

Bedeutung der Sphingosin-1-Phosphat- Rezeptoren in der Regulation der Apoptose und Proliferation humaner Keratinozyten

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
Melanie Schüppel
aus Bremen

Februar 2008

1. Gutachter: Herr Professor Dr. Burkhard Kleuser
2. Gutachter: Herr Professor Dr. Heinz H. Pertz

Datum der Disputation: 17.04.2008

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.

Herrn Professor Dr. Burkhard Kleuser danke ich sehr herzlich für die Vergabe des interessanten Dissertationsthemas, die ausgezeichnete Betreuung und die stete, konstruktive Gesprächsbereitschaft. Seine hilfreiche Unterstützung und wissenschaftliche Kompetenz haben das Entstehen dieser Arbeit erst ermöglicht.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. Pertz, Institut für Pharmazeutische Biologie, für die Erstellung des Zweitgutachtens. Außerdem danke ich Herrn Professor Dr. Pertz und seinem Mitarbeiter Herrn Tilo Görnemann für die tatkräftige Unterstützung bei der Gewinnung muriner Keratinozyten.

Ich danke Herrn Dr. Markus Tölle, Medizinische Klinik für Nephrologie der Charité, für die Bereitstellung des Gewebematerials zur Gewinnung muriner Zellen.

Ferner danke ich Herrn Professor Dr. Melzig, Institut für Pharmazeutische Biologie, für die Möglichkeit zur Benutzung des Fluoreszenzmikroskops.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Frau Hannelore Gonska für die Einarbeitung und Hilfe bei der Zellkultur sowie für den Zuspruch in allen Lebenslagen bedanken.

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.

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. Corinna Schraut, Herrn Karsten Zimmermann, Frau Dr. Daniela Malek, Frau Dr. Pilar Rivera Gil, Herrn Dr. Henrik von Wenckstern, Frau Dr. Anja Richartz, Frau Dr. Sylvia Schreiber, Herrn Dr. Christian Braem und Frau Peggy Schlupp bedanken.

Außerordentlich möchte ich mich bei Herrn Karsten Zimmermann für die guten wissenschaftlichen und privaten Gespräche sowie das Beantworten meiner zahllosen Fragen bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt jedoch Frau Dr. Corinna Schraut, ohne die ich diese Arbeit nie begonnen hätte und die mich vom Anfang bis zum Ende wissenschaftlich und privat unterstützt hat.

Frau Dr. Anja Richartz, Herrn Karsten Zimmermann, Frau Judith Seeber, Herrn Dr. Christian Braem und Herrn Henrik Potteck danke ich ganz herzlich für die tollen Aktivitäten auch außerhalb des Labors.

Ich danke außerdem Herrn Björn Krack, Herrn Henrik Potteck, Frau Dr. Corinna Schraut, Herrn Matthias Säuberlich, Herrn Karsten Zimmermann und Herrn Florian Sollich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Stefanie Specks für die wunderbare Unterstützung und den Beistand in allen Höhen und Tiefen dieser Arbeit bedanken.

Weiterhin möchte ich mich besonders bei meiner Familie und Herrn Florian Sollich für die wertvolle Unterstützung und den liebevollen Rückhalt während der gesamten Zeit bedanken.

Originalarbeiten

M. Schüppel, U. Kürschner, U. Kleuser, M. Schäfer-Korting and B. Kleuser: Sphingosine 1-phosphate restrains insulin-mediated keratinocyte proliferation via inhibition of Akt through the S1P₂ receptor subtype. Journal of Investigative Dermatology, im Druck, 2008

M. Schüppel, M. Schäfer-Korting and B. Kleuser: Sphingosine 1-phosphate protects primary human keratinocytes from apoptosis via regulation of NO production, in Vorbereitung

M. Schüppel, M. Schäfer-Korting and B. Kleuser: Sphingosine 1-phosphate processes antiapoptotic action in human keratinocytes, but inhibits insulin-mediated cytoprotection, in Vorbereitung

Poster

M. Schüppel, K. Zimmermann and B. Kleuser: Lysophosphatidic acid protects endothelial cells from apoptosis by activation of eNOS. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (Suppl 1) 372, 2006

M. Schüppel and B. Kleuser: Antiapoptotic action of Sphingosine 1-phosphate in human keratinocytes via the S1P₃ receptor subtype and eNOS signalling. Symposium „Drugs, Targets and Carriers“ Berlin, 2007

M. Schüppel and B. Kleuser: Sphingosine 1-phosphate protects primary human keratinocytes via S1P₃ receptor subtype and nitric oxide formation from apoptosis. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (Suppl 1) 375, 2007

1	Einleitung	1
1.1	Die Apoptose	2
1.1.1	Apoptotischer Signalweg	2
1.1.2	Bedeutung der Apoptose in der Haut	5
1.2	Die Proliferation	7
1.2.1	Der Zellzyklus	7
1.2.2	Bedeutung der Proliferation in der Haut	8
1.3	Die Akt Kinase	9
1.3.1	Aktivierung der Akt Kinase	9
1.3.2	Rolle der Akt Kinase in der Regulation der Apoptose	11
1.3.3	Rolle der Akt Kinase in der Regulation der Proliferation	11
1.4	Lysophospholipide	12
1.4.1	Biosynthese und Metabolismus des S1P	12
1.4.2	Biosynthese und Metