

Aufgrund der Ähnlichkeit zum S1P wären eigentlich eindeutige antiapoptotische Eigenschaften von FTY720 zu erwarten gewesen. Das ist eine Haupteigenschaft des Lipidmediators, die über seine Rezeptoren vermittelt wird. Als Metabolit im Sphingolipidstoffwechsel mit biologischen Funktionen war S1P schon bekannt (Hannun and Bell 1989; Merrill and Stevens 1989; Zhang et al. 1991). Dass man zu seinen vielfältigen Effekten auch den Schutz vor dem Zelltod dazu zählen muss, wurde erst in den 90er Jahren entdeckt. So wurde festgestellt, dass S1P in der Lage war, die Ceramid-induzierte Apoptose in HL-60 und U937 Zellen zu hemmen (Cuvillier et al. 1996). Da S1P ein Metabolit des Ceramids darstellt, ist hier klar das Prinzip eines Gleichgewichts in der Zelle zu erkennen. Die Bedeutung von S1P in diesem Zusammenhang konnte in weiteren Studien belegt werden. Experimente an Endothelzellen zeigten, dass TNF-a ebenfalls in dieses empfindliche Gleichgewicht eingreift. So stimuliert TNF- α die Sphingomyelinase und generiert so Ceramid. Gleichzeitig aktiviert es aber auch die SphK und trägt so zur Bildung von S1P bei, welches die Apoptose verhindert (Xia et al. 1999). Neben S1P wurde auch LPA als potenter Mediator von antiapoptotischen Signalen in T-Zellen identifiziert (Goetzl et al. 1999). Es wurde mittlerweile versucht, sich die zellschützenden Eigenschaften des S1P zunutze zu machen. S1P enthaltendes HDL und S1P selbst könnten die kardiotoxischen möglicherweise Nebenwirkungen der Therapie mit Anthracyclinen positiv beeinflussen (Frias et al. 2009).

Auch in der Haut konnten bereits diverse Effekte von S1P beobachtet werden. Über seinen Einfluss auf die Proliferation hinaus ist S1P in der Lage, Melanozyten, Keratinozyten und Fibroblasten vor der Apoptose zu schützen. Dabei stellt es zum Teil den entscheidenden Mediator von Wirkungen anderer Stimuli wie z.B. Calcitriol und Glukokortikoiden dar (Kim et al. 2003; Sauer et al. 2003; Vogler et al. 2003; Sauer et al. 2005; Nieuwenhuis et al. 2009).

Obwohl von S1P nur ein antiapoptotisches Verhalten berichtet wurde, existiert eine Vielzahl an Publikationen über ein zelltoxisches Verhalten von FTY720. Trotzdem

konnten einige Effekte von S1P durch Einsatz von FTY720 imitiert werden. Beispielsweise wurde im Zuge der Aufklärung des Wirkmechanismus von FTY720 als Immunmodulator neben der Umverteilung der Lymphozyten auch eine Stärkung der endothelialen Barriere beobachtet. Neben der Umkehrung der VEGF-induzierten FTY720-P Gefäßpermeabilitätssteigerung konnte Aktund ERK-abhängig Endothelzellen vor der Apoptose schützen (Sanchez et al. 2003). Dies bestätigte das bei S1P beobachtete Verhalten. Unabhängig davon konnte gezeigt werden, dass FTY720 Oligodendrozyten und dessen Vorläuferzellen vor dem Zelltod bewahren kann (Coelho et al. 2007; Miron et al. 2008; Miron et al. 2008). Auch hierbei gingen Experimente mit S1P voraus, die einen antiapoptotischen Effekt des Lipidmediators in Oligodendrozyten offenbarten (Jaillard et al. 2005).

Aufgrund des dokumentierten zytoprotektiven Effektes von S1P in Hautzellen und FTY720 in einigen Zellarten, sollte dieses Potential in Fibroblasten und Keratinozyten untersucht werden. Die Stimulation mit FTY720 vor dem Auslösen der Apoptose mit TNF- α / Act zeigte ein bekanntes Bild. Niedrige Konzentrationen hatten keinen Einfluss, 10 µM allerdings wirkten stark zellschädigend noch über den Effekt von TNF- α / Act hinaus. Ein vollkommen anderes Bild präsentierte sich nach Behandlung der Zellen mit FTY720-P. Hier sorgten bereits Konzentrationen im nanomolaren Bereich für eine signifikante Senkung der Apoptoserate in Fibroblasten und Keratinozyten. Selbst Stimulation mit 10 µM FTY720-P wirkte noch antiapoptotisch. An diesen Ergebnissen wird ganz klar die Bedeutung der Phosphatgruppe ersichtlich. Dass die phosphorylierte Form die eigentliche Wirkform im Organismus darstellt, konnte schon bewiesen werden. Außerdem wurde auch gemessen, dass nur das Phosphat ein Agonist am S1PR ist (Brinkmann et al. 2002). Daher sind Rezeptor-unabhängige Wirkungen für FTY720 denkbar.

4.1.3 Einfluss der Konzentration und der Phosphorylierung

In klinischen Studien wird FTY720 eingesetzt, das dann im Körper phosphoryliert wird. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse in Fibroblasten und Keratinozyten könnte eine nicht stattfindende Umwandlung der Muttersubstanz in sein Phosphat sein. Aus diesem Grund wurde der Metabolismus von FTY720 in der vorliegenden Arbeit untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass zeitabhängig FTY720-P gebildet wurde. Allerdings ist auch zu erkennen, dass die Umwandlung

nicht vollständig war. Die gebildete Menge an FTY720-P sollte aber trotzdem ausreichen, die Apoptose zu verhindern. Da dies aber nicht der Fall war, muss es noch eine andere Erklärung für die gegensätzlichen Wirkungen geben. Wie aus der Literatur zu entnehmen ist, existieren für FTY720 je nach Zelltyp unterschiedliche Berichte hinsichtlich seines Einflusses auf die Apoptose. Auffällig in diesem Zusammenhang ist die verwendete Konzentration für die Versuche. Bei Arbeiten, die FTY720 mit verstärkter Apoptose in Verbindung bringen, lag die verwendete Konzentration stets über 1 µM. Außerdem wurden bei Versuchen mit Tumormodellen ebenfalls Dosierungen verwendet, die weit über denen liegen, die in klinischen Prüfungen am Menschen eingesetzt werden. Üblich sind Dosierungen von 10 mg / kg in Mäusen und Ratten (Lee et al. 2004). Im Gegensatz dazu sind für die immunsuppressive Wirkung FTY720 in Tieren weitaus von geringere Konzentrationen nötig (Nikolova et al. 2001). Außerdem lag die Dosis in den Studien zum Einsatz bei multipler Sklerose bei 0,5 – 1,25 mg für den ganzen Körper (Kappos et al. 2010). Die damit erreichbaren Plasmaspiegel von FTY720 liegen im niedrigen nanomolaren Bereich (Tedesco-Silva et al. 2004). Dass die Konzentration eine wichtige Rolle spielt, konnte auch in SMC demonstriert werden. In diesen konnte nur Konzentrationen über 1 µM Apoptose ausgelöst werden. bei Niedrigere Konzentrationen blieben ohne Effekt (Bohler et al. 2007). Dies untermauert den gefunden Mechanismus, der nicht auf einer gesteigerten Apoptoserate von Lymphozyten beruht.

Noch bevor der Mechanismus von FTY720 aufgeklärt war, gab es schon einen interessanten Bericht über den Effekt von FTY720 in Thymozyten. In diesem wurde festgestellt, dass FTY720 zwar Zellen tötet, allerdings nicht durch Auslösen der Apoptose. Stattdessen wurde eine starke nekrotische Neigung gemessen, die mit einem Anstieg der Permeabilität von intrazellulären Ca²⁺-Speichern sowie der gesamten Zelle einherging. Das deutet auf einen S1PR-unabhängigen Signalweg hin (Oyama et al. 1998). Diese Theorie wurde einige Jahre später bestätigt, als Versuche zur Apoptose mit Analoga von FTY720 durchgeführt wurden. Darin waren beide Enantiomere AAL151 und AAL149 in der Lage, Apoptose in CD4⁺ Zellen auszulösen, obwohl nur das R-Enantiomer AAL151 ein Agonist am S1PR darstellt. Darüber hinaus war es nicht möglich, das Triggern der Apoptose durch PTX zu hemmen (Brinkmann et al. 2001). Ein umfassender Artikel dazu wurde von Nagaoka *et al.* verfasst. Darin wird berichtet, dass die Proliferationshemmung durch FTY720 in

diversen Krebszellen nicht auf die Phosphorylierung zurückzuführen ist, denn Blockade der SphK verstärkte den Effekt sogar noch. Außerdem war synthetisch phosphoryliertes FTY720 zusammen mit S1P nicht in der Lage, die Proliferationsrate zu reduzieren (Nagaoka et al. 2008).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass in der vorliegenden Arbeit FTY720 apoptotisch wirkt, während FTY720-P Zellen vor dem Tod schützt. Wie ist allerdings zu erklären, dass trotz stattfindender Phosphorylierung nach Stimulation mit FTY720 kein antiapoptotischer Effekt messbar ist? Eine mögliche Erklärung könnte die nicht vollständige Umwandlung in das Phosphat sein. Damit würde die zytoprotektive Wirkung von FTY720-P durch die noch vorhandene Ausgangssubstanz nivelliert. Diese Theorie wird durch die Versuche mit SphK2 siRNA gestützt. Zum einen wird das Vorhandensein der SphK2 bestätigt. Zum anderen wird deutlich, dass nach Blockade des entscheidenden Enzyms für die Phosphorylierung FTY720 sein apoptotisches Potential schon bei einer Konzentration von 1 µM entfalten kann.

Die SphK2 stellt ein interessantes Molekül dar. Neben seiner Funktion als Kinase übt es weitere Effekte aus. In NIH 3T3 Fibroblasten führte eine Überexpression mit SphK2 zu einer apoptotischen Reaktion. Diese war unabhängig von S1PR und ging mit einer Komplexbildung mit Bcl-XL einher. Als möglicher Grund wurde ein aus neun Aminosäuren bestehendes Motiv identifiziert, das Ähnlichkeit mit proapoptotischen BH3-only Proteinen zeigt (Liu et al. 2003). Im selben Jahr wurde in Cos-7- und HeLa-Zellen demonstriert, dass Expression von SphK2 zu einer Lokalisierung im Nukleus führt und so die DNA-Synthese gehemmt wird. Die SphK1 dagegen war nur im Zytosol zu finden und stimulierte die DNA-Synthese (Igarashi et al. 2003). In einer weiteren Studie wurden die gegensätzlichen Eigenschaften der SphK bestätigt. In diesem Fall konnte wiederum die Lokalisation der Kinasen als wichtige Ursache identifiziert werden. Zusätzlich wurde für die SphK2 ein positiver Einfluss auf die Ceramid-Synthese gezeigt, während die SphK1 diese hemmte (Maceyka et al. 2005). Darüber hinaus war die SphK2 essentiell für das apoptotische Verhalten von FTY720-Analoga in Jurkat-T-Zellen. Diese wurden allerdings in mikromolaren Konzentrationen eingesetzt (Don et al. 2007). Dagegen werden der SphK1 ausschließlich zellschützende Effekte zugeschrieben. Neben seiner Funktion als Kinase für die Umwandlung von Sphingosin in S1P wurden zahlreiche Proteine (TRAF2, RPK118 und AKAP-related protein) identifiziert, mit denen die SphK1

interagiert und so die Zellen vor der Apoptose schützt (Olivera et al. 1999; Hayashi et al. 2002; Lacana et al. 2002; Xia et al. 2002).

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse belegen die wichtige Funktion der SphK2 als Kinase für die Umwandlung von FTY720 in FTY720-P. Ihre apoptotischen Eigenschaften kommen hier nicht zum Tragen, da die kurzen Stimulationszeiten keinen Raum für Veränderungen in der Genexpression zulassen. Diese wären aber notwendig, um den möglichen proapoptotischen Einfluss erkennen zu lassen.

4.1.4 Beteiligung von S1PR

Über S1P ist bereits bekannt, dass es seine Wirkungen intrazellulär als second messenger ausüben kann. Der Hauptteil wird aber über membranständige Rezeptoren vermittelt. Von allen wurde eine Kopplung an $G_{\alpha i}$ -Proteine berichtet. Mit Ausnahme des S1P₁-Rezeptorsubtyps können die anderen vier Rezeptorsubtypen auch an $G_{12/13}$ oder G_q koppeln und so ihre Signale weiterleiten (Spiegel and Milstien 2003). Um intrazelluläre oder Rezeptor-unabhängige Wirkungen des FTY720-P auszuschließen, wurde in der vorliegenden Arbeit PTX eigesetzt. Vorstimulation mit diesem Stoff führte zu einer kompletten Hemmung des antiapoptotischen Effektes. Das deutet auf eine Interaktion mit einem G_{ai} -gekoppelten Rezeptor hin.

In Bezug auf die antiapoptotischen Effekte sind alle Rezeptoren außer S1P₄ in verschiedensten Zellarten als mögliche Vermittler gefunden worden. Über den S1P₁-Rezeptorsubtyp wurde beispielsweise berichtet, das dieser Schäden durch Hypoxie an Kardiomyozyten der Maus mindern kann (Zhang et al. 2007). Die Bedeutung von S1P₁ ist auch im Prozess der Angiogenese unumstritten. So schützt S1P über diesen Rezeptorsubtyp zusammen mit S1P₃ Endothelzellen vor der Apoptose (Waeber et al. 2004). Ebenso konnte die Vermittlung zytoprotektiver Effekte in intestinalen Epithelzellen durch S1P₁ belegt werden (Greenspon et al. 2009).

Der S1P₂-Rezeptorsubtyp nimmt eine besondere Rolle im Bereich der Zellmotilität ein. So wird nach Aktivierung von S1P₂ die Migration von murinen embryonalen Fibroblasten sowie von VSMCs gehemmt (Goparaju et al. 2005; Takashima et al. 2008). Dass dieser Subtyp auch in der Apoptose eine Rolle spielt, ist erst seit kurzem bekannt. In ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte konnte eine durch S1P₂ vermittelte Senkung der Apoptose gemessen werden (Frias et al. 2009). In einem weiteren Versuch in murinen Kardiomyozyten konnte zusätzlich zum S1P₂-

Rezeptorsubtyp auch S1P₃ gefunden werden (Means et al. 2007). Im Gegensatz dazu wurde von einer anderen Arbeitsgruppe ausschließlich S1P₃ als verantwortlicher Rezeptor in neonatalen Kardiomyozyten der Ratte identifiziert (Theilmeier et al. 2006). Wie man anhand der gegebenen Literatur erkennen kann, scheinen offensichtlich drei S1PR an der zytoprotektiven Wirkung von S1P am Herzen beteiligt zu sein. Das genaue Ausmaß bleibt allerdings unklar. Dass die Effekte von S1P an ein und derselben Zelle über verschiedene Rezeptoren vermittelt werden können, konnte auch in Mesangiumzellen bestätigt werden. Dort waren wieder der S1P₂- und der S1P₃-Rezeptorsubtyp an der Wirkung beteiligt (Katsuma et al. 2002). Diese beiden Rezeptoren scheinen oft im Zusammenspiel zu arbeiten, denn in HTC4 Hepatomzellen konnten ebenfalls beide Rezeptoren für die Hemmung der Apoptose verantwortlich gemacht werden (An et al. 2000). Auffällig ist hier schon die verbreitete Beteiligung des S1P₃-Rezeptorsubtyps. Daher beschäftigen sich die meisten Publikationen in der Fachliteratur mit diesem Subtyp. Er ist an der Vermittlung der antiapoptotischen Effekte des S1P in verschiedensten Zellen beteiligt. In mit S1P₃ stabil transfizierten CHO-Zellen (chinese hamster ovary) war dieser Rezeptor notwendig für die Übermittlung der Signale (Yamada et al. 2004). Darüber hinaus wurde S1P₃ auch in lymphoblastoiden B-Zellen durch Experimente mit Suramin als involvierter Subtyp ausgemacht (Tan et al. 2007). In Myelomzellen konnte ein S1P₃-Antagonist die Bildung antiapoptotischer Bcl-2 Proteine anregen und so Einfluss auf die Apoptose nehmen (Li et al. 2008).

Für die vorliegende Arbeit ist ein weiterer Bericht von Bedeutung. Erst kürzlich wurde festgestellt, dass der S1P₃-Rezeptorsubtyp in durch Dexamethason vor dem Zelltod geschützten humanen Fibroblasten eine große Rolle spielt. Dexamethason induziert in Fibroblasten die Bildung der SphK1, was zu vermehrter Bildung von S1P führt, das dann nach Ausschleusung durch ABC Transporter an seinen membranständigen Rezeptor binden kann (Nieuwenhuis et al. 2009).

Nur sehr wenig ist bisher über S1P₅ veröffentlicht worden. Da dieser Subtyp hauptsächlich im Gehirn exprimiert wird, wurde eine Beteiligung an zellulären Prozessen in diesem Organ vermutet (Meyer zu Heringdorf and Jakobs 2007). Nachdem schon Einflüsse auf die Proliferation und zahlreiche intrazelluläre Signalwege in neuronalen Zellen durch S1P₅ berichtet wurden (Harada et al. 2004; Yu et al. 2004), konnte schließlich eine Beteiligung dieses Subtyps in der zytoprotektiven Wirkung von S1P in Oligodendrozyten gefunden werden (Jaillard et

al. 2005). Darauf aufbauend wurden Versuche mit FTY720 durchgeführt. Der Immunmodulator war ebenfalls in Lage, Oligodendrozyten und deren Vorläuferzellen vor dem Zelltod zu schützen. Interessanterweise vermittelte in den Vorläuferzellen S1P₁ die antiapoptotische Wirkung, während in entwickelten Oligodendrozyten der S1P₅-Rezeptorsubtyp entscheidend war (Miron et al. 2008; Miron et al. 2008).

Nachdem in der vorliegenden Arbeit durch die Versuche mit PTX eine Beteiligung von Rezeptoren gesichert werden konnte, sollten im weiteren Verlauf die genauen Rezeptorsubtypen identifiziert werden. Als erstes konnte durch die Stimulation mit SEW2871 der S1P₁-Rezeptorsubtyp ausgeschlossen werden, da der spezifische Agonist keinerlei Effekt auf die Apoptose hatte. Aufgrund der schon erwähnten Beteiligung von S1P₃ am durch Dexamethason bewirkten Schutz der Fibroblasten und der dominanten Expression dieses Subtyps in diesen Zellen, wurden Experimente mit entsprechenden Antagonisten durchgeführt. Die Ergebnisse der Versuche mit dem S1P_{1/3}-Antagonisten VPC23019 und Suramin deuten ebenfalls auf eine Beteiligung von S1P₃ hin. Auch in Keratinozyten konnte durch Vorstimulation mit VPC23019 die Apoptoserate wieder gesteigert werden. Bestätigt wurden die Resultate durch Untersuchungen mit Knockout-Zellen. Bei den Versuchen mit S1P₃^(-/-)-Fibroblasten konnte kein Einfluss mehr von FTY720-P auf die Apoptose beobachten werden. Vergleichbare Ergebnisse lieferten die Versuche an S1P₃-Knockout-Keratinozyten. Dies bestätigt auch ganz klar die Vermittlung des antiapoptotischen Effekts von FTY720-P durch den S1P₃-Rezeptorsubtyp.

4.1.5 Der PI3K / Akt-Signalweg

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit veranschaulichen das kontroverse Potential von FTY720. Während FTY720 zytotoxisch ohne Beteiligung von Rezeptoren wirkt, konnte der antiapoptotische Effekt eindeutig mit einer Aktivierung des S1P₃-Rezeptorsubtyps in Verbindung gebracht werden. Außerdem wurde eine Kopplung des Rezeptors an $G_{\alpha i}$ -Proteine durch die Versuche mit PTX bestätigt. Der weitere Signalweg war allerdings unklar und sollte identifiziert werden.

Der PI3K / Akt-Signalweg ist der dominante antiapoptotische Signalweg in Zellen. In vielen Tumoren ist dieser Weg verändert, was in einer verstärkten Aktivierung resultiert. Tumoren wachsen und metastasieren dadurch schneller und sind weniger

empfänglich für Chemotherapeutika (Vivanco and Sawyers 2002; Hennessy et al. 2005).

Dass der Lipidmediator S1P ein potentieller Aktivator dieses Signalweges ist, konnte durch Studien an CHO-Zellen gezeigt werden, in die der S1P₃-Rezeptorsubtyp transfiziert wurde (Banno et al. 2001). Aufgrund der beschriebenen Aktivierung von PI3K / Akt in Tumoren folgten darauf Untersuchungen in Ovarialkarzinomzellen. In diesen Zellen ließ sich durch S1P nicht nur eine Aktivierung von Akt, sondern auch von ERK auslösen. Außerdem wurde die proapoptotische Caspase 3 downreguliert (Baudhuin et al. 2002). Auch in Schilddrüsenkrebszellen konnte eine Aktivierung von PI3K / Akt im Prozess der Migration nachgewiesen werden (Balthasar et al. 2006). Eine weitere Verbindung zwischen S1P-induzierter Akt-Aktivierung und Hemmung der Apoptose wurde erst vor kurzem in intestinalen Epithelzellen nachgewiesen (Greenspon et al. 2009). Der dargestellte Wirkmechanismus von FTY720 schließt eine Beteiligung des Endothels mit ein. Daher ist es nicht verwunderlich, dass viele Studien zu Effekten von S1P in Endothelzellen existieren. Beispielsweise konnte eine Beteiligung von Akt in der durch S1P ausgelösten Aktivierung der endothelialen NO Synthase (eNOS) in bovinen Aortenendothelzellen (BAEC) demonstriert werden (Igarashi et al. 2001; Igarashi and Michel 2001). Dazu passt, dass in Endothelzellen der Maus eine Akt-abhängige Synthese von NO gezeigt werden konnte, was in einer Vasorelaxation resultierte (Nofer et al. 2004). Ein interessantes Ergebnis lieferte eine Studie von Baudhuin et al. Die Arbeitsgruppe zeigte eine durch S1P ausgelöste Phosphorylierung von Akt in murinen embryonalen Fibroblasten. Diese war abhängig vom S1P₃-Rezeptorsubtyp, denn in entsprechenden Knockout-Zellen konnte keine Aktivierung von Akt mehr festgestellt werden (Baudhuin et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit kamen ebenfalls S1P₃-Knockout-Fibroblasten der Maus zum Einsatz. Allerdings konnte ganz klar gezeigt werden, dass FTY720 und FTY720-P in diesen Zellen immer noch eine Akt-Phosphorylierung auszulösen vermochten. Das ist ein klarer Gegensatz, der aber damit erklärt werden kann, dass in diesem Forschungsvorhaben adulte Zellen verwendet worden sind. Eine Änderung der Signaltransduktion von embryonalen Zellen zu adulten Zellen ist denkbar.

Trotz der weit verbreiteten Aktivierung von Akt durch S1P existieren andere Berichte. So wirkt S1P antiapoptotisch in humanen embryonalen Stammzellen aber ohne vorhergehende Aktivierung des Akt-Signalweges (Wong et al. 2007). Ein ganz gegensätzliches Bild zeigt sich in humanen Keratinozyten. In diesen Hautzellen

kommt es nach Stimulation mit S1P sogar zu einer Hemmung von Akt (Kim et al. 2004; Schuppel et al. 2008).

Einer Inhibierung dieser wichtigen Signalkaskade folgt oft eine Apoptose der Zelle. So konnte in vielen Zellarten, in denen FTY720 apoptotische Eigenschaften besitzt, eine Hemmung von Akt verzeichnet werden. Belegt wird dies durch Studien an Zellen der Leukämie, des Myeloms, des Pankreaskrebses und des Hepatoms (Matsuoka et al. 2003; Lee et al. 2004; Yasui et al. 2005; Shen et al. 2007). War FTY720 hingegen in der Lage, Zellen vor dem Tod zu schützen, konnte dies mit einer Aktivierung des PI3K / Akt-Signalweges in Verbindung gebracht werden. In Endothelzellen war der antiapoptotische Effekt von FTY720 darauf zurückzuführen (Sanchez et al. 2003). Auch eine Rolle dieses Signalweges im potentiellen kardioprotektiven Effekt des Immunmodulators wurde demonstriert (Egom et al. 2009).

In Übereinstimmung mit der Literatur wurde auch in der vorliegenden Arbeit eine Phosphorylierung von Akt durch beide Formen von FTY720 in Fibroblasten gefunden. Interessanterweise konnte auch in S1P₃-Knockout-Fibroblasten eine deutliche Phosphorylierung durch beide Substanzen gemessen werden. Eine Beteiligung dieses Signalweges am antiapoptotischen Effekt kann damit ausgeschlossen werden. Wie ist dann allerdings das Ergebnis des Versuchs mit LY294002 zu erklären? Eine Hemmung der PI3K durch diesen Stoff blockierte jeglichen Zellschutz von FTY720-P. Genau genommen blockiert LY294002 nur die PI3K und nicht Akt direkt. Durch Blockade der PI3K ist eine Hemmung vieler antiapoptotischer Signalwege denkbar, die sich an die PI3K anschließen würden. Ebenso ist eine von PI3K unabhängige Aktivierung von Akt möglich. Diese Theorie unterstützen Untersuchungen zum zytoprotektiven Verhalten von S1P. In diesen wurde eine PI3K-abhängige, aber Akt-unabhängige Vermittlung des Effekts gefunden (Grey et al. 2002; Zheng et al. 2006). Zusätzlich konnte in der vorliegenden Arbeit die Akt-Phosphorylierung durch den selektiven S1P₁-Agonisten SEW2871 stimuliert werden. Dieser hatte aber auf die Apoptose keinen Einfluss.

4.1.6 Der ERK-Signalweg

Neben der Signaltransduktion durch PI3K / Akt, spielt der MAPK-Signalweg eine große Rolle in der Regulation der Apoptose. Auch diese Signalkaskade kann durch S1P angestoßen werden. Eine Aktivierung von ERK durch den Lipidmediator wurde

in HUVEC gezeigt und damit ein Teil des Mechanismus der angiogenetischen Wirkung von S1P aufgeklärt (Lee et al. 1999). Darüber hinaus konnte in verschiedenen Zellen der ERK-Signalweg als entscheidend in der Vermittlung der zytoprotektiven Wirkung identifiziert werden. Dies gelang in Zellen des Hepatoms (An et al. 2000), in Melanozyten (Kim et al. 2003) und humanen embryonalen Stammzellen (Wong et al. 2007).

Im Gegenzug wird diese Signalkaskade oft gehemmt, wenn zytotoxische Substanzen ihre Wirkung entfalten. Auch für das apoptotische Verhalten von FTY720 konnte dies belegt werden. In Leukämiezellen war der durch FTY720 ausgelöste Zelltod mit einer verringerten Phosphorylierung von ERK verknüpft (Li et al. 2004). In der Brustkrebszelllinie MCF-7 wurde dies differenzierter betrachtet. Nur der Einsatz von FTY720 führte zu einer Hemmung von ERK und damit verbundener Proliferationshemmung. FTY720-P übte diesen Effekt nicht aus (Nagaoka et al. 2008). Zusätzlich war es durch Expression von dauerhaft aktiver ERK möglich, die FTY720-induzierte Apoptose in Jurkat T-Lymphozyten zu hemmen (Matsuda et al. 1999). Ein etwas anderes Bild stellte sich in Glattmuskelzellen (SMC) dar. In diesen Zellen erfolgte zwar eine Inhibierung der ERK-Phosphorylierung durch FTY720, allerdings war diese nur für die Proliferationshemmung verantwortlich. Für die Apoptose oder Nekrose spielte dies keine Rolle (Bohler et al. 2009).

Vergleichbar mit der Menge an Literatur über die Aktivierung von Akt, gibt es auch in Bezug auf den MAPK-Signalweg nur wenige Berichte. Der in Endothelzellen beobachtete antiapoptotische Effekt von FTY720 geht nicht nur mit einer Aktivierung von Akt, sondern auch von ERK einher (Sanchez et al. 2003). Ebenso wird beim FTY720-vermittelten Schutz in Oligodendrozyten die MAPK-Signalkaskade aktiviert (Coelho et al. 2007). Astrozyten stellen einen weiteren Vertreter von Nervenzellen dar, in denen eine Phosphorylierung von ERK und damit verbundene Aktivierung dieses Signalweges durch FTY720 nachgewiesen werden konnte (Osinde et al. 2007).

4.1.7 Der mTOR-Signalweg

Mit dem mTOR-Signalweg ist in den letzten Jahren ein weiterer Weg in den Fokus der Forschung gerückt, der in das Überleben der Zelle betreffender Prozesse eingreift. Über den mTOR-Signalweg ist ebenfalls bekannt, dass er in Tumoren sehr

stark aktiv ist. Besonders in Tumoren der Niere konnte eine Beteiligung von mTOR mit schlechten Prognosen in Verbindung gebracht werden (Chiang and Abraham 2007). Nach Identifizierung als potentielles Target für die Tumortherapie, begann die Suche nach geeigneten Arzneimitteln. Schließlich wurde 2007 Temsirolimus (Torisel[®]) als erster Vertreter der mTOR-Inhibitoren für die Therapie von Nierenzellkarzinomen zugelassen (Hudes et al. 2007; Motzer et al. 2007). Im Jahre 2009 folgte dann Everolimus (Afinitor[®]) zur Therapie des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms nach Versagen einer Therapie mit Sunitinib oder Sorafenib (Motzer et al. 2008).

Die vielfältigen Eigenschaften von S1P beinhalten auch eine Aktivierung der mTOR-Signalkaskade. Beispielsweise konnte in NIH 3T3 Clone 7 Fibroblasten eine durch S1P gesteigerte DNA Synthese mit Hilfe von Rapamycin gehemmt werden (Chung et al. 1997). Zwei Jahre später wurde im gleichen Zelltyp ebenfalls eine Beteiligung von mTOR gefunden. In dieser Studie konnte das mitogene Potential von S1P durch Ethanol verstärkt werden. Gleichzeitig resultierte eine Hemmung des MAPK-Signalweges durch PD98059 und eine Hemmung von mTOR durch Rapamycin in einer verringerten Proliferation (Huang et al. 1999). In SMC und Osteoblasten war S1P ebenfalls in der Lage, den mTOR-Signalweg zu aktivieren. Bei ersteren stimulierte S1P so die Proliferation. In Osteoblasten konnte aber keine Verbindung zum antiapototischen Effekt hergestellt werden (Kluk and Hla 2001; Grey et al. 2002). Erst kürzlich wurde eine S1P-vermittelte mTOR-Aktivierung in verschiedenen Zellen gefunden. Interessanterweise war diese aber unabhängig von einer vorhergehenden Stimulation von PI3K, Akt oder ERK. Als Mechanismus wird eine Beteiligung der E3-Ubiquitinligase PAM (Protein Associated with Myc) beschrieben, die ihrerseits den mTOR-Aktivator Rheb aktiviert (Maeurer et al. 2009). Von FTY720 ist bisher erst eine Interaktion mit diesem Signalweg dokumentiert worden. In Jurkat T-Zellen führt Stimulation mit FTY720 zu einer Abnahme der Phosphorylierung von p70S6K (Matsuoka et al. 2003). Aufgrund der scheinbar seltenen Interaktion von FTY720 und dem mTOR-Signalweg wird deshalb eher ein Einsatz von FTY720 als Kotherapeutikum mit Everolimus oder Temserolimus in der Tumortherapie oder zur Verhinderung der Transplantatabstoßung diskutiert (Schmid et al. 2005; Pan et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde FTY720 im Hinblick auf eine mögliche Aktivierung von mTOR und seine Beteiligung am antiapoptotischen Effekt untersucht. FTY720

war ebenso wie die phosphorylierte Substanz in der Lage, das Signalprotein mTOR zu phoshorylieren. Der unwirksame Einsatz von Rapamycin und die ebenfalls stattfindende Phosphorylierung von mTOR in S1P₃-Knockout-Fibroblasten schließen auch diesen Signalweg aus.

4.1.8 Beteiligung von NO

NO ist ein Radikal mit vielfältigen Funktionen im menschlichen Körper. Es stellt einen Transmitter dar, der seine Wirkungen nach Bindung an cGMP vermittelt. Die wichtigste Aufgabe ist die Regulation des Gefäßtonus. NO hat Einfluss auf den Blutdruck, da es von Endothelzellen gebildet wird und glatte Muskelzellen der Gefäße relaxiert. Ursprünglich wurde dieser Botenstoff als *endothelialium derived relaxing factor* bezeichnet, bevor die wahre Identität geklärt wurde (Furchgott and Zawadzki 1980; Ignarro et al. 1987; Yetik-Anacak and Catravas 2006). NO wird durch eine von NOS katalysierte Umsetzung von L-Arginin in L-Citrullin gebildet. Dabei existieren drei Isoformen der NOS, die sich durch die gebildete Menge an NO und ihre Lokalisation im Körper unterscheiden: die endotheliale NOS (eNOS), die induzierbare NOS (iNOS) und die neuronale NOS (nNOS) (Marletta 1993; Alderton et al. 2001).

Neben der kardiovaskulären Funktion, übt NO auch diverse Effekte in der regulation von Zellfunktionen der Haut aus. Die Bedeutung im Prozess der Wundheilung wurde eindeutig belegt. So wurden erhöhte NO-Spiegel sowie gesteigerte Expressionsraten der NOS in Wunden gemessen (Schaffer et al. 1997; Cals-Grierson and Ormerod 2004). Untersuchungen zum Einfluss von NO auf die Apoptose von Zellen offenbarten bidirektionale Effekte. In niedrigen Konzentrationen schützt NO Zellen vor der Apoptose, während es in hohen Konzentrationen diese schädigt und Apoptose auslöst (Kroncke et al. 1997; Krischel et al. 1998; Weller et al. 2002).

Speziell für Keratinozyten wurden die antiapoptotischen Eigenschaften des NO gut dokumentiert. Als möglicher Mechanismus wurde eine NO-abhängige Bildung von Bcl-2 postuliert (Suschek et al. 1999; Weller et al. 2003; Yamaoka et al. 2004).

Auch in Fibroblasten konnten die iNOS und eNOS nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde in Fibroblasten aus hypertrophen Narben eine verringerte Expression der iNOS und damit ebenfalls verringerte Bildung von NO dokumentiert. Die niedrigen NO-Spiegel begünstigen in diesem Fall die stärkere Proliferation und

gesenkte Apoptose (Wang et al. 1996; Wang et al. 1997). Vom S1P selbst existieren nur wenige Berichte, aber auch vom Sphingolipid konnten NO-abhängige antiapoptotische Eigenschaften in HUVEC gezeigt werden (Kwon et al. 2001). Darüber hinaus wurde eine verstärkte Expression der iNOS in der Psoriasis nachgewiesen (Bruch-Gerharz et al. 1996). Da in psoriatischen Läsionen aber gleichzeitig die Arginase 1 überexprimiert und dadurch das Substratangebot für die iNOS gesenkt wird, resultiert ein proliferationsfördernder Effekt (Bruch-Gerharz et al. 2003).

Ein mit dem NO vergleichbarer konzentrationsabhängiger Effekt wurde in der vorliegenden Arbeit auch von FTY720 gezeigt. Daher war eine Untersuchung dieses Botenstoffs notwendig. Der Versuch mit dem NOS-Inhibitor L-NAME zeigte aber keine Beteiligung dieses Signalweges am antiapoptotischen Effekt von FTY720-P.

4.1.9 Beteiligung der Mitochondrien

Die bisher erhaltenen Ergebnisse schließen die klassischen extrinsischen Signalwege aus. Daher lag der Fokus im Folgenden auf dem intrinsischen Signalweg. Aufgrund der bekannten Verbindung zwischen extrinsischem und intrinsischem Signalweg über die Caspase 8, tBid, Proteine der Bcl-2 Familie und schließlich der Mitochondrien ist eine gemeinsame Handlung im durch FTY720 ausgelösten apoptotischen Prozess denkbar. Möglich ist aber auch eine separate Aktivierung des intrinsischen Weges (Ly et al. 2003).

Dass das mitochondrielle Potential entscheidend an der Apoptose beteiligt sein kann, wurde schon in verschiedenen Zellen demonstriert. Die Zellen der Haut bilden hier keine Ausnahme. Beispielsweise führt hexavalentes Chrom zu einem Absinken von $\Delta \psi_m$ in Fibroblasten (Rudolf et al. 2005). Auch Stimulation mit Anthralin lässt $\Delta \psi_m$ in Keratinozyten sinken (McGill et al. 2005). Im Hinblick auf die Entstehung von Hautkrebs ist zu erwähnen, dass eine Exposition von Fibroblasten und Keratinozyten der UVB-Strahlung zum Zusammenbruch des Membranpotentials führt (Wang et al. 2003; Paz et al. 2008). Auch der Sphingolipidsignalweg kann die Funktion der Mitochondrien beeinflussen. So wurde von Sphingosin nachgewiesen, dass es Poren in isolierten kardialen Mitochondrien bildet und so das Membranpotential senkt (Hassoun et al. 2006). So resultierte eine Hemmung der SphK durch N,N-Dimethylsphingosin und eine damit verbundene Verschiebung des Gleichgewichts

Richtung Sphingosin in Prostatakarzinomzellen oder Leukämiezellen in einem Abfall von $\Delta \psi_m$ (Leroux et al. 2007; Kim et al. 2009).

Aufgrund des unspezifischen apoptotischen Effekts von FTY720 war es nicht überraschend, dass auch der Immunmodulator in der Lage war, das mitochondrielle Membranpotential zu senken. In Jurkat T-Zellen führte neben der Hemmung von anderen antiapoptotischen Signalwegen die Stimulation mit FTY720 zu einer Abnahme von $\Delta \psi_m$ (Fujino et al. 2001). In Zellen des multiplen Myeloms konnte ein ähnliches Verhalten von FTY720 bewiesen werden (Yasui et al. 2005). AAL ist ein Analogon des FTY720, von dem ebenfalls eine Schädigung der Mitochondrienfunktion in Jurkat T-Zellen berichtet wurde (Don et al. 2007). Interessant ist ein Bericht von Nagahara et al., in dem der Mechanismus genauer untersucht wurde. Dort wurde gezeigt, dass FTY720 spezifisch Mitochondrien angriff, während andere Zellorganellen intakt blieben (Nagahara et al. 2000). Das deutet wiederum auf einen S1PR-unabhängigen Wirkmechanismus von FTY720 hin.

Genauso wie verschiedene Substanzen $\Delta \psi_m$ senken können, existieren auch Berichte über gegenteilige Effekte. Speziell verschiedene Wachstumsfaktoren, die mit antiapoptotischen Wirkungen in Verbindung gebracht wurden, seien hier genannt. EGF beispielsweise blockierte die TGF- β -induzierte Apoptose in Hepatozyten der Ratte durch eine Stabilisierung von $\Delta \psi_m$ (Fabregat et al. 2000). Auch eine Aktivierung von IGF-I in vaskulären Endothelzellen verhindert das durch hohe Glukosespiegel ausgelöste Absinken von $\Delta \psi_m$ (Li et al. 2009). Der in Fibroblasten beschriebene Effekt der UVB-Strahlung kann durch ein Polypeptid aus der Muschel Chlamys farreri gehemmt werden (Wang et al. 2003).

Vor kurzem ist erstmals beschrieben worden, dass der Lipidmediator S1P in humanen Neuroblastomzellen das Membranpotential stabilisiert (Agudo-Lopez et al. 2010). Zusätzlich konnte in dermalen Fibroblasten demonstriert werden, dass die antiapoptotische Wirkung von Dexamethason unter anderem auf eine S1P-abhängige Stabilisierung von $\Delta \psi_m$ zurückzuführen ist (Nieuwenhuis et al. 2009). Damit fügen sich die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse gut in die Literatur ein. Durch TNF- α / Act wurde die Apoptose ausgelöst, was mit einem Absinken des Membranpotentials einherging. Vorstimulation mit FTY720-P blockierte diesen Vorgang. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung entscheidend ist, denn Vorstimulation mit FTY720 hatte keinen Einfluss. Das stellte den ersten messbaren Unterschied zwischen diesen beiden Substanzen dar, denn in

vorangegangenen Experimenten zeigten beide übereinstimmende Ergebnisse. Zusätzlich zeigen die Versuche an S1P₃^(-/-) Zellen, dass der S1P₃-Rezeptorsubtyp essentiell für die Vermittlung dieser Wirkung ist.

4.1.10 Einfluss von Bcl-2

Nachdem die Beteiligung der Mitochondrien nachgewiesen werden konnte, wurde ein weiteres Protein des intrinsischen Signalweges untersucht. Das Bcl-2 Protein ist ein Mitglied der antiapoptotischen Proteine der Bcl-2 Familie. Es ist in der Lage, proapoptotische Mitglieder zu binden und zu inaktivieren (Wang 2001). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Bcl-2 das mitochondrielle Membranpotential stabilisiert (Shimizu et al. 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde ein antiapoptotischer Effekt von FTY720-P schon innerhalb einer Stunde gemessen. In diesem Zeitraum ist eine Genregulation unwahrscheinlich. Daher wurde die Phosphorylierung von Bcl-2 bestimmt, denn diese ist essentiell für das antiapoptotische Potential von Bcl-2 (Ito et al. 1997). In diesem Zusammenhang konnte in einer humanen Lymphomzelllinie festgestellt werden, dass die Phosphorylierung von Bcl-2 wichtig für die Apoptoseresistenz war (Murata et al. 1997). Der Status der Phosphorylierung von Bcl-2 war ebenfalls in der Hemmung der durch Dexamethason ausgelösten Apoptose in T-Lymphozyten von Bedeutung (Huang and Cidlowski 2002).

Dass eine vermehrte Bildung von Bcl-2 mit einer geringeren Apoptoseneigung einhergeht, ist bereits länger bekannt. Beispielsweise verhinderten hohe Glukosespiegel in VSMC die Apoptose. Dieser Effekt wurde durch eine Hochregulation von Bcl-2 und Bcl-XL vermittelt (Li et al. 2005). Erst kürzlich wurde noch einmal die Bedeutung von Bcl-2 in Bezug auf $\Delta \psi_m$ belegt. Eine Überexpression des antiapoptotischen Proteins verhinderte den Zusammenbruch von $\Delta \psi_m$ in murinen embryonalen Fibroblasten (Gupta et al. 2010). Im Umkehrschluss bedeutet eine Hemmung oder Downregulation von Bcl-2 eine erhöhte Apoptoserate. Auch von FTY720 ist eine Hemmung von Bcl-2 berichtet worden. Dies wurde z.B. in einem murinen Prostatakrebsmodell gezeigt (Chua et al. 2005). Auch in Pankreaskrebszellen ist die apoptotische Wirkung von Bcl-2 mit einer Hemmung von Bcl-2 begründet worden (Shen et al. 2007). In humanen Nierenkrebszellen war die FTY720-vermittelte Apoptose ebenfalls abhängig von Bcl-2 (Ubai et al. 2007). Darüber hinaus konnte in Jurkat T-Zellen die durch FTY720 ausgelöste

Downregulation von Bcl-2 und die damit verbundene Apoptose durch Überexpression von Bcl-2 wieder rückgängig gemacht werden (Suzuki et al. 1996). Eine Überexpression von Bcl-2 konnte ebenso in T-Zellen das Membranpotential wiederherstellen und die Apoptose durch FTY720 verhindern (Nagahara et al. 2000; Fujino et al. 2001).

Von S1P existieren ebenfalls Berichte über Interaktionen mit den Proteinen der Bcl-2 Familie. Aufgrund der antiapoptotischen Eigenschaften des Lipidmediators waren eher positive Einflüsse auf Bcl-2 zu erwarten. So ist nachgewiesen worden, dass apoptotische Jurkat T-Zellen S1P freisetzen, das das Überleben von Makrophagen durch Hochregulation von Bcl-2 und Bcl-XL sichert (Weigert et al. 2006). In einer Zelllinie des Lymphoblastoms konnte zwar keine Steigerung der Expression von Bcl-2 durch S1P gezeigt werden, aber eine verringerte Expressionsrate des proapoptotischen Proteins Bax wurde gefunden (Goetzl et al. 1999). In diesem Zusammenhang ist auch die antiapoptotische Wirkung von Calcitriol in dermalen Zellen interessant. In Fibroblasten und in Keratinozyten führte eine Stimulation mit Calcitriol zu einer Bildung von S1P. Dieses stimulierte dann die Genexpression von Bcl-2 (Manggau et al. 2001; Sauer et al. 2005). Ausgehend von der Literatur war es naheliegend, die Beteiligung von Bcl-2 in der vorliegenden Arbeit zu untersuchen. Bei den Western Blot-Experimenten zur Phosphorylierung von Bcl-2 konnte nun auch ein Unterschied beobachtet werden. FTY720-P sorgte für eine starke Zunahme der Phosphorylierung, während diese nach Stimulation mit FTY720 weniger stark ausgeprägt war. Die Versuche mit S1P₃-Knockout-Fibroblasten bestätigten die Ergebnisse zu $\Delta \psi_m$. Auch hier fand keine Phosphorylierung nach Stimulation mit FTY720 oder FTY720-P mehr statt.

Wie wird nun aber Bcl-2 aktiviert, obwohl viele Signalwege, die in Frage kämen, ausgeschlossen worden sind? Da in der vorliegenden Arbeit keine Genregulation von Bcl-2 aufgrund der kurzen Stimulationszeit zu erwarten war und deswegen die Phosphorylierung gemessen wurde, sind folgende Berichte von Bedeutung. Die beschriebenen Phosphorylierungen konnten unter anderem durch Aktivatoren der PKC hervorgerufen werden, was mit einer Hemmung der Apoptose einherging (May et al. 1994; Ito et al. 1997; Murata et al. 1997). Von der PKC existieren zahlreiche Isoformen, die teilweise gegensätzliche Effekte auslösen. Jedoch konnten hauptsächlich die antiapoptotischen Isoformen α und ε in Fibroblasten identifiziert werden (Hoppe et al. 2001; Bogatkevich et al. 2005; Wang et al. 2007). Gleichzeitig

wurde eine Hemmung der PKCδ mit einem Akt-unabhängigen antiapoptotischen Effekt in Fibroblasten der Ratte in Verbindung gebracht (Zhong et al. 2002).

Für die Aktivierung der PKC stehen verschieden Wege zur Verfügung. Zum einen wurde eine indirekte Aktivierung durch die PLC beschrieben. Aktivierung dieser führt zur Bildung verschiedener Inositolphosphate und von DAG, welches die PKC aktiviert. Auch die PDK1 ist in der Lage, die PKC zu aktivieren. Darüber hinaus scheint eine weitere Möglichkeit sehr interessant. Eine Aktivierung der PI3K führt zu einer Bildung von PIP₂ und PIP₃. Diese können wiederum ihrerseits die PKC aktivieren. Dies stellt einen Weg dar, der PI3K-abhängig, aber Akt-unabhängig abläuft (Singh et al. 1993; Toker et al. 1994; Palmer et al. 1995). Da der Einsatz von LY294002 in der vorliegenden Arbeit die antiapoptotische Wirkung von FTY720-P vollständig verhinderte, aber gleichzeitig die Phosphorylierung von Akt nicht entscheidend war, könnte dieser Mechanismus eine mögliche Erklärung für die Aktivierung von Bcl-2 darstellen.

4.1.11 Bedeutung und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen deutlich das zweiseitige Bild von FTY720. Konzentrationen über 1 µM der nicht phosphorylierten Substanz lösen in Fibroblasten und Keratinozyten Apoptose aus. Liegt FTY720 als Phosphat vor, schützt es Zellen vor der Apoptose. Dies ist ein interessantes Phänomen, da FTY720 im therapeutischen Konzentrationsbereich eingesetzt wird, das dann erst in vivo phosphoryliert wird. Für den Einsatz als Immunmodulator könnte theoretisch sofort FTY720-P eingesetzt werden. Damit würden allerdings gleichzeitig die antiapoptotischen Eigenschaften mehr Bedeutung erlangen. Vielleicht nicht für die gewünschte Wirkung, aber für das Nebenwirkungsprofil könnte dieser Punkt wichtig sein. Die Zulassung für FTY720 zur Behandlung der multiplen Sklerose ist in diesem Jahr zu erwarten. Die Studien, die die Grundlage für die Zulassung bilden sollen, fanden in einem Zeitraum statt, der keine Aussagen über die Entstehung von Krankheiten mit langsamer Progression zulässt. In der Gruppe der Personen, die mit FTY720 behandelt wurden, gab es zwar tatsächlich schon Meldungen über das Auftreten von Hautkrebs, eine Signifikanz konnte aber nicht festgestellt werden (Cohen et al. 2010). Da auch die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse ein tumorigenes Potential vermuten lassen, sind Langzeitstudien unumgänglich.

Zwar existieren Studien zum Einsatz von FTY720 als Zytostatikum, allerdings in erwähnten mikromolaren Konzentrationen. Der Einsatz bei hyperproliferativen Hauterkrankungen ist daher theoretisch denkbar, aber die unspezifische zytotoxische Wirkung lässt keine Empfehlung in dieser Hinsicht zu. Im Gegensatz dazu ist eine mögliche Behandlung von Wundheilungsstörungen, wie z.B. Dekubitus, schon eher eine Option. Eine topische Applikation wäre in diesem Fall vorzuziehen, da somit die immunsuppressiven Eigenschaften nach systemischer Gabe verringert würden. Schlecht heilende Wunden stellen einen möglichen Eintrittsort für verschiedene Keime dar, so dass eine Unterdrückung der Immunantwort nicht wünschenswert ist.

4.2 Einfluss von S1P und Insulin auf die Apoptose von Keratinozyten

4.2.1 Interaktion von S1P und Insulin in Keratinozyten

Wie bereits einleitend erwähnt, sind Insulin und IGF-I sehr wichtige Regulatoren der Proliferation und der Differenzierung von Keratinozyten (Wertheimer et al. 2000; Sadagurski et al. 2006). Dies hat weitreichende Folgen, denn eine Wirkverstärkung dieser beiden Wachstumsfaktoren kann zu Hyperplasie oder sogar zur Entstehung von Tumoren der Haut beitragen (Giovannucci 1999; DiGiovanni et al. 2000). Diese experimentellen Ansätze konnten bereits durch histologische Präparate von gesunden und psoriatischen Patienten bestätigt werden. Bei Letzteren wurde eine erhöhte Expression des IGF-I Rezeptors gefunden (Hodak et al. 1996). Diese Resultate stimmen mit früher erhaltenen Ergebnissen überein. Dort wurde festgestellt, dass Zellen von psoriatischen Patienten empfänglicher für die von IGF-I Signale waren. In Zellen von gesunden Spendern war die vermittelten Proliferationsrate normal (Ristow 1993). Neben der veränderten Proliferation sind auch Einflüsse auf die Apoptose bekannt geworden. Keratinozyten aus psoriatischen Läsionen zeigten eine geringere Apoptoseneigung als gesunde Keratinozyten (Raj et al. 2006). Man hat bereits versucht, sich dieses Wissen zu nutze zu machen. In einem murinen Psoriasis-Modell konnte durch Einsatz von Antisense Oligonukleotiden gegen den IGF-I Rezeptor die Hyperplasie normalisiert werden (Wraight et al. 2000).

Der PI3K / Akt-Signalweg ist der wichtigste Weg für die Signaltransduktion von Insulin oder IGF-I (Avruch 1998; Lawlor and Alessi 2001). Diese Signalkaskade von Insulin über PI3K bis hin zu Rac1 ist essentiell für die Re-Epithelialisierung und die Reifung von Wunden. Das konnte speziell für die durch Insulin induzierte Migration von Keratinozyten gezeigt werden (Liu et al. 2009). Dass eine Veränderung in diesem Signalweg mit einem höheren Krebsrisiko verbunden ist, wurde eingangs erläutert. Dies wurde sogar spezifisch für Hautkrebs demonstriert, da die Tumorbildung in einem Hautkrebsmodell der Maus durch Akt verstärkt worden war (Segrelles et al. 2002). Auch bei einer weiteren hyperproliferativen Hauterkrankung, der Psoriasis, spielt die Proteinkinase Akt eine entscheidende Rolle. Im Vergleich zu gesunder Haut wurde eine erhöhte Aktivierung von Akt in psoriatischen Läsionen gefunden (Rosenberger et al. 2007). In diesem Zusammenhang war es nicht überraschend. dass die durch UVB-Strahlung ausgelöste Apoptose von Keratinozyten durch Akt verzögert werden kann (Claerhout et al. 2007).

Nichtsdestotrotz sind auch Signalwege bekannt geworden, die die Zellen vor dem Tod schützen, aber ohne Beteiligung von Akt auskommen. So übte IGF-I in Fibroblasten einen erwarteten antiapototischen Effekt aus. Dieser kann allerdings über Akt-abhängige und Akt-unabhängige Wege vermittelt werden (Kulik and Weber 1998). Auch in Keratinozyten ist ein ähnliches Phänomen beschrieben worden. Stimulation mit EGF führte zu einer Stimulation von BcI-XL und damit verbundenem Zellschutz ohne eine Beteiligung des Akt-Signalweges (Jost et al. 2001). Weiterhin ist Calcitriol in der Lage, Keratinozyten vor der Apoptose zu schützen. Dies erfolgt über eine vermehrte Produktion von S1P, dem eigentlichen Agens. Dabei kommt es zu einer gesteigerten Bildung von BcI-2 (Manggau et al. 2001). Diese Prozesse laufen sehr wahrscheinlich Akt-unabhängig ab, da von Calcitriol schon ein hemmender Einfluss auf die Akt-Phosphorylierung in Zellen des Plattenepithelkarzinoms festgestellt wurde (Bernardi et al. 2002). Bestätigt wurde dies durch den Nachweis, dass Calcitriol Keratinozyten eher durch eine Hemmung der p38 MAPK und der JNK vor der Apoptose bewahrt (Diker-Cohen et al. 2006).

In der Literatur sind S1P und Insulin als potente Aktivatoren des PI3K / Akt-Signalweges beschrieben. Daher ist eine Interaktion dieser beiden Substanzen denkbar. Interessanterweise existieren bisher nur wenige Berichte, die eine Interaktion darlegen. Außerdem handelt es sich jeweils um einen hemmenden Einfluss von S1P auf die Wirkungen von Insulin oder IGF-I. So führte eine Stimulation

mit S1P zu einer Inhibierung der IGF-I-induzierten Migration von C2C12 Myoblasten (Becciolini et al. 2006). Des Weiteren konnte von S1P eine Hemmung auf die Insulininduzierte Leptin-Freisetzung in Adipozyten der Ratte gezeigt werden (Jun et al. 2006). Für die vorliegende Arbeit sind drei weitere Publikationen von Bedeutung. So wurde erstmals eine Verringerung der Akt-Phosphorylierung mit einhergehender Senkung der Proliferation nach Stimulation mit S1P in Keratinozyten beobachtet (Kim et al. 2004). Dies wurde einige Jahre später bestätigt. Der entscheidende Rezeptor für die Blockade der Insulin-induzierten Akt-Phosphorylierung war S1P₂ (Schuppel et al. 2008). Darüber hinaus wurde erst kürzlich berichtet, dass eine Blockade des S1P₂-Rezeptorsubtyps zu einer verringerten Apoptose in β -Zellen des Pankreas führt (Imasawa et al. 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion von Insulin mit S1P in Bezug auf die Apoptose untersucht. Insulin und S1P waren beide für sich in der Lage, Keratinozyten vor der Apoptose zu schützen. Der zellschützende Effekt des Insulins konnte durch Vorinkubation mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 vollständig aufgehoben werden, wodurch eine Beteiligung dieses Signalweges deutlich wird. Wurde im Gegensatz dazu mit S1P vorstimuliert und dann mit Insulin behandelt, war der antiapoptotische Effekt des Insulins verringert. Der Immunmodulator FTY720-P hatte diesen Einfluss nicht. Die Erklärung dafür ist dessen nicht vorhandene Affinität zum S1P₂-Rezeptorsubtyp. Der Grund für die verringerte antiapoptotische Potenz des Insulins ist die durch S1P-induzierte Hemmung der Proteinkinase Akt. Der restliche antiapoptotische Effekt von S1P liegt möglicherweise in einer von Akt-unabhängigen Stimulation von Proteinen der Bcl-2 Familie begründet.

4.2.2 Beteiligung der PKC

Die beobachtete Interaktion zwischen S1P und Insulin wurde nun in der vorliegenden Arbeit genauer charakterisiert. Dazu wurde im Detail die Proteinkinase Cδ untersucht. Unter ihren Isoformen nimmt die PKCδ eine besondere Stellung ein. Schon in den 90er Jahren konnte eine Aktivierung der PKC durch Calcitriol in Keratinozyten und Fibroblasten gemessen werden. Es wurde aber keine Unterscheidung zwischen den einzelnen Isoformen vorgenommen. Interessanterweise konnte Sphingosin die Aktivierung hemmen (Hanafin et al. 1995). Speziell die PKCδ wurde in den folgenden Jahren mit apoptotischen Prozessen in Verbindung gebracht. So induzierte UVB-Strahlung unter Beteiligung der PKCδ

Apoptose in Keratinozyten (Denning et al. 1998). Diese wichtige Funktion wurde in Keratinozyten bestätigt, in denen die PKC δ überexprimiert worden war. Adenovirale Transfektion dieser Isoform mündete in einen Zusammenbruch des mitochondriellen Membranpotentials und schließlich in die Apoptose (Li et al. 1999). Auch in HaCaT-Keratinozyten wurden die Effekte der verschiedenen Isoformen der PKC beleuchtet. Die Isoformen α und δ vermittelten die Differenzierung, die Hemmung der Proliferation und erhöhten die Empfänglichkeit gegenüber apoptotischen Reizen. Dagegen stimulierten die Isoformen β und ϵ die Proliferation und hemmten die Differenzierung (Papp et al. 2004).

Eine mögliche Erklärung für die Wirkung der PKC könnte in ihrer Interaktion mit dem Akt-Signalweg liegen. Tatsächlich wurde in HUVEC beobachtet, dass eine Aktivierung der PKC δ eine Hemmung von Akt nach sich zieht. In diesem Fall wurde S1P allerdings als Aktivator von Akt beschrieben (Thors et al. 2003). In murinen Keratinozyten wurde die Funktion verschiedener Isoformen untersucht. Durch den unspezifischen PKC-Aktivator TPA konnte die Akt-Phosphorylierung reduziert werden. Bei genauerer Untersuchung stellten sich die PKCo und PKCe als wichtig für diesen Effekt heraus. Interessanterweise konnte die alsoform eine verstärkte Phosphorylierung von Akt hervorrufen (Li et al. 2006). Die Interferenz der beiden Signalwege konnte dann auch in Bezug auf die Proliferation von Keratinozyten demonstriert werden. Dort führte Stimulation mit S1P zu einer Aktivierung der PKCo, was eine Dephosphorylierung von Akt und eine sich anschließende Hemmung der Proliferation nach sich zog (Schuppel et al. 2008). Es muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass es auch gegenteilige Aussagen gibt. So konnte von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die PKCo essentiell für die Proliferation von Keratinozyten war. Außerdem wurde gezeigt, dass diese Proteinkinase durch Insulin aktiviert werden kann (Gartsbein et al. 2006). Aus derselben Arbeitsgruppe wurde ein ähnliches Verhalten schon vorher berichtet. Dort konnte Insulin ebenfalls die PKCo aktivieren, während IGF-I dazu interessanterweise nicht in der Lage war (Shen et al. 2001).

Da der exakte Mechanismus für die Interferenz von S1P und Insulin in Bezug auf die Apoptose bisher nicht aufgeklärt war, wurde in der vorliegenden Arbeit der Fokus darauf gelegt. Ausgehend von den hier erhaltenen Ergebnissen, muss von einer Beteiligung der PKCō ausgegangen werden. Im Detail führte eine Stimulation von Keratinozyten mit S1P zu einer Phosphorylierung der PKCō. Daraus resultierte eine

Dephosphorylierung der durch Insulin aktivierten Proteinkinase Akt. Dadurch wird der antiapoptotische Effekt von Insulin abgeschwächt, aber nur so weit, bis der Aktunabhängige antiapoptotische Einfluss des S1P zum Tragen kommt. In den Experimenten, in denen die PKCō gehemmt wurde oder durch siRNA ausgeschaltet war, zeigte sich ein stärkeres antiapoptotisches Potential von S1P. Außerdem konnte die Funktion von Insulin nun nicht mehr abgeschwächt werden.

4.2.3 Therapierelevanz und Ausblick

Der schon diskutierte Einsatz von FTY720 steht einem möglichen Einsatz von S1P zur Therapie hyperproliferativer Hauterkrankungen gegenüber. Beide Substanzen wirken antiapoptotisch auf Keratinozyten und Fibroblasten. FTY720-P bindet an alle S1P-Rezeptorsubtypen außer S1P₂. Aber gerade dieser Rezeptorsubtyp macht den entscheidenden Unterschied. Über diesen vermittelt S1P seine Aktivierung der PKCδ, die anschließende Hemmung von Akt und die damit verbundene Hemmung der Proliferation sowie der antiapoptotischen Wirkung des Insulins. Damit wird die Verwendung von S1P überhaupt erst möglich, da bei der Verwendung von FTY720 der Einsatz hoher Konzentrationen erforderlich wäre. In der vorliegenden Arbeit wurde zwar der Einfluss von FTY720 auf die PKCδ nicht untersucht, eine Aktivierung scheint aber unwahrscheinlich, da der Akt-Signalweg in Keratinozyten nicht beeinflusst (Schuppel et al. 2008) und in Fibroblasten sogar aktiviert wird. Die Beeinflussung des PKC-Signalweges scheint für die Behandlung der Psoriasis wichtig zu sein, denn gerade in diesen Geweben wurde eine verminderte Aktivierung der PKC festgestellt (Horn et al. 1987; Inohara et al. 1988). Mit der gleichzeitigen Proliferationshemmung der Keratinozyten durch S1P könnte im Vergleich zu FTY720 auch eine geringere Wahrscheinlichkeit für die Entstehung von Tumoren gegeben sein. Vor diesem Hintergrund wären Untersuchungen mit einem selektiven S1P₂-Rezeptoragonisten wünschenswert.

4.3 Die Migration von Brustkrebszellen

4.3.1 E2 und die Migration von Zellen

Estrogene nehmen Einfluss auf viele physiologische Prozesse und Gewebe. Die Bedeutung in der Entwicklung der Reproduktionsorgane, der Knochen, des

kardiovaskulären Systems und des Gehirns wurde bereits herausgestellt. Auf zellulärer Ebene sind die Effekte ebenso vielfältig. Apoptose, Proliferation und Differenzierung können durch Estrogene beeinflusst werden. Daher ist die Beteiligung von Estrogen und seinen Rezeptoren bei der Entstehung von Tumoren der Ovarien, des Endometriums und der Brust nicht überraschend (Couse and Korach 1999; Nelson and Bulun 2001; Deroo and Korach 2006). Bei an Krebs erkrankten Menschen werden neben dem Primärtumor oft Metastasen diagnostiziert. Dies bedeutet gleichzeitig eine schlechtere Prognose für den weiteren Krankheitsverlauf. Der Entstehung von Metastasen geht die Migration von entarteten Zellen voraus. Auch an diesem Vorgang ist Estrogen beteiligt. Allerdings existieren kontroverse Berichte über den Einfluss von Estradiol auf die Migration von Zellen.

Unterstützt werden die kanzerogenen Eigenschaften durch den positiven Effekt auf die Migration von Zellen des Endometriumkarzinoms. E2 verstärkte die Migration dieser Zellen ins Interstitium sowie durch die Basalmembran (Fujimoto et al. 1995; Fujimoto et al. 1996). Als möglicher Mechanismus der Signaltransduktion wurde eine Aktivierung von ERK und Akt berichtet (Gentilini et al. 2007). In HUVEC wurde ebenfalls eine E2-abhängige Migration nachgewiesen, die durch Einsatz des Hemmstoffs der NO Synthasen blockiert werden konnte (Florian et al. 2008). Interessant ist eine Studie über verschiedene Zellen des Schweins. E2 induzierte in isolierten Aortenendothelzellen die Proliferation und die Migration. In SMC des Schweins führte die Stimulation mit E2 jedoch zu einer Hemmung von Migration und Proliferation (Geraldes et al. 2002). Der hemmende Einfluss von E2 auf die Migration von SMC konnte schon vorher demonstriert werden. Unabhängig vom Geschlecht wurde der inhibierende Effekt von E2 auf venöse SMC gezeigt (Dai-Do et al. 1996). In SMC der Aorta wurde ein ähnliches Verhalten nachgewiesen (Suzuki et al. 1996). Darüber hinaus wurde von E2 ein hemmender Einfluss auf die Motilität gastrischer Epithelzellen (Nylander-Koski et al. 2007), ER-positiver Ovarialkarzinomzellen (Hayashido et al. 1998) sowie humaner Monozyten berichtet (Yada-Hashimoto et al. 2006).

Für die vorliegende Arbeit ist der Einfluss von Estradiol auf Brustkrebszellen am wichtigsten. So konnte in verschiedenen Studien die Bedeutung von E2 in diesem Zusammenhang bewiesen werden. Den ersten Hinweis gaben die Ergebnisse eines Scratch-Assays von konfluenten MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen. Der Wundverschluss wurde durch den Einsatz des ER-Antagonisten ICI182,780

verhindert, während er durch Tamoxifen gefördert wurde (Mathew et al. 1997). In einem weiteren Versuch hemmte Indol-3-Carbinol die E2-induzierte Migration von MCF-7 Zellen (Meng et al. 2000). Die Wege, über die E2 seine Wirkungen vermitteln kann, sind vielfältiger Natur. So wird das Protein TFF1 (human trefoil protein) in ERpositiven Tumoren stärker exprimiert. Dieses Protein kann seinerseits die Migration von MCF-7 Zellen steigern (Prest et al. 2002). Ein weiteres Protein ist die Histondeacetylase 6 (HDAC6), die in der Lage ist, α-Tubulin zu deacetylieren und damit die Migration zu fördern. Die Expression von HDAC6 kann durch E2 stimuliert werden (Saji et al. 2005). Im Gegensatz dazu wurde nach Transfektion von ER in MDA-MB-231 Zellen eine verringerte Invasivität und Metastasierung festgestellt (Garcia et al. 1992; Garcia et al. 1997). Die migratorischen Potentiale von E2 und TGF-β wurden in einer weiteren Studie untersucht. In diesen Experimenten wirkten E2 und TGF-β promigratorisch in MCF-7 Zellen. Wurden diese Zellen allerdings mit E2 vorinkubiert und dann erst mit TGF-β behandelt, sank interessanterweise die Zahl migrierter Zellen (Malek et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit konnten diese Ergebnisse bestätigt werden, da Vorinkubation mit E2 ebenfalls zu einer Verringerung der durch TGF-β stimulierten Migration führte.

4.3.2 TGF-β und der Einfluss auf die Migration

TGF-β übt ein vielfältiges Repertoire an Wirkungen aus. Beeinflussung von Differenzierung, Proliferation, Apoptose, Migration und Adhäsion von Zellen wurde berichtet (Massague 1998). Sehr interessant ist die Eigenschaft von TGF-β im Anfangsstadium als Tumorsuppressor zu fungieren (Wakefield and Roberts 2002; Miyazono et al. 2003; Massague 2008). Dass TGF-β auch auf MCF-7 Zellen einen direkten Einfluss ausübt, konnte schon anhand seiner apoptotischen Eigenschaften in diesen Zellen gezeigt werden (Hishikawa et al. 1999; Czeczuga-Semeniuk et al. 2004). Die tumorsuppressive Wirkung kehrt sich aber um und TGF-β fördert das Wachstum von malignen Erkrankungen. Beispielsweise wurde gezeigt, dass TGF-β einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung von Resistenzen gegenüber dem Antiestrogen Tamoxifen besitzt (Arteaga et al. 1999). Auch in anderen Studien führte eine Blockade des TGF-β Signalweges zu einer Hemmung des Tumorwachstums und der Metastasierung (Muraoka et al. 2002; Muraoka-Cook et al. 2005).

Der Metastasierung liegt als hauptsächlicher Mechanismus die Migration zugrunde. Daher lag die Untersuchung der Zellmigration als Antwort auf eine TGF- β Stimulation nahe. Tatsächlich konnte nachgewiesen werden, dass TGF- β die Migration von Brustkrebszellen induziert und diese durch Antiestrogene gehemmt werden kann (Tong et al. 2002). Verschieden experimentelle Ansätze bestätigten dieses Verhalten. Knockdown von T β R-II hemmte beispielsweise die Migration, die wiederum durch Expression von T β R-I wiederhergestellt werden konnte (Dumont et al. 2003). Als mögliche intrazelluläre Signalwege wurden ERK, JNK und RhoA in der Migration von MCF-7 Zellen gefunden (Imamichi et al. 2005). Darüber hinaus wurde mit T β R-I*6A eine hypomorphe Variante von T β R-I entdeckt, die ERK- und RhoAabhängig die Migration von MCF-7 verstärken kann (Rosman et al. 2008).

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde TGF- β als promigratorisches Agens eingesetzt. Die Vorinkubation mit Estradiol senkte allerdings die durch TGF- β stimulierte Migration von MCF-7 Zellen.

4.3.3 Crosstalk zwischen TGF-β und E2

Da die TGF- β -induzierte Migration der Brustkrebszellen eine Aktivierung der Smad-Signalkaskade verlangt, lag eine Interaktion von E2 und TGF- β in diesem Bereich nahe. Interferenzen von E2 und TGF- β wurden schon in anderen Gebieten gefunden. So verminderte E2 ER-abhängig mRNA-Level von TGF- β 2 und - β 3 in MCF-7 Zellen (Arrick et al. 1990). Ein Einfluss auf die TGF- β -Sekretion aus MCF-7 oder Epithelzellen der Brust konnte allerdings nicht gezeigt werden (Malet et al. 2001). Außerdem hemmte E2 die TGF- β -induzierte Collagen IV-Expression in murinen Mesangiumzellen (Silbiger et al. 1998).

Obwohl E2 keinen Einfluss auf die Genexpression von Smads in der Brustkrebszelllinie ZR-75-1 zeigte (Pouliot and Labrie 1999), konnte ein direkter Effekt von E2 auf die Smad-Proteine nachgewiesen werden. So hemmte E2 die TGF-β-induzierte Smad3-Aktivierung in Zellen des Nierenkarzinoms (Matsuda et al. 2001). Diese Blockade der Smad3-Aktivierung wurde später für den hemmenden Einfluss von E2 auf die TGF-β-induzierte Migration von MCF-7 Zellen verantwortlich gemacht (Malek et al. 2006). Ein ähnliches Verhalten konnte in Cos1 Zellen gefunden werden (Cherlet and Murphy 2007). Erst kürzlich wurde sogar der Abbau

von Smad2/3 durch vorhergehende Ubiquitinierung durch E2 Stimulation in MCF-7 Zellen berichtet (Ito et al. 2010).

Eine Schlüsselposition in der Regulation des Smad-Signalweges scheint der MAPK-Signalkaskade zuzukommen. Es wurde berichtet, dass eine Aktivierung von MAPK zu einer Hemmung der Translokation von Smad in den Nukleus und damit der Wirkung führt. Grund dafür ist eine Phosphorylierung von Smad-Proteinen an bestimmten Stellen, die von TGF-β sensiblen Stellen verschieden sind (Calonge and Massague 1999; Kretzschmar et al. 1999). Diese Effekte scheinen allerdings abhängig vom Zelltyp zu sein, da in Mesangiumzellen und tubulären Nierenepithelzellen eine ERK-abhängige Aktivierung von Smad gefunden wurde (Hayashida et al. 2003; Rhyu et al. 2005).

Dass eine Aktivierung des MAPK-Signalweges durch E2 erfolgen kann, wurde schon in verschiedenen Zellen demonstriert. Neben der bewiesenen Aktivierung in Tumorzellen des Endometriums (Acconcia et al. 2006) und in BAEC (Razandi et al. 2000), konnte genauso eine Stimulation von ERK in MCF-7 Zellen gezeigt werden (Filardo et al. 2000; Filardo et al. 2002; Keshamouni et al. 2002; Zivadinovic and Watson 2005). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. E2 und E2-BSA waren beide in der Lage, eine Phosphorylierung von ERK1/2 hervorzurufen, die durch den MAPK-Inhibitor U0126 verhindert werden konnte. Die gefundene Aktivierung von ERK1/2 war für die Hemmung der TGF-β-induzierten Smad2-Phosphorylierung essentiell, da Blockade mit U0126 die Smad2-Phosphorylierung wiederherstellte. Auch die durch Vorinkubation mit E2 gesenkte Migrationsrate stieg nach Einsatz von U0126 wieder an. Zusammenfassend ist also zu sagen, dass E2 durch Aktivierung von ERK eine Hemmung des Smad-Signalweges hervorruft, die mit einer geringeren Migration der mit TGF-β stimulierten MCF-7 Zellen einhergeht.

4.3.4 Beteiligung membranständiger Rezeptoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Stimulationszeiten von weniger als 60min legen die Vermutung nahe, dass die Effekte von E2 nicht über klassische intrazelluläre Rezeptoren vermittelt werden. In der Literatur existieren schon einige Berichte über sehr schnell angestoßene Prozesse durch E2. Beispielsweise hemmt E2 die Apoptose in Endothelzellen und aktiviert in kurzer Zeit die p38 MAPK und HSP27 (Razandi et al. 2000). Eine schnelle Aktivierung von ERK1/2, c-Src und FAK durch

E2 konnte ebenfalls in Tumorzellen des Endometriums beobachtet werden. Interessanterweise hatte auch das Antiestrogen Tamoxifen diese Effekte (Acconcia et al. 2006). Ein ähnlicher paradoxer Effekt wurde in Brustkrebszellen entdeckt. In diesen konnte die TGF-β-induzierte Migration durch Antiestrogene gehemmt werden (Tong et al. 2002). Eine mögliche Erklärung liegt in der hohen Bindungsaffinität von E2, Tamoxifen und ICI182,780 am GPR30-Rezeptor. Zusätzlich wurden agonistische Effekte von Tamoxifen und ICI182,780 an diesem Rezeptor nachgewiesen (Thomas et al. 2005). GPR30 wurde ebenfalls als wichtiger Rezeptor in der E2-EGFR Achse identifiziert. Stimulation mit E2 führte GPR30-abhängig zu einer Induktion der SphK. Dadurch wurde vermehrt S1P gebildet, das nach Ausschleusung aus der Zelle an seinen S1P₃-Rezeptorsubtyp band. Dessen Aktivierung führte zu einer Transaktivierung des EGFR mit nachfolgender Phosphorylierung von ERK (Filardo et al. 2000; Filardo et al. 2002; Sukocheva et al. 2003; Sukocheva et al. 2006). Dies könnte ein möglicher Mechanismus für die E2-induzierte Hemmung der Migration von MCF-7 Zellen sein, da von S1P bereits inhibitorische Eigenschaften diesbezüglich berichtet wurden (Wang et al. 1999).

Denkbar ist ebenso eine Signaltransduktion über mER. Aktivierung dieser Rezeptoren ist mit verschiedensten Effekten assoziiert worden. PI3K / Akt und cAMP stellen Zielmoleküle dar, die nach Bindung eines Liganden an mER aktiviert werden können (Pedram et al. 2002; Razandi et al. 2004; Zivadinovic and Watson 2005; Pedram et al. 2006). Aber auch der Einfluss von E2 auf die MAPK-Signalkaskade wurde beschrieben (Zhang et al. 2002; Zivadinovic and Watson 2005).

Zur Untersuchung einer möglichen Beteiligung membranständiger Rezeptoren wurde in diesem Forschungsvorhaben mit E2-BSA gearbeitet. Das nicht membrangängige E2-BSA bindet an isolierte gereinigte ER und an intakte Zellmembranen (Taguchi et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde E2-BSA durch Dextran behandelte Aktivkohle gefiltert, um freies E2 zu entfernen und damit intrazelluläre Effekte auszuschließen. Tatsächlich konnten alle Effekte, die durch E2 alleine ausgelöst werden konnten, durch den Einsatz von E2-BSA imitiert werden. Dazu gehören die Stimulation der ERK1/2-Phosphorylierung, die Hemmung der Smad2-Aktivierung sowie die Hemmung der Migration. Zusätzlich wurde durch Vorinkubation mit PTX die Beteiligung von G_{ai}-Proteinen bestätigt, denn die Effekte von TGF- β konnten so wiederhergestellt werden.

Zum Schluss wurde die Lokalisierung von GPR30 untersucht. In der Literatur herrscht Uneinigkeit über den Bestimmungsort dieses Rezeptors. Einerseits wurde eine Lokalisierung in der Plasmamembran demonstriert. Nach Stimulation mit E2 konnte zusätzlich eine Kolokaliserung mit Clathrin gezeigt werden (Filardo et al. 2007). Andererseits wurde eine Kolokalisierung mit dem endoplasmatischen Retikulum nachgewiesen (Revankar et al. 2005; Otto et al. 2008). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass das membranimpermeable E2-BSA-FITC genauso wie GPR30 am endoplasmatischen Retikulum gefunden werden konnte (Wang et al. 2008). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde durch den Einsatz des KDEL-Markers die Kolokalisierung mit dem endoplasmatischen Retikulum bestätigt. Eine mögliche Erklärung dieser Diskrepanz könnte im biologischen Verhalten von Rezeptoren. Internalisierung des Rezeptors und Recycling zur Zelloberfläche stellen Vorgänge dar, die für die abweichenden Ergebnisse in der Literatur verantwortlich gemacht werden können.

4.3.5 Bedeutung des Crosstalks und Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen eine deutliche Interaktion von Estradiol und TGF-β. Die durch E2 ausgelöste Phosphorylierung von ERK1/2 und nachfolgende Hemmung von Smad2 ziehen eine Hemmung der Migration von MCF-7 Zellen nach sich. Darüber hinaus ist dieser Effekt durch membranassozierte Rezeptoren vermittelt. Die Hemmung der Migration könnte sich positiv auf die Metastasierung von Brustkrebs auswirken. Somit ergibt sich für E2 ein zweiseitiges Bild. Es schützt Brustkrebszellen vor der Apoptose und wirkt damit als Tumorpromotor. Durch die Verringerung der Migration ist eine Funktion als Tumorsuppressor denkbar. Unterstützt wird dies durch die Beobachtung, dass MDA-MB-231 Zellen sehr invasiv sind, während ER- und GPR30-positive MCF-7 Zellen eine geringere Invasitivität zeigen (Holst-Hansen et al. 1996). Die geringere Inzidenz für die koronare Herzkrankheit vor der Menopause sowie der zellschützende Effekt auf renale Mesangiumzellen sind weitere positive Eigenschaften des Estrogens, die ebenfalls auf Interaktionen mit anderen Wachstumsfaktoren zurückzuführen sind (Matsuda et al. 2001; Negulescu et al. 2002).

Die Funktion des GPR30-Rezeptors bleibt kontrovers. Er scheint wichtig zu sein für die Vermittlung der Proliferation und der Migration in ER-negativen, aber GPR30-

positiven SKBR3 Zellen (Pandey et al. 2009). Im Gegensatz dazu wird dieser Rezeptor für die Progestin-induzierte Proliferationshemmung in MCF-7 Zellen benötigt (Ahola et al. 2002; Ahola et al. 2002). Da auch weit verbreitete Antiestrogene agonistisch an GPR30 wirken, sind spezifische Substanzen an E2sensitiven Rezeptoren von Wichtigkeit. Mit G-1 steht bereits ein selektiver Agonist für GPR30 zur Verfügung (Bologa et al. 2006). Außerdem sind seit kurzem Knockout-Mäuse für diesen Rezeptor verfügbar. Verwendung dieser Mäuse lässt allerdings daran zweifeln, ob GPR30 wirklich Effekte von Estradiol zu vermitteln vermag (Isensee et al. 2009; Otto et al. 2009). In der Zukunft müssen verschiedene Ansätze die wahre Natur von GPR30 zeigen.

5 Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung

FTY720 (Fingolimod) ist ein neuer Immunmodulator, dessen Zulassung zur Behandlung der schubförmig remittierenden multiplen Sklerose Ende 2009 beantragt wurde. Die Applikation von FTY720 führt zu einer Verkleinerung der Zahl der peripheren Lymphozyten. Grund hierfür ist allerdings keine gesteigerte Apoptose, sondern eine Umverteilung und Zurückhaltung der Lymphozyten in sekundäre Lymphorgane. FTY720 wird im Körper durch Sphingosinkinasen, hauptsächlich durch die SphK2, zu FTY720-Phosphat umgesetzt. Dieser Metabolit wirkt agonistisch an S1P_{1.3-5}, führt aber ebenso zu einer Internalisierung des S1P₁-Rezeptorsubtyps. Der dadurch entstehende Antagonismus ist entscheidend für die Wirkung auf die Lymphozyten. Neben der Umverteilung der Lymphozyten hat FTY720 einen Einfluss auf das Überleben von Zellen. In hohen Konzentrationen wirkt es stark apoptotisch in allen berichteten Zellarten. Dieser Effekt scheint unabhängig von einer Rezeptorbeteiligung zu sein. Liegt FTY720 als Phosphat und in niedrigen Konzentrationen vor, ist es in der Lage, Zellen vor dem Tod zu schützen.

In der vorliegenden Arbeit konnte dieses kontroverse Verhalten bestätigt werden. Die Stimulation von humanen Fibroblasten und Keratinozyten mit FTY720 in einer Konzentration von 10 μ M ließ die Zahl der apoptotischen Zellen auf über 80 % ansteigen. Der Einsatz von FTY720-P hingegen rief keine Apoptose hervor. Ganz im Gegenteil, die durch TNF- α / Actinomycin ausgelöste Apoptose konnte durch Vorstimulation mit FTY720-P in beiden Zellarten konzentrationsabhängig gesenkt werden. Die maximale Wirkung wurde bei einer Konzentration von 1 μ M erreicht.

Da FTY720 *in vivo* durch die SphK2 phosphoryliert wird, wurde diese Umwandlung auch in Fibroblasten untersucht. Es wurde eine Phosphorylierung gemessen, die allerdings nicht vollständig war. Das erklärt zwar einerseits den fehlenden apoptotischen Effekt von FTY720 bei 1 μ M, aber andererseits nicht den ebenfalls fehlenden antiapoptotischen Effekt. Der Einsatz der SphK2-siRNA unterstreicht die Bedeutung der Phosphorylierung, denn nach Hemmung der Kinase war ein apoptotisches Verhalten von FTY720 schon bei 1 μ M zu erkennen. Wird FTY720 also bis zu einer Konzentration von 1 μ M eingesetzt, bildet sich ein Gemisch beider Substanzen, die sich in ihrer Wirkung auf die Apoptose aufheben. In höheren Konzentrationen überwiegt der zytotoxische Effekt des FTY720.
Da FTY720-P seine Effekte über S1P-Rezeptoren vermittelt, wurde der beteiligte Subtyp näher charakterisiert. Die Versuche mit dem S1P₁-spezifischen Agonisten SEW2871 und den Antagonisten VPC23019 und Suramin deuteten auf die Beteiligung des S1P₃-Rezeptorsubtyps hin. Dies konnte durch die Verwendung von S1P₃-Rezeptor-Knockout-Fibroblasten und -Keratinozyten bestätigt werden.

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte der Signalweg des antiapoptotischen Effektes von FTY720-P in Fibroblasten aufgeklärt werden. Im Fokus standen hier die dominanten Proteine PI3K / Akt, ERK1/2 und mTOR. Obwohl jeweils eine Phosphorylierung dieser Proteine in humanen Fibroblasten durch FTY720 und dessen Phosphat nachgewiesen wurde, konnten diese Signalproteine ausgeschlossen werden. Einerseits führte die Verwendung von Inhibitoren der Signalwege zu keiner Veränderung des antiapoptotischen Effektes von FTY720-P. Andererseits wurde eine Phosphorylierung ebenfalls in S1P₃-Rezeptor-Knockout-Fibroblasten gemessen.

Der Einsatz des Fluoreszenzfarbstoffes JC-1 offenbarte den ersten Unterschied zwischen FTY720-P und seiner Muttersubstanz. Das Phosphat war in der Lage, das mitochondrielle Membranpotential zu stabilisieren, während FTY720 dies nicht vermochte. Auch in Keratinozyten wurde die Beteiligung der Mitochondrien nachgewiesen. Darüber hinaus konnte der S1P₃-Rezeptorsubtyp als essentiell bestätigt werden, da FTY720-P in Knockout-Fibroblasten keinen Effekt mehr aufwies. Als weiterer Faktor des intrinsischen Signalweges der Apoptose wurde das Protein Bcl-2 untersucht. FTY720-P führte zu einer deutlichen Phosphorylierung in humanen Fibroblasten. Interessanterweise war FTY720 dazu nicht in der Lage. Außerdem konnte in S1P₃-Knockout-Fibroblasten keine Phosphorylierung durch FTY720-P mehr ausgelöst werden.

Die erhaltenen Ergebnisse stellen den zwiespältigen Charakter von FTY720 deutlich heraus. Da der apoptotische Effekt eher S1P-Rezeptor-unabhängig vermittelt wird, wäre eine genauere Untersuchung dieses Aspekts wünschenswert. Dasselbe gilt für eine weitere Aufschlüsselung des intrazellulären, antiapoptotischen Signalweges.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die genauere Untersuchung der Interaktion von S1P und Insulin hinsichtlich der Apoptose in Keratinozyten. Es war bereits bekannt, dass S1P die Insulin induzierte Proliferation von Keratinozyten hemmt. Dies wurde mit einer geringeren Akt-Phosphorylierung durch vorhergehende PKCδ-Aktivierung

5 Zusammenfassung

begründet. In der vorliegenden Arbeit konnte das ebenfalls schon berichtete antiapoptotische Potential von S1P in Keratinozyten bestätigt werden. Gleichzeitig verringerte es aber den durch Insulin ausgelösten antiapoptotischen Effekt. Die Beteiligung der PKCδ konnte in diesem Zusammenhang bewiesen werden. Zuerst imitierte der PKC-Aktivator TPA die S1P-Wirkungen in Bezug auf Insulin. Zusätzlich konnte durch Ausschalten der PKCδ mittels siRNA diese Isoform als essentiell identifiziert werden, da die Zahl der apoptotischen Zellen wieder sank. Der apoptotische Arm von S1P wurde so blockiert und es kam nur der zellschützende Arm zum Tragen.

So wird deutlich, dass auch S1P unterschiedliche Effekte je nach Ausgangslage des Systems besitzt. Gerade dieser Fakt macht es so interessant und lässt einen positiven Einfluss auf hyperproliferative Hautkrankheiten vermuten.

Dass TGF-β und Estradiol einen positiven Effekt auf die Migration von Brustkrebszellen auslösen und damit die Metastasierung fördern können, ist bereits länger bekannt. Die schon berichtete und hier bestätigte Hemmung der TGF-β induzierten Migration durch Vorinkubation mit Estradiol gibt allerdings neue Hinweise auf eine mögliche positive Beeinflussung des Tumorwachstums. Eine Hemmung der Smad-Phosphorylierung sowie eine Induktion der ERK1/2-Phosphorylierung durch E2 ist ebenfalls schon gezeigt worden. Dies konnte hier in MCF-7 Zellen bestätigt und darüber hinaus in gleichem Maße durch das nicht membrangängige E2-BSA ausgelöst werden. Dass die Aktivierung von ERK1/2 die Hemmung von Smad nach sich zieht, konnte hier einwandfrei durch den Einsatz des MAPK-Hemmstoffs U0126 demonstriert werden. Gleichzeitig wurde dadurch die Hemmung von PTX. Auch hierbei wurden die Effekte von E2 blockiert. Die Verwendung von PTX sowie von E2-BSA bestätigt die Vermutung, dass die Wirkung von E2 in diesem Fall durch membranständige Rezeptoren vermittelt wird.

Die Untersuchung zur Lokalisation des GPR30-Rezeptors ergab eine Kolokalisierung mit dem endoplasmatischen Retikulum. Die Bedeutung der Kolokalisierung sowie der Beteiligung membranständiger Rezeptoren an der Vermittlung der Effekte von E2 bleibt kontrovers und muss in Zukunft geklärt werden. Bei eindeutiger Beteiligung des GPR30-Rezeptors wäre eine Entwicklung spezifischer Arzneistoffe für die Behandlung des Brustkrebses von großer Bedeutung.

5.2 Abstract

FTY720 (Fingolimod) is a novel immunomodulator which awaits approval for the treatment of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. Application of FTY720 leads to a decrease of peripheral lymphocytes. This effect is not due to increased apoptosis, but rather a sequestration in secondary lymphoid organs. FTY720 is phosphorylated in vivo mainly by SphK2. The metabolite FTY720-P acts agonistic on S1P_{1.3-5} but causes an internalization of the S1P₁ receptor subtype. This creates a functional antagonism which is essential for the effect on lymphocytes. Besides the redistribution of lymphocytes, FTY720 has an impact on cell survival. High concentrations reveal strong apoptotic properties in every reported cell line. But this effect seems to be independent of receptors. Once FTY720 is phosphorylated and applied at low concentrations, it is able to protect cell from undergoing cell death. In the present study this controversial behaviour could be confirmed. Stimulation of human fibroblasts and keratinocytes with FTY720 at a concentration of 10 µM raised the number of apoptotic cells beyond 80 %. Instead, treatment with FTY720-P did not induce apoptosis. In fact, TNF- α / actinomycin induced apoptosis could be decreased by preincubation with FTY720-P in both cell types. The maximum effect was measured at a concentration of 1 µM.

As FTY720 is phosphorylated *in vivo*, a possible formation of FTY720-P was examined in fibroblasts. Indeed, a partial phosphorylation could be detected. This explains the missing apoptotic effect of FTY720 at a concentration of 1 μ M. But it lacks an explanation of the missing antiapoptotic effect. Utilization of SphK2-siRNA underlines the importance of the phosphorylation, as silencing of SphK2 led to a significant induction of apoptosis already at a concentration of 1 μ M. Application of FTY720 results in a creation of an equilibrium consisting of both states of phosphorylation which counteract each others actions. At higher concentrations the cytotoxic effects prevail, though.

As FTY720-P transmits its effects via S1P receptors, the involved receptors were examined. Experiments with the S1P₁ specific agonist SEW2871 and the antagonists VPC23019 and suramin indicate that the S1P₃ receptor subtype is crucial for mediating the effects. This could be confirmed by using S1P₃ receptor knockout fibroblasts and keratinocytes.

5 Zusammenfassung

In further experiments the signalling pathway of the antiapoptotic effects of FTY720-P in fibroblasts was to be identified. The points of interest were the predominant proteins PI3K / Akt, ERK1/2 and mTOR. Although a phosphorylation of these proteins could be detected after stimulation with FTY720 or its phosphate, these pathways could be excluded. One reason were the specific inhibitors of the regarding pathways lacking any effect in apoptosis experiments. Another reason was a pronounced phosphorylation of the signalling proteins in S1P₃ knockout fibroblasts.

Utilization of the fluorescence dye JC-1 revealed the first difference between FTY720-P and its parent compound. The phosphate was able to stabilize the mitochondrial membrane potential, whereas FTY720 was not. In keratinocytes an involvement of mitochondria could be demonstrated, too. Furthermore, the S1P₃ receptor subtype was identified as crucial, because FTY720-P could not provoke a stabilization of $\Delta \psi_m$ in S1P₃ deficient fibroblasts anymore. Bcl-2 was tested as another member of proteins playing a role in the intrinsic pathway of apoptosis. Stimulation of fibroblasts with FTY720-P caused a strong phosphorylation of Bcl-2. Interestingly, FTY720 was not able to mimic these effects. Moreover, in S1P₃ knockout fibroblasts no phosphorylation of Bcl-2 could be triggered anymore.

The obtained results clearly emphasize the ambivalent function of FTY720. As the apoptotic effect is more likely to be mediated by a mechanism independent of S1P receptors, a more thorough examination of this part is desirable. In addition, the intracellular antiapoptotic signalling pathway needs to be completely clarified.

Another aspect of this study was to examine the interaction of S1P and insulin regarding apoptosis in keratinocytes more closely. It is already known that S1P inhibits insulin induced proliferation in human keratinocytes. An activation of PKCδ an subsequent inhibition of Akt phosphorylation was identified as the underlying mechanism. In this study the formerly reported antiapoptotic potential of S1P in keratinocytes was confirmed. At the same time S1P decreased the antiapoptotic effect of insulin. An involvement of PKCδ in this action could be proved by using the activator of PKC, TPA. This compound mimicked the effects of S1P on insulin. In addition, experiments with siRNA against PKCδ revealed this isoform to be essentially involved in the interference of S1P and insulin. By using siRNA the apoptotic action of S1P was blocked so that only the antiapoptotic effect was visible.

This proves that S1P possesses different properties depending on the surrounding system. This interesting behaviour suggests a possible positive outcome in the treatment of hyperproliferative diseases.

It is widely accepted that TGF- β and estradiol have a positive effect on the migration of breast cancer cells and therefore promote metastasizing of tumours. But it has been reported that preincubation with estradiol inhibited TGF- β induced migration of MCF-7 cells. In this study these experiments could be repeated successfully along with the already reported induction of ERK1/2 phosphorylation and Smad repression. Moreover, these effects could also be provoked in MCF-7 cells by using the membrane impermeable E2-BSA. In addition, activation of ERK1/2 led to the inhibition of Smad. This was proved by using the MAPK inhibitor U0126. When this pathway was blocked, cells were able to migrate to TGF- β stimulation despite the desensitization by estradiol. A similar effect was observed after treatment with PTX. By using PTX and E2-BSA a possible involvement of membrane bound receptors in the E2 mediated effects was demonstrated.

The fluorescence experiments for determination of the localization of the GPR30 receptor revealed a co-localization with the endoplasmic reticulum. The relevance of these findings along with the involvement of membrane bound receptors remains controversial and needs to be clarified in the future. Based on an unambiguous prove of GPR30 to be essential, the development of specific drugs for the treatment of breast cancer would be of great importance.

6 Literaturverzeichnis

- Acconcia, F., et al. (2006). "Estrogen and tamoxifen induce cytoskeletal remodeling and migration in endometrial cancer cells." <u>Endocrinology</u> **147**(3): 1203-12.
- Adachi, K. K., T.; Nakao, N.; Arita, M.; Chiba, K.; Mishina, T.; Sasaki, S.; Fujita, T (1995). "Design, Synthesis, and Structure-Activity Relationships of 2-Substituted-2-amino-1,3-propanediols: Discovery of a Novel Immunosuppressant, FTY720." <u>Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters</u> 5(8): 853-856.
- Agudo-Lopez, A., et al. (2010). "Involvement of mitochondria on neuroprotective effect of sphingosine-1-phosphate in cell death in an in vitro model of brain ischemia." <u>Neurosci Lett</u> **470**(2): 130-3.
- Ahola, T. M., et al. (2002). "G protein-coupled receptor 30 is critical for a progestininduced growth inhibition in MCF-7 breast cancer cells." <u>Endocrinology</u> 143(9): 3376-84.
- Ahola, T. M., et al. (2002). "Progestin upregulates G-protein-coupled receptor 30 in breast cancer cells." <u>Eur J Biochem</u> **269**(10): 2485-90.
- Alderton, W. K., et al. (2001). "Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition." <u>Biochem J</u> **357**(Pt 3): 593-615.
- Alemany, R., et al. (2007). "Regulation and functional roles of sphingosine kinases." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **374**(5-6): 413-28.
- Alessi, D. R., et al. (1997). "Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha." <u>Curr Biol</u> **7**(4): 261-9.
- An, S., et al. (2000). "Sphingosine 1-phosphate-induced cell proliferation, survival, and related signaling events mediated by G protein-coupled receptors Edg3 and Edg5." J Biol Chem **275**(1): 288-96.
- Arrick, B. A., et al. (1990). "Differential regulation of expression of three transforming growth factor beta species in human breast cancer cell lines by estradiol." <u>Cancer Res</u> **50**(2): 299-303.
- Arteaga, C. L., et al. (1999). "Reversal of tamoxifen resistance of human breast carcinomas in vivo by neutralizing antibodies to transforming growth factorbeta." <u>J Natl Cancer Inst</u> **91**(1): 46-53.
- Avruch, J. (1998). "Insulin signal transduction through protein kinase cascades." <u>Mol</u> <u>Cell Biochem</u> **182**(1-2): 31-48.
- Avruch, J. (2007). "MAP kinase pathways: the first twenty years." <u>Biochim Biophys</u> <u>Acta</u> **1773**(8): 1150-60.
- Avruch, J., et al. (1994). "Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway." <u>Trends Biochem Sci</u> **19**(7): 279-83.
- Azuma, H., et al. (2003). "Selective cancer cell apoptosis induced by FTY720; evidence for a Bcl-dependent pathway and impairment in ERK activity." <u>Anticancer Res</u> **23**(4): 3183-93.
- Azuma, H., et al. (2003). "Induction of apoptosis in human bladder cancer cells in vitro and in vivo caused by FTY720 treatment." <u>J Urol</u> **169**(6): 2372-7.
- Azuma, H., et al. (2002). "Marked prevention of tumor growth and metastasis by a novel immunosuppressive agent, FTY720, in mouse breast cancer models." <u>Cancer Res</u> **62**(5): 1410-9.
- Bakin, A. V., et al. (2000). "Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration." J Biol Chem **275**(47): 36803-10.
- Balthasar, S., et al. (2006). "Sphingosine 1-phosphate receptor expression profile and regulation of migration in human thyroid cancer cells." <u>Biochem J</u> **398**(3): 547-56.

- Bandhuvula, P., et al. (2005). "The immune modulator FTY720 inhibits sphingosine-1-phosphate lyase activity." <u>J Biol Chem</u> **280**(40): 33697-700.
- Banno, Y., et al. (2001). "Involvement of phospholipase D in sphingosine 1phosphate-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt in Chinese hamster ovary cells overexpressing EDG3." <u>J Biol Chem</u> **276**(38): 35622-8.
- Baudhuin, L. M., et al. (2002). "Akt activation induced by lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate requires both mitogen-activated protein kinase kinase and p38 mitogen-activated protein kinase and is cell-line specific." <u>Mol Pharmacol</u> **62**(3): 660-71.
- Baudhuin, L. M., et al. (2004). "S1P3-mediated Akt activation and cross-talk with platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)." <u>Faseb J</u> **18**(2): 341-3.
- Becciolini, L., et al. (2006). "Sphingosine 1-phosphate inhibits cell migration in C2C12 myoblasts." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1761**(1): 43-51.
- Belcher, S. M., et al. (2005). "Rapid estrogenic regulation of extracellular signalregulated kinase 1/2 signaling in cerebellar granule cells involves a G proteinand protein kinase A-dependent mechanism and intracellular activation of protein phosphatase 2A." <u>Endocrinology</u> **146**(12): 5397-406.
- Bellemare, J., et al. (2005). "Epidermis promotes dermal fibrosis: role in the pathogenesis of hypertrophic scars." J Pathol **206**(1): 1-8.
- Benjamin, C. L., et al. (2008). "p53 tumor suppressor gene: a critical molecular target for UV induction and prevention of skin cancer." <u>Photochem Photobiol</u> 84(1): 55-62.
- Bergh, J. (1999). "Clinical studies of p53 in treatment and benefit of breast cancer patients." <u>Endocr Relat Cancer</u> **6**(1): 51-9.
- Bernardi, R. J., et al. (2002). "Antiproliferative effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) and vitamin D analogs on tumor-derived endothelial cells." <u>Endocrinology</u> 143(7): 2508-14.
- Billich, A., et al. (2003). "Phosphorylation of the immunomodulatory drug FTY720 by sphingosine kinases." J Biol Chem **278**(48): 47408-15.
- Blobe, G. C., et al. (1994). "Regulation of protein kinase C and role in cancer biology." <u>Cancer Metastasis Rev</u> **13**(3-4): 411-31.
- Bogatkevich, G. S., et al. (2005). "Distinct PKC isoforms mediate cell survival and DNA synthesis in thrombin-induced myofibroblasts." <u>Am J Physiol Lung Cell</u> <u>Mol Physiol</u> **288**(1): L190-201.
- Bohler, T., et al. (2007). "Effect of FTY720 on apoptosis of smooth muscle cells." <u>Transplant Proc</u> **39**(8): 2624-6.
- Bohler, T., et al. (2009). "FTY720 Inhibits Tumor Necrosis Factor-alpha-Induced Proliferation and Extracellular Signal-Regulated Kinase Phosphorylation of Human Smooth Muscle Cells." <u>Transplant Proc</u> **41**(2): 705-6.
- Bologa, C. G., et al. (2006). "Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30." <u>Nat Chem Biol</u> **2**(4): 207-12.
- Borsig, L., et al. (2002). "Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **99**(4): 2193-8.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." <u>Anal Biochem</u> **72**: 248-54.
- Breitkreutz, D., et al. (2007). "Protein kinase C family: on the crossroads of cell signaling in skin and tumor epithelium." J Cancer Res Clin Oncol **133**(11): 793-808.

- Brinkmann, V., et al. (2004). "FTY720: sphingosine 1-phosphate receptor-1 in the control of lymphocyte egress and endothelial barrier function." <u>Am J</u> <u>Transplant</u> **4**(7): 1019-25.
- Brinkmann, V., et al. (2002). "The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1phosphate receptors." J Biol Chem **277**(24): 21453-7.
- Brinkmann, V., et al. (2000). "FTY720: a novel transplantation drug that modulates lymphocyte traffic rather than activation." <u>Trends Pharmacol Sci</u> **21**(2): 49-52.
- Brinkmann, V., et al. (2001). "FTY720: dissection of membrane receptor-operated, stereospecific effects on cell migration from receptor-independent antiproliferative and apoptotic effects." <u>Transplant Proc</u> **33**(7-8): 3078-80.
- Bruch-Gerharz, D., et al. (1996). "A proinflammatory activity of interleukin 8 in human skin: expression of the inducible nitric oxide synthase in psoriatic lesions and cultured keratinocytes." J Exp Med **184**(5): 2007-12.
- Bruch-Gerharz, D., et al. (2003). "Arginase 1 overexpression in psoriasis: limitation of inducible nitric oxide synthase activity as a molecular mechanism for keratinocyte hyperproliferation." <u>Am J Pathol</u> **162**(1): 203-11.
- Calonge, M. J. and J. Massague (1999). "Smad4/DPC4 silencing and hyperactive Ras jointly disrupt transforming growth factor-beta antiproliferative responses in colon cancer cells." <u>J Biol Chem</u> **274**(47): 33637-43.
- Cals-Grierson, M. M. and A. D. Ormerod (2004). "Nitric oxide function in the skin." <u>Nitric Oxide</u> **10**(4): 179-93.
- Carmeci, C., et al. (1997). "Identification of a gene (GPR30) with homology to the Gprotein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer." <u>Genomics</u> **45**(3): 607-17.
- Chen, J. K., et al. (1999). "The identification of myriocin-binding proteins." <u>Chem Biol</u> **6**(4): 221-35.
- Cherlet, T. and L. C. Murphy (2007). "Estrogen receptors inhibit Smad3 transcriptional activity through Ap-1 transcription factors." <u>Mol Cell Biochem</u> **306**(1-2): 33-42.
- Chiang, G. G. and R. T. Abraham (2007). "Targeting the mTOR signaling network in cancer." <u>Trends Mol Med</u> **13**(10): 433-42.
- Chiba, K., et al. (1996). "FTY720, a novel immunosuppressant possessing unique mechanisms. I. Prolongation of skin allograft survival and synergistic effect in combination with cyclosporine in rats." <u>Transplant Proc</u> **28**(2): 1056-9.
- Chiba, K., et al. (1998). "FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats. I. FTY720 selectively decreases the number of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing." J Immunol **160**(10): 5037-44.
- Chittenden, T., et al. (1995). "A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions." <u>EMBO J</u> **14**(22): 5589-96.
- Chua, C. W., et al. (2005). "FTY720, a fungus metabolite, inhibits in vivo growth of androgen-independent prostate cancer." Int J Cancer **117**(6): 1039-48.
- Chung, H. T., et al. (2001). "Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis." <u>Biochem</u> <u>Biophys Res Commun</u> **282**(5): 1075-9.
- Chung, T., et al. (1997). "ATP-dependent choline phosphate-induced mitogenesis in fibroblasts involves activation of pp70 S6 kinase and phosphatidylinositol 3'kinase through an extracellular site. Synergistic mitogenic effects of choline phosphate and sphingosine 1-phosphate." <u>J Biol Chem</u> 272(5): 3064-72.

- Claerhout, S., et al. (2007). "AKT delays the early-activated apoptotic pathway in UVB-irradiated keratinocytes via BAD translocation." J Invest Dermatol **127**(2): 429-38.
- Coelho, R. P., et al. (2007). "The immunomodulator FTY720 has a direct cytoprotective effect in oligodendrocyte progenitors." <u>J Pharmacol Exp Ther</u> **323**(2): 626-35.
- Cohen, J. A., et al. (2010). "Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis." <u>N Engl J Med</u> **362**(5): 402-15.
- Cotter, T. G. (2009). "Apoptosis and cancer: the genesis of a research field." <u>Nat Rev</u> <u>Cancer</u> **9**(7): 501-7.
- Couse, J. F. and K. S. Korach (1999). "Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?" <u>Endocr Rev</u> **20**(3): 358-417.
- Cross, T., et al. (2000). "PKC-delta is an apoptotic lamin kinase." Oncogene **19**(19): 2331-7.
- Cuvillier, O., et al. (1996). "Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate." <u>Nature</u> **381**(6585): 800-3.
- Czeczuga-Semeniuk, E., et al. (2004). "Can transforming growth factor-beta1 and retinoids modify the activity of estradiol and antiestrogens in MCF-7 breast cancer cells?" <u>Acta Biochim Pol</u> **51**(3): 733-45.
- Dai-Do, D., et al. (1996). "17 beta-estradiol inhibits proliferation and migration of human vascular smooth muscle cells: similar effects in cells from postmenopausal females and in males." <u>Cardiovasc Res</u> **32**(5): 980-5.
- Dempsey, E. C., et al. (2000). "Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses." <u>Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol</u> **279**(3): L429-38.
- Denning, M. F., et al. (1998). "Protein kinase Cdelta is activated by caspasedependent proteolysis during ultraviolet radiation-induced apoptosis of human keratinocytes." J Biol Chem **273**(45): 29995-30002.
- Deroo, B. J. and K. S. Korach (2006). "Estrogen receptors and human disease." J Clin Invest **116**(3): 561-70.
- Derynck, R., et al. (1987). "Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factors alpha and beta and the epidermal growth factor receptor by human tumors." <u>Cancer Res</u> **47**(3): 707-12.
- Deryugina, E. I., et al. (1997). "Tumor cell invasion through matrigel is regulated by activated matrix metalloproteinase-2." <u>Anticancer Res</u> **17**(5A): 3201-10.
- DiGiovanni, J., et al. (2000). "Constitutive expression of insulin-like growth factor-1 in epidermal basal cells of transgenic mice leads to spontaneous tumor promotion." <u>Cancer Res</u> **60**(6): 1561-70.
- Diker-Cohen, T., et al. (2006). "Programmed cell death of stressed keratinocytes and its inhibition by vitamin D: the role of death and survival signaling pathways." <u>Apoptosis</u> **11**(4): 519-34.
- Don, A. S., et al. (2007). "Essential requirement for sphingosine kinase 2 in a sphingolipid apoptosis pathway activated by FTY720 analogues." <u>J Biol Chem</u> **282**(21): 15833-42.
- Donati, C., et al. (2007). "Sphingosine 1-phosphate mediates proliferation and survival of mesoangioblasts." <u>Stem Cells</u> **25**(7): 1713-9.
- Dumont, N., et al. (2003). "Autocrine transforming growth factor-beta signaling mediates Smad-independent motility in human cancer cells." J Biol Chem **278**(5): 3275-85.
- Dupont, J. and D. LeRoith (2001). "Insulin and insulin-like growth factor I receptors: similarities and differences in signal transduction." <u>Horm Res</u> **55 Suppl 2**: 22-6.

- Eberle, J., et al. (2007). "Apoptosis pathways as promising targets for skin cancer therapy." <u>Br J Dermatol</u> **156 Suppl 3**: 18-24.
- Edmondson, S. R., et al. (2003). "Epidermal homeostasis: the role of the growth hormone and insulin-like growth factor systems." Endocr Rev **24**(6): 737-64.
- Egom, E. E., et al. (2009). "FTY720 prevents ischemia/reperfusion injury-associated arrhythmias in an ex vivo rat heart model via activation of Pak1/Akt signaling." <u>J Mol Cell Cardiol</u>.
- Ellis, H. M. and H. R. Horvitz (1986). "Genetic control of programmed cell death in the nematode C. elegans." <u>Cell</u> **44**(6): 817-29.
- Engel, M. E., et al. (1999). "Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription." <u>J Biol Chem</u> **274**(52): 37413-20.
- Enmark, E., et al. (1997). "Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern." J Clin Endocrinol Metab **82**(12): 4258-65.
- Enosawa, S., et al. (1996). "Induction of selective cell death targeting on mature Tlymphocytes in rats by a novel immunosuppressant, FTY720." <u>Immunopharmacology</u> **34**(2-3): 171-9.
- Exton, J. H., et al. (1973). "Effects of insulin on gluconeogenesis and cyclic AMP levels in perfused livers from diabetic rats." <u>Biochim Biophys Acta</u> **329**(1): 23-40.
- Fabregat, I., et al. (2000). "Epidermal growth factor impairs the cytochrome C/caspase-3 apoptotic pathway induced by transforming growth factor beta in rat fetal hepatocytes via a phosphoinositide 3-kinase-dependent pathway." <u>Hepatology</u> **32**(3): 528-35.
- Filardo, E., et al. (2007). "Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane." <u>Endocrinology</u> **148**(7): 3236-45.
- Filardo, E. J., et al. (2000). "Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via transactivation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF." <u>Mol Endocrinol</u> **14**(10): 1649-60.
- Filardo, E. J., et al. (2002). "Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis." <u>Mol Endocrinol</u> **16**(1): 70-84.
- Filippa, N., et al. (1999). "Mechanism of protein kinase B activation by cyclic AMPdependent protein kinase." <u>Mol Cell Biol</u> **19**(7): 4989-5000.
- Florian, M., et al. (2008). "Interaction of estrogen and tumor necrosis factor alpha in endothelial cell migration and early stage of angiogenesis." <u>Endothelium</u> 15(5-6): 265-75.
- Fransen, K., et al. (2004). "Mutation analysis of the BRAF, ARAF and RAF-1 genes in human colorectal adenocarcinomas." <u>Carcinogenesis</u> **25**(4): 527-33.
- Frey, R. S. and K. M. Mulder (1997). "TGFbeta regulation of mitogen-activated protein kinases in human breast cancer cells." <u>Cancer Lett</u> **117**(1): 41-50.
- Frias, M. A., et al. (2009). "Native and reconstituted HDL protect cardiomyocytes from doxorubicin-induced apoptosis." <u>Cardiovasc Res</u> **85**(1): 118-26.
- Fujimoto, J., et al. (1995). "Estrogen activates invasiveness of endometrial cancel cells to the interstitium." Invasion Metastasis **15**(3-4): 135-43.
- Fujimoto, J., et al. (1996). "Estrogen activates migration potential of endometrial cancer cells through basement membrane." <u>Tumour Biol</u> **17**(1): 48-57.

- Fujino, M., et al. (2001). "Activation of caspases and mitochondria in FTY720mediated apoptosis in human T cell line Jurkat." <u>Int Immunopharmacol</u> 1(11): 2011-21.
- Fujino, M., et al. (2001). "T-cell apoptosis triggered by FTY720 via mitochondrial pathway." <u>Transplant Proc</u> **33**(7-8): 3084-5.
- Fujita, T., et al. (1994). "Fungal metabolites. Part 11. A potent immunosuppressive activity found in Isaria sinclairii metabolite." J Antibiot (Tokyo) **47**(2): 208-15.
- Funayama, E., et al. (2003). "Keratinocytes promote proliferation and inhibit apoptosis of the underlying fibroblasts: an important role in the pathogenesis of keloid." <u>J Invest Dermatol</u> **121**(6): 1326-31.
- Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." <u>Nature</u> 288(5789): 373-6.
- Garami, A., et al. (2003). "Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2." <u>Mol Cell</u> **11**(6): 1457-66.
- Garcia, M., et al. (1992). "Activation of estrogen receptor transfected into a receptornegative breast cancer cell line decreases the metastatic and invasive potential of the cells." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **89**(23): 11538-42.
- Garcia, M., et al. (1997). "Both estradiol and tamoxifen decrease proliferation and invasiveness of cancer cells transfected with a mutated estrogen receptor." J <u>Steroid Biochem Mol Biol</u> **61**(1-2): 11-7.
- Gartsbein, M., et al. (2006). "The role of protein kinase C delta activation and STAT3 Ser727 phosphorylation in insulin-induced keratinocyte proliferation." <u>J Cell</u> <u>Sci</u> **119**(Pt 3): 470-81.
- Gentilini, D., et al. (2007). "PI3K/Akt and ERK1/2 signalling pathways are involved in endometrial cell migration induced by 17beta-estradiol and growth factors." <u>Mol Hum Reprod</u> **13**(5): 317-22.
- Geraldes, P., et al. (2002). "Estrogen regulation of endothelial and smooth muscle cell migration and proliferation: role of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinase." <u>Arterioscler Thromb Vasc Biol</u> **22**(10): 1585-90.
- Giovannucci, E. (1999). "Insulin-like growth factor-I and binding protein-3 and risk of cancer." Horm Res **51 Suppl 3**: 34-41.
- Goetzl, E. J., et al. (1999). "Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate protection of T cells from apoptosis in association with suppression of Bax." J Immunol **162**(4): 2049-56.
- Goetzl, E. J., et al. (2007). "Sphingosine 1-phosphate as an intracellular messenger and extracellular mediator in immunity." <u>Acta Paediatr Suppl</u> **96**(455): 49-52.
- Golstein, P. and G. Kroemer (2007). "Cell death by necrosis: towards a molecular definition." <u>Trends Biochem Sci</u> **32**(1): 37-43.
- Gonzalez-Cabrera, P. J., et al. (2008). "Full pharmacological efficacy of a novel S1P1 agonist that does not require S1P-like headgroup interactions." <u>Mol Pharmacol</u> **74**(5): 1308-18.
- Goparaju, S. K., et al. (2005). "The S1P2 receptor negatively regulates plateletderived growth factor-induced motility and proliferation." <u>Mol Cell Biol</u> **25**(10): 4237-49.
- Goss, V. L., et al. (1994). "Identification of nuclear beta II protein kinase C as a mitotic lamin kinase." J Biol Chem **269**(29): 19074-80.
- Graler, M. H. and E. J. Goetzl (2004). "The immunosuppressant FTY720 downregulates sphingosine 1-phosphate G-protein-coupled receptors." <u>Faseb J</u> **18**(3): 551-3.

- Greenspon, J., et al. (2009). "Sphingosine-1-phosphate protects intestinal epithelial cells from apoptosis through the Akt signaling pathway." <u>Dig Dis Sci</u> **54**(3): 499-510.
- Grey, A., et al. (2002). "The phospholipids sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid prevent apoptosis in osteoblastic cells via a signaling pathway involving G(i) proteins and phosphatidylinositol-3 kinase." <u>Endocrinology</u> **143**(12): 4755-63.
- Grothey, A., et al. (1999). "The role of insulin-like growth factor I and its receptor in cell growth, transformation, apoptosis, and chemoresistance in solid tumors." J Cancer Res Clin Oncol **125**(3-4): 166-73.
- Gupta, S., et al. (2010). "Mechanisms of ER Stress-Mediated Mitochondrial Membrane Permeabilization." Int J Cell Biol **2010**: 170215.
- Hammer, S., et al. (2004). "Glucocorticoids mediate differential anti-apoptotic effects in human fibroblasts and keratinocytes via sphingosine-1-phosphate formation." <u>J Cell Biochem</u> **91**(4): 840-51.
- Hanafin, N. M., et al. (1995). "Increased PKC activity in cultured human keratinocytes and fibroblasts after treatment with 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3." <u>J Cell</u> <u>Biochem</u> **57**(2): 362-70.
- Hannun, Y. A. and R. M. Bell (1989). "Functions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation." <u>Science</u> **243**(4890): 500-7.
- Hannun, Y. A., et al. (2001). "Enzymes of sphingolipid metabolism: from modular to integrative signaling." <u>Biochemistry</u> **40**(16): 4893-903.
- Harada, J., et al. (2004). "Sphingosine-1-phosphate induces proliferation and morphological changes of neural progenitor cells." <u>J Neurochem</u> 88(4): 1026-39.
- Hassoun, S. M., et al. (2006). "Sphingosine impairs mitochondrial function by opening permeability transition pore." <u>Mitochondrion</u> **6**(3): 149-54.
- Hayashi, S., et al. (2002). "Identification and characterization of RPK118, a novel sphingosine kinase-1-binding protein." <u>J Biol Chem</u> **277**(36): 33319-24.
- Hayashida, T., et al. (2003). "Cross-talk between ERK MAP kinase and Smad signaling pathways enhances TGF-beta-dependent responses in human mesangial cells." <u>FASEB J</u> **17**(11): 1576-8.
- Hayashido, Y., et al. (1998). "Estradiol and fibulin-1 inhibit motility of human ovarianand breast-cancer cells induced by fibronectin." Int J Cancer **75**(4): 654-8.
- Hennessy, B. T., et al. (2005). "Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery." <u>Nat Rev Drug Discov</u> **4**(12): 988-1004.
- Henning, G., et al. (2001). "CC chemokine receptor 7-dependent and -independent pathways for lymphocyte homing: modulation by FTY720." J Exp Med **194**(12): 1875-81.
- Hidalgo, M. and E. K. Rowinsky (2000). "The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy." <u>Oncogene</u> **19**(56): 6680-6.
- Hishikawa, K., et al. (1999). "Connective tissue growth factor induces apoptosis in human breast cancer cell line MCF-7." J Biol Chem **274**(52): 37461-6.
- Hla, T. and T. Maciag (1990). "An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors." J Biol Chem **265**(16): 9308-13.
- Ho, J. W., et al. (2005). "Effects of a novel immunomodulating agent, FTY720, on tumor growth and angiogenesis in hepatocellular carcinoma." <u>Mol Cancer Ther</u> 4(9): 1430-8.
- Hodak, E., et al. (1996). "The insulin-like growth factor 1 receptor is expressed by epithelial cells with proliferative potential in human epidermis and skin

appendages: correlation of increased expression with epidermal hyperplasia." <u>J Invest Dermatol</u> **106**(3): 564-70.

- Hofmann, U., et al. (2009). "Protective effects of sphingosine-1-phosphate receptor agonist treatment after myocardial ischaemia-reperfusion." <u>Cardiovasc Res</u> **83**(2): 285-93.
- Holst-Hansen, C., et al. (1996). "Urokinase-type plasminogen activation in three human breast cancer cell lines correlates with their in vitro invasiveness." <u>Clin</u> <u>Exp Metastasis</u> **14**(3): 297-307.
- Hoppe, J., et al. (2001). "Selective degradation of the PKC-epsilon isoform during cell death in AKR-2B fibroblasts." <u>Exp Cell Res</u> **266**(1): 64-73.
- Horn, F., et al. (1987). "Decreased protein kinase C activity in psoriatic versus normal epidermis." J Invest Dermatol **88**(2): 220-2.
- Huang, J. S., et al. (1999). "Ethanol potentiates the mitogenic effects of sphingosine 1-phosphate by a zinc- and calcium-dependent mechanism in fibroblasts." <u>Arch Biochem Biophys</u> **366**(1): 131-8.
- Huang, S. T. and J. A. Cidlowski (2002). "Phosphorylation status modulates Bcl-2 function during glucocorticoid-induced apoptosis in T lymphocytes." <u>FASEB J</u> 16(8): 825-32.
- Hubbard, S. R. (1997). "Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog." <u>EMBO J</u> **16**(18): 5572-81.
- Hudes, G., et al. (2007). "Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renalcell carcinoma." <u>N Engl J Med</u> **356**(22): 2271-81.
- Hung, J. H., et al. (2008). "FTY720 induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells through activation of protein kinase C delta signaling." <u>Cancer Res</u> 68(4): 1204-12.
- Igarashi, J., et al. (2001). "Sphingosine 1-phosphate and activation of endothelial nitric-oxide synthase. differential regulation of Akt and MAP kinase pathways by EDG and bradykinin receptors in vascular endothelial cells." <u>J Biol Chem</u> **276**(15): 12420-6.
- Igarashi, J. and T. Michel (2001). "Sphingosine 1-phosphate and isoform-specific activation of phosphoinositide 3-kinase beta. Evidence for divergence and convergence of receptor-regulated endothelial nitric-oxide synthase signaling pathways." J Biol Chem **276**(39): 36281-8.
- Igarashi, N., et al. (2003). "Sphingosine kinase 2 is a nuclear protein and inhibits DNA synthesis." J Biol Chem **278**(47): 46832-9.
- Ignarro, L. J., et al. (1987). "Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **84**(24): 9265-9.
- Imamichi, Y., et al. (2005). "TGF beta-induced focal complex formation in epithelial cells is mediated by activated ERK and JNK MAP kinases and is independent of Smad4." <u>Biol Chem</u> **386**(3): 225-36.
- Imasawa, T., et al. (2010). "Blockade of sphingosine 1-phosphate receptor 2 signaling attenuates streptozotocin-induced apoptosis of pancreatic beta-cells." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **392**(2): 207-11.
- Inohara, S., et al. (1988). "Immunohistological identification of protein kinase C isozymes in normal and psoriatic epidermis." <u>Arch Dermatol Res</u> **280**(7): 454-5.
- Isensee, J., et al. (2009). "Expression pattern of G protein-coupled receptor 30 in LacZ reporter mice." Endocrinology **150**(4): 1722-30.

- Ishihara, H., et al. (2000). "Keloid fibroblasts resist ceramide-induced apoptosis by overexpression of insulin-like growth factor I receptor." <u>J Invest Dermatol</u> **115**(6): 1065-71.
- Ito, I., et al. (2010). "Estrogen inhibits TGF-{beta} signaling by promoting Smad2/3 degradation." J Biol Chem.
- Ito, K., et al. (2007). "Lack of sphingosine 1-phosphate-degrading enzymes in erythrocytes." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **357**(1): 212-7.
- Ito, T., et al. (1997). "Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function." J Biol Chem **272**(18): 11671-3.
- Itoh, S., et al. (2000). "Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins." <u>Eur J Biochem</u> **267**(24): 6954-67.
- Jacobson, M. D., et al. (1997). "Programmed cell death in animal development." <u>Cell</u> **88**(3): 347-54.
- Jager, R., et al. (1997). "Overexpression of Bcl-2 inhibits alveolar cell apoptosis during involution and accelerates c-myc-induced tumorigenesis of the mammary gland in transgenic mice." <u>Oncogene</u> **15**(15): 1787-95.
- Jaillard, C., et al. (2005). "Edg8/S1P5: an oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival." <u>J Neurosci</u> **25**(6): 1459-69.
- Japtok, L. and B. Kleuser (2009). "The role of sphingosine-1-phosphate receptor modulators in the prevention of transplant rejection and autoimmune diseases." <u>Curr Opin Investig Drugs</u> **10**(11): 1183-94.
- Jelaska, A. and J. H. Korn (2000). "Role of apoptosis and transforming growth factor beta1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis." <u>Arthritis</u> <u>Rheum</u> **43**(10): 2230-9.
- Jerome-Morais, A., et al. (2009). "Role for protein kinase C-alpha in keratinocyte growth arrest." J Invest Dermatol **129**(10): 2365-75.
- Jessup, W. (2008). "Lipid metabolism: sources and stability of plasma sphingosine-1phosphate." <u>Curr Opin Lipidol</u> **19**(5): 543-4.
- Jost, M., et al. (2001). "Epidermal growth factor receptor-dependent control of keratinocyte survival and Bcl-xL expression through a MEK-dependent pathway." J Biol Chem **276**(9): 6320-6.
- Jun, D. J., et al. (2006). "Sphingosine-1-phosphate modulates both lipolysis and leptin production in differentiated rat white adipocytes." <u>Endocrinology</u> 147(12): 5835-44.
- Kahlert, S., et al. (2000). "Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway." J Biol Chem **275**(24): 18447-53.
- Kandel, E. S. and N. Hay (1999). "The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB." <u>Exp Cell Res</u> **253**(1): 210-29.
- Kappos, L., et al. (2006). "Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis." <u>N Engl J Med</u> **355**(11): 1124-40.
- Kappos, L., et al. (2010). "A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis." <u>N Engl J Med</u> **362**(5): 387-401.
- Katsuma, S., et al. (2002). "Signalling mechanisms in sphingosine 1-phosphatepromoted mesangial cell proliferation." <u>Genes Cells</u> **7**(12): 1217-30.
- Katzenellenbogen, B. S., et al. (1997). "William L. McGuire Memorial Lecture. Antiestrogens: mechanisms of action and resistance in breast cancer." <u>Breast</u> <u>Cancer Res Treat</u> **44**(1): 23-38.
- Keller, C. D., et al. (2007). "Immunomodulator FTY720 induces myofibroblast differentiation via the lysophospholipid receptor S1P3 and Smad3 signaling." <u>Am J Pathol</u> **170**(1): 281-92.

- Kerr, J. F., et al. (1994). "Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy." <u>Cancer</u> **73**(8): 2013-26.
- Kerr, J. F., et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics." <u>Br J Cancer</u> **26**(4): 239-57.
- Keshamouni, V. G., et al. (2002). "Mechanism of 17-beta-estradiol-induced Erk1/2 activation in breast cancer cells. A role for HER2 AND PKC-delta." J Biol Chem **277**(25): 22558-65.
- Kim, B. M., et al. (2009). "N,N-dimethyl phytosphingosine induces caspase-8dependent cytochrome c release and apoptosis through ROS generation in human leukemia cells." <u>Toxicol Appl Pharmacol</u> 239(1): 87-97.
- Kim, D. S., et al. (2004). "Sphingosine-1-phosphate inhibits human keratinocyte proliferation via Akt/protein kinase B inactivation." <u>Cell Signal</u> **16**(1): 89-95.
- Kim, D. S., et al. (2003). "Sphingosine-1-phosphate-induced ERK activation protects human melanocytes from UVB-induced apoptosis." <u>Arch Pharm Res</u> 26(9): 739-46.
- Kingsley, D. M. (1994). "The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms." <u>Genes Dev</u> 8(2): 133-46.
- Kitabchi, A. E. (1977). "Proinsulin and C-peptide: a review." <u>Metabolism</u> **26**(5): 547-87.
- Kluck, R. M., et al. (1997). "The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis." <u>Science</u> **275**(5303): 1132-6.
- Kluepfel, D., et al. (1972). "Myriocin, a new antifungal antibiotic from Myriococcum albomyces." <u>J Antibiot (Tokyo)</u> **25**(2): 109-15.
- Kluk, M. J. and T. Hla (2001). "Role of the sphingosine 1-phosphate receptor EDG-1 in vascular smooth muscle cell proliferation and migration." <u>Circ Res</u> **89**(6): 496-502.
- Kobayashi, N., et al. (2006). "Sphingosine 1-phosphate is released from the cytosol of rat platelets in a carrier-mediated manner." <u>J Lipid Res</u> **47**(3): 614-21.
- Kobayashi, N., et al. (2009). "Characterization of the ATP-dependent sphingosine 1phosphate transporter in rat erythrocytes." <u>J Biol Chem</u> **284**(32): 21192-200.
- Kock, A., et al. (1990). "Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light." <u>J Exp Med</u> **172**(6): 1609-14.
- Kohno, T., et al. (2003). "Sphingosine 1-phosphate promotes cell migration through the activation of Cdc42 in Edg-6/S1P4-expressing cells." <u>Genes Cells</u> **8**(8): 685-97.
- Kon, J., et al. (1999). "Comparison of intrinsic activities of the putative sphingosine 1-phosphate receptor subtypes to regulate several signaling pathways in their cDNA-transfected Chinese hamster ovary cells." J Biol Chem 274(34): 23940-7.
- Konishi, H., et al. (1997). "Activation of protein kinase B (Akt/RAC-protein kinase) by cellular stress and its association with heat shock protein Hsp27." <u>FEBS Lett</u> **410**(2-3): 493-8.
- Kornblau, S. M., et al. (2006). "Simultaneous activation of multiple signal transduction pathways confers poor prognosis in acute myelogenous leukemia." <u>Blood</u> **108**(7): 2358-65.

Korsmeyer, S. J. (1995). "Regulators of cell death." <u>Trends Genet</u> **11**(3): 101-5.

Kretzschmar, M., et al. (1999). "A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras." <u>Genes Dev</u> **13**(7): 804-16.

- Krischel, V., et al. (1998). "Biphasic effect of exogenous nitric oxide on proliferation and differentiation in skin derived keratinocytes but not fibroblasts." <u>J Invest</u> <u>Dermatol</u> **111**(2): 286-91.
- Kroemer, G., et al. (2005). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death." <u>Cell Death Differ</u> **12 Suppl 2**: 1463-7.
- Kroncke, K. D., et al. (1997). "Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection--how, why, when, and where?" <u>Nitric Oxide</u> **1**(2): 107-20.
- Kulik, G. and M. J. Weber (1998). "Akt-dependent and -independent survival signaling pathways utilized by insulin-like growth factor I." <u>Mol Cell Biol</u> **18**(11): 6711-8.
- Kwon, Y. G., et al. (2001). "Sphingosine 1-phosphate protects human umbilical vein endothelial cells from serum-deprived apoptosis by nitric oxide production." J <u>Biol Chem</u> **276**(14): 10627-33.
- Lacana, E., et al. (2002). "Cloning and characterization of a protein kinase A anchoring protein (AKAP)-related protein that interacts with and regulates sphingosine kinase 1 activity." J Biol Chem **277**(36): 32947-53.
- Lane, D. P. (1992). "Cancer. p53, guardian of the genome." Nature 358(6381): 15-6.
- Laporte, M., et al. (2000). "Apoptosis in established and healing psoriasis." Dermatology **200**(4): 314-6.
- Lawen, A. (2003). "Apoptosis-an introduction." Bioessays 25(9): 888-96.
- Lawlor, M. A. and D. R. Alessi (2001). "PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses?" <u>J Cell Sci</u> **114**(Pt 16): 2903-10.
- Lee, J. Y., et al. (1996). "Ceramide inactivates cellular protein kinase Calpha." <u>J Biol</u> <u>Chem</u> **271**(22): 13169-74.
- Lee, M. J., et al. (1999). "Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate." <u>Cell</u> **99**(3): 301-12.
- Lee, O. H., et al. (1999). "Sphingosine 1-phosphate induces angiogenesis: its angiogenic action and signaling mechanism in human umbilical vein endothelial cells." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **264**(3): 743-50.
- Lee, T. K., et al. (2004). "FTY720 induces apoptosis of human hepatoma cell lines through PI3-K-mediated Akt dephosphorylation." <u>Carcinogenesis</u> **25**(12): 2397-405.
- Leroux, M. E., et al. (2007). "Sphingolipids and the sphingosine kinase inhibitor, SKI II, induce BCL-2-independent apoptosis in human prostatic adenocarcinoma cells." <u>Prostate</u> **67**(15): 1699-717.
- Li, D., et al. (2004). "Role of extracelluar regulated protein kinases in FTY720induced apoptosis of leukemia cell lines HL-60 and U937." <u>J Huazhong Univ</u> <u>Sci Technolog Med Sci</u> **24**(1): 45-7.
- Li, H., et al. (2005). "High glucose inhibits apoptosis induced by serum deprivation in vascular smooth muscle cells via upregulation of Bcl-2 and Bcl-xl." <u>Diabetes</u> **54**(2): 540-5.
- Li, H., et al. (1998). "Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis." <u>Cell</u> **94**(4): 491-501.
- Li, L., et al. (1999). "Protein kinase Cdelta targets mitochondria, alters mitochondrial membrane potential, and induces apoptosis in normal and neoplastic keratinocytes when overexpressed by an adenoviral vector." <u>Mol Cell Biol</u> **19**(12): 8547-58.
- Li, L., et al. (2006). "Protein kinase C negatively regulates Akt activity and modifies UVC-induced apoptosis in mouse keratinocytes." <u>J Biol Chem</u> **281**(6): 3237-43.

- Li, Q. F., et al. (2008). "Sphingosine 1-phosphate induces Mcl-1 upregulation and protects multiple myeloma cells against apoptosis." <u>Biochem Biophys Res</u> <u>Commun</u> **371**(1): 159-62.
- Li, Y., et al. (2009). "Insulin-like growth factor-1 receptor activation prevents high glucose-induced mitochondrial dysfunction, cytochrome-c release and apoptosis." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **384**(2): 259-64.
- Lippens, S., et al. (2005). "Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification." <u>Cell Death Differ</u> **12 Suppl 2**: 1497-508.
- Lippens, S., et al. (2000). "Epidermal differentiation does not involve the proapoptotic executioner caspases, but is associated with caspase-14 induction and processing." <u>Cell Death Differ</u> **7**(12): 1218-24.
- Liu, H., et al. (2003). "Sphingosine kinase type 2 is a putative BH3-only protein that induces apoptosis." J Biol Chem **278**(41): 40330-6.
- Liu, J. P., et al. (1993). "Mice carrying null mutations of the genes encoding insulinlike growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r)." <u>Cell</u> **75**(1): 59-72.
- Liu, Y., et al. (2009). "Cell and molecular mechanisms of keratinocyte function stimulated by insulin during wound healing." <u>BMC Cell Biol</u> **10**: 1.
- Luo, X., et al. (1998). "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors." <u>Cell</u> **94**(4): 481-90.
- Ly, J. D., et al. (2003). "The mitochondrial membrane potential (deltapsi(m)) in apoptosis; an update." <u>Apoptosis</u> **8**(2): 115-28.
- Maceyka, M., et al. (2005). "SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism." J Biol Chem **280**(44): 37118-29.
- Maeurer, C., et al. (2009). "Sphingosine-1-phosphate induced mTOR-activation is mediated by the E3-ubiquitin ligase PAM." <u>Cell Signal</u> **21**(2): 293-300.
- Malek, D., et al. (2006). "17-Beta-estradiol inhibits transforming-growth-factor-betainduced MCF-7 cell migration by Smad3-repression." <u>Eur J Pharmacol</u> 534(1-3): 39-47.
- Malet, C., et al. (2001). "Estrogen and antiestrogen actions on transforming growth factorbeta (TGFbeta) in normal human breast epithelial (HBE) cells." <u>Mol Cell</u> <u>Endocrinol</u> **174**(1-2): 21-30.
- Mandala, S., et al. (2002). "Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1phosphate receptor agonists." <u>Science</u> **296**(5566): 346-9.
- Mandil, R., et al. (2001). "Protein kinase Calpha and protein kinase Cdelta play opposite roles in the proliferation and apoptosis of glioma cells." <u>Cancer Res</u> **61**(11): 4612-9.
- Manggau, M., et al. (2001). "1Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 protects human keratinocytes from apoptosis by the formation of sphingosine-1-phosphate." J Invest Dermatol **117**(5): 1241-9.
- Marletta, M. A. (1993). "Nitric oxide synthase structure and mechanism." <u>J Biol Chem</u> **268**(17): 12231-4.
- Massague, J. (1998). "TGF-beta signal transduction." <u>Annu Rev Biochem</u> **67**: 753-91. Massague, J. (2008). "TGFbeta in Cancer." <u>Cell</u> **134**(2): 215-30.
- Mathew, A. C., et al. (1997). "Influence of antiestrogens on the migration of breast cancer cells using an in vitro wound model." <u>Clin Exp Metastasis</u> **15**(4): 393-9.
- Matloubian, M., et al. (2004). "Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1." <u>Nature</u> **427**(6972): 355-60.
- Matsuda, S., et al. (1999). "Differential activation of c-Jun NH2-terminal kinase and p38 pathways during FTY720-induced apoptosis of T lymphocytes that is

suppressed by the extracellular signal-regulated kinase pathway." <u>J Immunol</u> **162**(6): 3321-6.

- Matsuda, T., et al. (1998). "Caspase requirement for the apoptotic death of WR19Linduced by FTY720." <u>Transplant Proc</u> **30**(5): 2355-7.
- Matsuda, T., et al. (2001). "Cross-talk between transforming growth factor-beta and estrogen receptor signaling through Smad3." J Biol Chem **276**(46): 42908-14.
- Matsui, M. S., et al. (1992). "Protein kinase C in normal human epidermal keratinocytes during proliferation and calcium-induced differentiation." <u>J Invest</u> <u>Dermatol</u> **99**(5): 565-71.
- Matsuoka, Y., et al. (2003). "A novel immunosuppressive agent FTY720 induced Akt dephosphorylation in leukemia cells." <u>Br J Pharmacol</u> **138**(7): 1303-12.
- May, W. S., et al. (1994). "Interleukin-3 and bryostatin-1 mediate hyperphosphorylation of BCL2 alpha in association with suppression of apoptosis." J Biol Chem **269**(43): 26865-70.
- McCall, C. A. and J. J. Cohen (1991). "Programmed cell death in terminally differentiating keratinocytes: role of endogenous endonuclease." <u>J Invest</u> <u>Dermatol</u> **97**(1): 111-4.
- McCubrey, J. A., et al. (2007). "Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1773**(8): 1263-84.
- McGill, A., et al. (2005). "The anti-psoriatic drug anthralin accumulates in keratinocyte mitochondria, dissipates mitochondrial membrane potential, and induces apoptosis through a pathway dependent on respiratory competent mitochondria." <u>FASEB J</u> **19**(8): 1012-4.
- Means, C. K., et al. (2007). "Sphingosine 1-phosphate S1P2 and S1P3 receptormediated Akt activation protects against in vivo myocardial ischemiareperfusion injury." <u>Am J Physiol Heart Circ Physiol</u> **292**(6): H2944-51.
- Melino, G. (2001). "The Sirens' song." Nature 412(6842): 23.
- Memmott, R. M. and P. A. Dennis (2009). "Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer." <u>Cell Signal</u> **21**(5): 656-64.
- Meng, Q., et al. (2000). "Suppression of breast cancer invasion and migration by indole-3-carbinol: associated with up-regulation of BRCA1 and E-cadherin/catenin complexes." J Mol Med **78**(3): 155-65.
- Merrill, A. H., Jr. (2002). "De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway." J Biol Chem **277**(29): 25843-6.
- Merrill, A. H., Jr. and V. L. Stevens (1989). "Modulation of protein kinase C and diverse cell functions by sphingosine--a pharmacologically interesting compound linking sphingolipids and signal transduction." <u>Biochim Biophys</u> <u>Acta</u> **1010**(2): 131-9.
- Meyer Zu Heringdorf, D. (2004). "Lysophospholipid receptor-dependent and independent calcium signaling." J Cell Biochem **92**(5): 937-48.
- Meyer zu Heringdorf, D. and K. H. Jakobs (2007). "Lysophospholipid receptors: signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1768**(4): 923-40.
- Miron, V. E., et al. (2008). "Cyclical and dose-dependent responses of adult human mature oligodendrocytes to fingolimod." <u>Am J Pathol</u> **173**(4): 1143-52.
- Miron, V. E., et al. (2008). "FTY720 modulates human oligodendrocyte progenitor process extension and survival." <u>Ann Neurol</u> **63**(1): 61-71.
- Misra, P., et al. (1986). "Characterization of insulin-like growth factor-I/somatomedin-C receptors on human keratinocyte monolayers." J Invest Dermatol **87**(2): 264-7.

- Miyake, Y., et al. (1995). "Serine palmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, ISP-1/myriocin." <u>Biochem Biophys Res</u> <u>Commun</u> **211**(2): 396-403.
- Miyazono, K., et al. (2003). "Regulation of TGF-beta signaling and its roles in progression of tumors." <u>Cancer Sci</u> **94**(3): 230-4.
- Motzer, R. J., et al. (2008). "Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial." <u>Lancet</u> **372**(9637): 449-56.
- Motzer, R. J., et al. (2007). "Phase I/II trial of temsirolimus combined with interferon alfa for advanced renal cell carcinoma." <u>J Clin Oncol</u> **25**(25): 3958-64.
- Muraoka-Cook, R. S., et al. (2005). "Dual role of transforming growth factor beta in mammary tumorigenesis and metastatic progression." <u>Clin Cancer Res</u> **11**(2 Pt 2): 937s-43s.
- Muraoka, R. S., et al. (2002). "Blockade of TGF-beta inhibits mammary tumor cell viability, migration, and metastases." J Clin Invest **109**(12): 1551-9.
- Murata, M., et al. (1997). "Calphostin C synergistically induces apoptosis with VP-16 in lymphoma cells which express abundant phosphorylated Bcl-2 protein." <u>Cell</u> <u>Mol Life Sci</u> **53**(9): 737-43.
- Murayama, T. and M. Ui (1983). "Loss of the inhibitory function of the guanine nucleotide regulatory component of adenylate cyclase due to its ADP ribosylation by islet-activating protein, pertussis toxin, in adipocyte membranes." J Biol Chem **258**(5): 3319-26.
- Nagahara, Y., et al. (2000). "Evidence that FTY720 induces T cell apoptosis in vivo." Immunopharmacology **48**(1): 75-85.
- Nagahara, Y., et al. (2000). "Immunosuppressant FTY720 induces apoptosis by direct induction of permeability transition and release of cytochrome c from mitochondria." J Immunol **165**(6): 3250-9.
- Nagaoka, Y., et al. (2008). "Effects of phosphorylation of immunomodulatory agent FTY720 (fingolimod) on antiproliferative activity against breast and colon cancer cells." <u>Biol Pharm Bull</u> **31**(6): 1177-81.
- Nakae, J., et al. (2001). "Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors." Endocr Rev 22(6): 818-35.
- Negulescu, O., et al. (2002). "Estradiol reverses TGF-beta1-induced mesangial cell apoptosis by a casein kinase 2-dependent mechanism." <u>Kidney Int</u> **62**(6): 1989-98.
- Nelson, L. R. and S. E. Bulun (2001). "Estrogen production and action." <u>J Am Acad</u> <u>Dermatol</u> **45**(3 Suppl): S116-24.
- Nicotera, P. and G. Melino (2007). "Caspase-14 and epidermis maturation." <u>Nat Cell</u> <u>Biol</u> **9**(6): 621-2.
- Nieuwenhuis, B., et al. (2009). "Involvement of the ABC-transporter ABCC1 and the sphingosine 1-phosphate receptor subtype S1P(3) in the cytoprotection of human fibroblasts by the glucocorticoid dexamethasone." J Mol Med **87**(6): 645-57.
- Nieuwenhuis, B., et al. (2009). "Dexamethasone protects human fibroblasts from apoptosis via an S1P(3)-receptor subtype dependent activation of PKB/Akt and Bcl(XL)." <u>Pharmacol Res</u>.
- Nikolova, Z., et al. (2001). "Combined FTY720/cyclosporine treatment promotes graft survival and lowers the peripheral lymphocyte count in a murine cardiac allotransplantation model." <u>Transplantation</u> **72**(1): 168-71.
- Nishizuka, Y. (1988). "The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation." <u>Nature</u> **334**(6184): 661-5.

- Noda, T., et al. (2009). "The late stages of autophagy: how does the end begin?" <u>Cell</u> <u>Death Differ</u> **16**(7): 984-90.
- Nofer, J. R., et al. (2004). "HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3." <u>J Clin Invest</u> **113**(4): 569-81.
- Nylander-Koski, O., et al. (2007). "The effect of nitric oxide, growth factors, and estrogen on gastric cell migration." J Surg Res 143(2): 230-7.
- O'Connor, P., et al. (2009). "Oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis: Two-year results of a phase II extension study." <u>Neurology</u> **72**(1): 73-79.
- Okamoto, H., et al. (1998). "EDG1 is a functional sphingosine-1-phosphate receptor that is linked via a Gi/o to multiple signaling pathways, including phospholipase C activation, Ca2+ mobilization, Ras-mitogen-activated protein kinase activation, and adenylate cyclase inhibition." J Biol Chem **273**(42): 27104-10.
- Olivera, A., et al. (1999). "Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival." <u>J Cell Biol</u> **147**(3): 545-58.
- Oren, M. (1992). "p53: the ultimate tumor suppressor gene?" <u>FASEB J</u> 6(13): 3169-76.
- Osinde, M., et al. (2007). "Phosphorylated FTY720 stimulates ERK phosphorylation in astrocytes via S1P receptors." <u>Neuropharmacology</u> **52**(5): 1210-8.
- Otto, C., et al. (2009). "GPR30 does not mediate estrogenic responses in reproductive organs in mice." <u>Biol Reprod</u> **80**(1): 34-41.
- Otto, C., et al. (2008). "G protein-coupled receptor 30 localizes to the endoplasmic reticulum and is not activated by estradiol." <u>Endocrinology</u> **149**(10): 4846-56.
- Oyama, Y., et al. (1998). "Cytotoxic actions of FTY720, a novel immunosuppressant, on thymocytes and brain neurons dissociated from the rat." Jpn J Pharmacol **76**(4): 377-85.
- Palmer, R. H., et al. (1995). "Activation of PRK1 by phosphatidylinositol 4,5bisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. A comparison with protein kinase C isotypes." J Biol Chem **270**(38): 22412-6.
- Pan, S., et al. (2006). "A monoselective sphingosine-1-phosphate receptor-1 agonist prevents allograft rejection in a stringent rat heart transplantation model." <u>Chem Biol</u> **13**(11): 1227-34.
- Pandey, D. P., et al. (2009). "Estrogenic GPR30 signalling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF." <u>EMBO J</u> **28**(5): 523-32.
- Papp, H., et al. (2004). "Opposite roles of protein kinase C isoforms in proliferation, differentiation, apoptosis, and tumorigenicity of human HaCaT keratinocytes." <u>Cell Mol Life Sci</u> 61(9): 1095-105.
- Pappas, T. C., et al. (1995). "Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding." <u>FASEB J</u> **9**(5): 404-10.
- Pappu, R., et al. (2007). "Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate." <u>Science</u> **316**(5822): 295-8.
- Parrill, A. L., et al. (2004). "Sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid receptors: agonist and antagonist binding and progress toward development of receptor-specific ligands." <u>Semin Cell Dev Biol</u> **15**(5): 467-76.
- Paugh, S. W., et al. (2003). "The immunosuppressant FTY720 is phosphorylated by sphingosine kinase type 2." <u>FEBS Lett</u> **554**(1-2): 189-93.
- Paz, M. L., et al. (2008). "Mitochondrial dysfunction and cellular stress progression after ultraviolet B irradiation in human keratinocytes." <u>Photodermatol</u> <u>Photoimmunol Photomed</u> **24**(3): 115-22.

- Pedram, A., et al. (2002). "Integration of the non-genomic and genomic actions of estrogen. Membrane-initiated signaling by steroid to transcription and cell biology." <u>J Biol Chem</u> 277(52): 50768-75.
- Pedram, A., et al. (2006). "Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane." Mol Endocrinol **20**(9): 1996-2009.
- Perez-Garcia, M. J., et al. (2004). "Glial cell line-derived neurotrophic factor increases intracellular calcium concentration. Role of calcium/calmodulin in the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway." J Biol Chem **279**(7): 6132-42.
- Perez, M. I. and S. R. Kohn (1994). "Cutaneous manifestations of diabetes mellitus." J Am Acad Dermatol **30**(4): 519-31; quiz 532-4.
- Permpongkosol, S., et al. (2002). "Anticarcinogenic effect of FTY720 in human prostate carcinoma DU145 cells: modulation of mitogenic signaling, FAK, cell-cycle entry and apoptosis." Int J Cancer **98**(2): 167-72.
- Pouliot, F. and C. Labrie (1999). "Expression profile of agonistic Smads in human breast cancer cells: absence of regulation by estrogens." <u>Int J Cancer</u> 81(1): 98-103.
- Prest, S. J., et al. (2002). "The estrogen-regulated protein, TFF1, stimulates migration of human breast cancer cells." <u>FASEB J</u> **16**(6): 592-4.
- Raj, D., et al. (2006). "Keratinocyte apoptosis in epidermal development and disease." J Invest Dermatol **126**(2): 243-57.
- Ramos, J. W. (2008). "The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells." Int J Biochem Cell Biol **40**(12): 2707-19.
- Razandi, M., et al. (2000). "Estrogen signals to the preservation of endothelial cell form and function." J Biol Chem **275**(49): 38540-6.
- Razandi, M., et al. (2004). "Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers." <u>Mol Endocrinol</u> **18**(12): 2854-65.
- Reiss, M. and M. H. Barcellos-Hoff (1997). "Transforming growth factor-beta in breast cancer: a working hypothesis." <u>Breast Cancer Res Treat</u> **45**(1): 81-95.
- Revankar, C. M., et al. (2005). "A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling." <u>Science</u> **307**(5715): 1625-30.
- Rhyu, D. Y., et al. (2005). "Role of reactive oxygen species in TGF-beta1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells." J Am Soc Nephrol **16**(3): 667-75.
- Riedl, S. J. and G. S. Salvesen (2007). "The apoptosome: signalling platform of cell death." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> **8**(5): 405-13.
- Ristow, H. J. (1993). "Effect of insulin-like growth factor-l/somatomedin C on thymidine incorporation in cultured psoriatic keratinocytes after growth arrest in growth factor-free medium." <u>Growth Regul</u> **3**(2): 129-37.
- Rodeck, U., et al. (1991). "Basic fibroblast growth factor in human melanoma." Cancer Cells **3**(8): 308-11.
- Rosen, H., et al. (2009). "Sphingosine 1-phosphate receptor signaling." <u>Annu Rev</u> <u>Biochem</u> **78**: 743-68.
- Rosenberger, C., et al. (2007). "Upregulation of hypoxia-inducible factors in normal and psoriatic skin." <u>J Invest Dermatol</u> **127**(10): 2445-52.
- Rosman, D. S., et al. (2008). "TGFBR1*6A enhances the migration and invasion of MCF-7 breast cancer cells through RhoA activation." <u>Cancer Res</u> 68(5): 1319-28.
- Rudolf, E., et al. (2005). "Hexavalent chromium disrupts the actin cytoskeleton and induces mitochondria-dependent apoptosis in human dermal fibroblasts." <u>Toxicol In Vitro</u> **19**(6): 713-23.

Ryle, A. P., et al. (1955). "The disulphide bonds of insulin." Biochem J 60(4): 541-56.

- Saba, J. D. and T. Hla (2004). "Point-counterpoint of sphingosine 1-phosphate metabolism." <u>Circ Res</u> **94**(6): 724-34.
- Sadagurski, M., et al. (2006). "Insulin-like growth factor 1 receptor signaling regulates skin development and inhibits skin keratinocyte differentiation." <u>Mol Cell Biol</u> **26**(7): 2675-87.
- Saiki, R. K., et al. (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." <u>Science</u> **230**(4732): 1350-4.
- Saji, S., et al. (2005). "Significance of HDAC6 regulation via estrogen signaling for cell motility and prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer." <u>Oncogene</u> **24**(28): 4531-9.
- Sanchez, T., et al. (2003). "Phosphorylation and action of the immunomodulator FTY720 inhibits vascular endothelial cell growth factor-induced vascular permeability." J Biol Chem **278**(47): 47281-90.
- Sanna, M. G., et al. (2004). "Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor subtypes S1P1 and S1P3, respectively, regulate lymphocyte recirculation and heart rate." J Biol Chem **279**(14): 13839-48.
- Santiago, B., et al. (2001). "Decreased susceptibility to Fas-induced apoptosis of systemic sclerosis dermal fibroblasts." <u>Arthritis Rheum</u> **44**(7): 1667-76.
- Sato, K., et al. (2007). "Critical role of ABCA1 transporter in sphingosine 1-phosphate release from astrocytes." <u>J Neurochem</u>.
- Sauer, B., et al. (2005). "Sphingosine 1-phosphate is involved in cytoprotective actions of calcitriol in human fibroblasts and enhances the intracellular Bcl-2/Bax rheostat." <u>Pharmazie</u> **60**(4): 298-304.
- Sauer, B., et al. (2003). "Antiapoptotic action of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in primary human melanocytes." <u>Melanoma Res</u> **13**(4): 339-47.
- Schaffer, M. R., et al. (1997). "Nitric oxide metabolism in wounds." <u>J Surg Res</u> **71**(1): 25-31.
- Schmid, G., et al. (2005). "FTY720 inhibits tumor growth and angiogenesis." <u>Transplant Proc</u> **37**(1): 110-1.
- Schuppel, M., et al. (2008). "Sphingosine 1-phosphate restrains insulin-mediated keratinocyte proliferation via inhibition of Akt through the S1P2 receptor subtype." J Invest Dermatol **128**(7): 1747-56.
- Segrelles, C., et al. (2002). "Functional roles of Akt signaling in mouse skin tumorigenesis." <u>Oncogene</u> **21**(1): 53-64.
- Sekulic, A., et al. (2000). "A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogenstimulated and transformed cells." <u>Cancer Res</u> **60**(13): 3504-13.
- Shen, S., et al. (2001). "PKCdelta activation: a divergence point in the signaling of insulin and IGF-1-induced proliferation of skin keratinocytes." <u>Diabetes</u> 50(2): 255-64.
- Shen, Y., et al. (2007). "FTY720, a synthetic compound from Isaria sinclairii, inhibits proliferation and induces apoptosis in pancreatic cancer cells." <u>Cancer Lett</u> **254**(2): 288-97.
- Shimizu, H., et al. (2005). "KRP-203, a novel synthetic immunosuppressant, prolongs graft survival and attenuates chronic rejection in rat skin and heart allografts." <u>Circulation</u> **111**(2): 222-9.
- Shimizu, S., et al. (1996). "Bcl-2 blocks loss of mitochondrial membrane potential while ICE inhibitors act at a different step during inhibition of death induced by respiratory chain inhibitors." <u>Oncogene</u> **13**(1): 21-9.

- Shinomiya, T., et al. (1997). "An immunosuppressive agent, FTY720, increases intracellular concentration of calcium ion and induces apoptosis in HL-60." Immunology **91**(4): 594-600.
- Silbiger, S., et al. (1998). "Estradiol reverses TGF-beta1-stimulated type IV collagen gene transcription in murine mesangial cells." <u>Am J Physiol</u> **274**(6 Pt 2): F1113-8.
- Singh, S. S., et al. (1993). "Activation of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **195**(1): 104-12.
- Soltoff, S. P. (2007). "Rottlerin: an inappropriate and ineffective inhibitor of PKCdelta." <u>Trends Pharmacol Sci</u> **28**(9): 453-8.
- Sonoda, Y., et al. (2001). "FTY720, a novel immunosuppressive agent, induces apoptosis in human glioma cells." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **281**(2): 282-8.
- Spiegel, S. and S. Milstien (2003). "Exogenous and intracellularly generated sphingosine 1-phosphate can regulate cellular processes by divergent pathways." <u>Biochem Soc Trans</u> **31**(Pt 6): 1216-9.
- Spiegel, S. and S. Milstien (2003). "Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> **4**(5): 397-407.
- Stoica, G. E., et al. (2003). "Estradiol rapidly activates Akt via the ErbB2 signaling pathway." <u>Mol Endocrinol</u> **17**(5): 818-30.
- Strasser, A., et al. (1990). "Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2." <u>Nature</u> **348**(6299): 331-3.
- Sukocheva, O., et al. (2006). "Estrogen transactivates EGFR via the sphingosine 1phosphate receptor Edg-3: the role of sphingosine kinase-1." <u>J Cell Biol</u> **173**(2): 301-10.
- Sukocheva, O. A., et al. (2003). "Sphingosine kinase transmits estrogen signaling in human breast cancer cells." <u>Mol Endocrinol</u> **17**(10): 2002-12.
- Sun, Y. and Z. L. Peng (2009). "Programmed cell death and cancer." <u>Postgrad Med J</u> **85**(1001): 134-40.
- Suschek, C. V., et al. (1999). "Nitric oxide fully protects against UVA-induced apoptosis in tight correlation with Bcl-2 up-regulation." J Biol Chem 274(10): 6130-7.
- Suzuki, A., et al. (1996). "Effects of 17 beta-estradiol and progesterone on growthfactor-induced proliferation and migration in human female aortic smooth muscle cells in vitro." <u>Cardiovasc Res</u> **32**(3): 516-23.
- Suzuki, S., et al. (1996). "A novel immunosuppressant, FTY720, with a unique mechanism of action, induces long-term graft acceptance in rat and dog allotransplantation." <u>Transplantation</u> **61**(2): 200-5.
- Suzuki, S., et al. (1996). "A new immunosuppressant, FTY720, induces bcl-2associated apoptotic cell death in human lymphocytes." Immunology **89**(4): 518-23.
- Taguchi, Y., et al. (2004). "Binding of estrogen receptor with estrogen conjugated to bovine serum albumin (BSA)." <u>Nucl Recept</u> **2**(1): 5.
- Takashima, S., et al. (2008). "G12/13 and Gq mediate S1P2-induced inhibition of Rac and migration in vascular smooth muscle in a manner dependent on Rho but not Rho kinase." <u>Cardiovasc Res</u> **79**(4): 689-97.
- Tan, S. Y., et al. (2007). "Aberrant Gi protein coupled receptor-mediated cell survival signaling in rheumatoid arthritis B cell lines." <u>Front Biosci</u> **12**: 1651-60.
- Tanaka, T., et al. (2002). "A novel immunosuppressive drug, FTY720, prevents the cancer progression induced by cyclosporine." <u>Cancer Lett</u> **181**(2): 165-71.

- Tapon, N., et al. (2001). "The coupling of cell growth to the cell cycle." <u>Curr Opin Cell</u> <u>Biol</u> **13**(6): 731-7.
- Tedesco-Silva, H., et al. (2004). "FTY720, a novel immunomodulator: efficacy and safety results from the first phase 2A study in de novo renal transplantation." <u>Transplantation</u> **77**(12): 1826-33.
- Tedesco-Silva, H., et al. (2007). "FTY720 versus mycophenolate mofetil in de novo renal transplantation: six-month results of a double-blind study." <u>Transplantation</u> **84**(7): 885-92.
- Theilmeier, G., et al. (2006). "High-density lipoproteins and their constituent, sphingosine-1-phosphate, directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury in vivo via the S1P3 lysophospholipid receptor." <u>Circulation</u> **114**(13): 1403-9.
- Thomas, P., et al. (2005). "Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells." <u>Endocrinology</u> **146**(2): 624-32.
- Thors, B., et al. (2003). "Inhibition of Akt phosphorylation by thrombin, histamine and lysophosphatidylcholine in endothelial cells. Differential role of protein kinase C." <u>Atherosclerosis</u> **168**(2): 245-53.
- Toker, A., et al. (1994). "Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P2 and PtdIns-3,4,5-P3." J Biol Chem **269**(51): 32358-67.
- Tong, G. M., et al. (2002). "The effect of antiestrogens on TGF-beta-mediated chemotaxis of human breast cancer cells." <u>Anticancer Res</u> **22**(1A): 103-6.
- Tredget, E. E., et al. (1997). "Hypertrophic scars, keloids, and contractures. The cellular and molecular basis for therapy." <u>Surg Clin North Am</u> **77**(3): 701-30.
- Tsai, M. J. and B. W. O'Malley (1994). "Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members." <u>Annu Rev Biochem</u> **63**: 451-86.
- Tsao, M. C., et al. (1982). "Clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in a defined medium." <u>J Cell Physiol</u> **110**(2): 219-29.
- Ubai, T., et al. (2007). "FTY720 induced Bcl-associated and Fas-independent apoptosis in human renal cancer cells in vitro and significantly reduced in vivo tumor growth in mouse xenograft." <u>Anticancer Res</u> **27**(1A): 75-88.
- Uhlenbrock, K., et al. (2002). "Sphingosine 1-phosphate is a ligand of the human gpr3, gpr6 and gpr12 family of constitutively active G protein-coupled receptors." <u>Cell Signal</u> **14**(11): 941-53.
- Vermes, I., et al. (1995). "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V." J Immunol Methods **184**(1): 39-51.
- Verrando, P. and J. P. Ortonne (1985). "Insulin binding properties of normal and transformed human epidermal cultured keratinocytes." <u>J Invest Dermatol</u> **85**(4): 328-32.
- Vivanco, I. and C. L. Sawyers (2002). "The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer." <u>Nat Rev Cancer</u> **2**(7): 489-501.
- Vladusic, E. A., et al. (2000). "Expression and regulation of estrogen receptor beta in human breast tumors and cell lines." <u>Oncol Rep</u> **7**(1): 157-67.
- Vogler, R., et al. (2003). "Sphingosine-1-phosphate and its potentially paradoxical effects on critical parameters of cutaneous wound healing." <u>J Invest Dermatol</u> **120**(4): 693-700.
- Waeber, C., et al. (2004). "Vascular sphingosine-1-phosphate S1P1 and S1P3 receptors." <u>Drug News Perspect</u> **17**(6): 365-82.

- Wakefield, L. M. and A. B. Roberts (2002). "TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis." <u>Curr Opin Genet Dev</u> **12**(1): 22-9.
- Wandel, E., et al. (2002). "Fibroblasts enhance the invasive capacity of melanoma cells in vitro." <u>Arch Dermatol Res</u> **293**(12): 601-8.
- Wang, C., et al. (2008). "G protein-coupled receptor 30 expression is required for estrogen stimulation of primordial follicle formation in the hamster ovary." <u>Endocrinology</u> **149**(9): 4452-61.
- Wang, C. B., et al. (2003). "Protective effect of polypeptide from Chlamys farreri on mitochondria in human dermal fibroblasts irradiated by ultraviolet B." <u>Acta</u> <u>Pharmacol Sin</u> **24**(7): 692-6.
- Wang, F., et al. (1999). "Sphingosine-1-phosphate inhibits motility of human breast cancer cells independently of cell surface receptors." <u>Cancer Res</u> **59**(24): 6185-91.
- Wang, J. D., et al. (1999). "Early induction of apoptosis in androgen-independent prostate cancer cell line by FTY720 requires caspase-3 activation." <u>Prostate</u> 40(1): 50-5.
- Wang, L., et al. (1998). "Insulin-like growth factor I modulates induction of apoptotic signaling in H9C2 cardiac muscle cells." <u>Endocrinology</u> **139**(3): 1354-60.
- Wang, R., et al. (1996). "Human dermal fibroblasts produce nitric oxide and express both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms." <u>J Invest</u> <u>Dermatol</u> **106**(3): 419-27.
- Wang, R., et al. (1997). "Nitric oxide synthase expression and nitric oxide production are reduced in hypertrophic scar tissue and fibroblasts." <u>J Invest Dermatol</u> **108**(4): 438-44.
- Wang, W., et al. (2005). "Type 4 sphingosine 1-phosphate G protein-coupled receptor (S1P4) transduces S1P effects on T cell proliferation and cytokine secretion without signaling migration." <u>FASEB J</u> **19**(12): 1731-3.
- Wang, W. L., et al. (2007). "Mitochondrial anchoring of PKCalpha by PICK1 confers resistance to etoposide-induced apoptosis." <u>Apoptosis</u> **12**(10): 1857-71.
- Wang, X. (2001). "The expanding role of mitochondria in apoptosis." <u>Genes Dev</u> **15**(22): 2922-33.
- Watanabe, T., et al. (1997). "Agonistic effect of tamoxifen is dependent on cell type, ERE-promoter context, and estrogen receptor subtype: functional difference between estrogen receptors alpha and beta." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> 236(1): 140-5.
- Wei, M. C., et al. (2001). "Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death." <u>Science</u> **292**(5517): 727-30.
- Weigert, A., et al. (2006). "Apoptotic cells promote macrophage survival by releasing the antiapoptotic mediator sphingosine-1-phosphate." <u>Blood</u> **108**(5): 1635-42.
- Weller, R., et al. (2002). "Pro- and anti-apoptotic effects of nitric oxide in irradiated keratinocytes: the role of superoxide." <u>Skin Pharmacol Appl Skin Physiol</u> 15(5): 348-52.
- Weller, R., et al. (2003). "Autologous nitric oxide protects mouse and human keratinocytes from ultraviolet B radiation-induced apoptosis." <u>Am J Physiol</u> <u>Cell Physiol</u> **284**(5): C1140-8.
- Wert, M. M. and H. C. Palfrey (2000). "Divergence in the anti-apoptotic signalling pathways used by nerve growth factor and basic fibroblast growth factor (bFGF) in PC12 cells: rescue by bFGF involves protein kinase C delta." <u>Biochem J</u> 352 Pt 1: 175-82.

- Wertheimer, E., et al. (2000). "Differential roles of insulin receptor and insulin-like growth factor-1 receptor in differentiation of murine skin keratinocytes." J Invest Dermatol **115**(1): 24-9.
- Wong, R. C., et al. (2007). "Anti-apoptotic effect of sphingosine-1-phosphate and platelet-derived growth factor in human embryonic stem cells." <u>Stem Cells Dev</u> **16**(6): 989-1001.
- Wraight, C. J., et al. (2000). "Reversal of epidermal hyperproliferation in psoriasis by insulin-like growth factor I receptor antisense oligonucleotides." <u>Nat Biotechnol</u> **18**(5): 521-6.
- Xia, P., et al. (1999). "Activation of sphingosine kinase by tumor necrosis factor-alpha inhibits apoptosis in human endothelial cells." <u>J Biol Chem</u> **274**(48): 34499-505.
- Xia, P., et al. (2002). "Sphingosine kinase interacts with TRAF2 and dissects tumor necrosis factor-alpha signaling." <u>J Biol Chem</u> **277**(10): 7996-8003.
- Yada-Hashimoto, N., et al. (2006). "Estrogen and raloxifene inhibit the monocytic chemoattractant protein-1-induced migration of human monocytic cells via nongenomic estrogen receptor alpha." <u>Menopause</u> **13**(6): 935-41.
- Yager, J. D. (2000). "Endogenous estrogens as carcinogens through metabolic activation." <u>J Natl Cancer Inst Monogr(</u>27): 67-73.
- Yamada, M., et al. (2004). "Overexpression of phospholipase D prevents actinomycin D-induced apoptosis through potentiation of phosphoinositide 3-kinase signalling pathways in Chinese-hamster ovary cells." <u>Biochem J</u> 378(Pt 2): 649-56.
- Yamamoto, T. (2009). "Scleroderma--pathophysiology." Eur J Dermatol 19(1): 14-24.
- Yamaoka, J., et al. (2004). "Nitric oxide inhibits ultraviolet B-induced murine keratinocyte apoptosis by regulating apoptotic signaling cascades." <u>Free</u> <u>Radic Res</u> **38**(9): 943-50.
- Yanagawa, Y., et al. (1998). "FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats. II. FTY720 prolongs skin allograft survival by decreasing T cell infiltration into grafts but not cytokine production in vivo." <u>J Immunol</u> 160(11): 5493-9.
- Yasui, H., et al. (2005). "FTY720 induces apoptosis in multiple myeloma cells and overcomes drug resistance." <u>Cancer Res</u> **65**(16): 7478-84.
- Yatomi, Y. (2008). "Plasma sphingosine 1-phosphate metabolism and analysis." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1780**(3): 606-11.
- Yatomi, Y., et al. (1997). "Sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum." J Biochem **121**(5): 969-73.
- Yetik-Anacak, G. and J. D. Catravas (2006). "Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease." <u>Vascul Pharmacol</u> **45**(5): 268-76.
- Youle, R. J. and A. Strasser (2008). "The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> **9**(1): 47-59.
- Yu, N., et al. (2004). "Characterization of lysophosphatidic acid and sphingosine-1phosphate-mediated signal transduction in rat cortical oligodendrocytes." <u>Glia</u> **45**(1): 17-27.
- Yuan, J., et al. (1993). "The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme." <u>Cell</u> **75**(4): 641-52.

- Yue, W., et al. (2003). "Genotoxic metabolites of estradiol in breast: potential mechanism of estradiol induced carcinogenesis." <u>J Steroid Biochem Mol Biol</u> 86(3-5): 477-86.
- Zhang, H., et al. (1991). "Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation." <u>J Cell Biol</u> **114**(1): 155-67.
- Zhang, J., et al. (2007). "Signals from type 1 sphingosine 1-phosphate receptors enhance adult mouse cardiac myocyte survival during hypoxia." <u>Am J Physiol</u> <u>Heart Circ Physiol</u> **293**(5): H3150-8.
- Zhang, Y. E. (2009). "Non-Smad pathways in TGF-beta signaling." <u>Cell Res</u> **19**(1): 128-39.
- Zhang, Z., et al. (2002). "Membrane association of estrogen receptor alpha mediates estrogen effect on MAPK activation." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **294**(5): 926-33.
- Zheng, D. M., et al. (2006). "Sphingosine 1-phosphate protects rat liver sinusoidal endothelial cells from ethanol-induced apoptosis: Role of intracellular calcium and nitric oxide." <u>Hepatology</u> **44**(5): 1278-87.
- Zhong, M., et al. (2002). "Downregulating PKC delta provides a PI3K/Aktindependent survival signal that overcomes apoptotic signals generated by c-Src overexpression." <u>Oncogene</u> **21**(7): 1071-8.
- Zivadinovic, D. and C. S. Watson (2005). "Membrane estrogen receptor-alpha levels predict estrogen-induced ERK1/2 activation in MCF-7 cells." <u>Breast Cancer</u> <u>Res</u> **7**(1): R130-44.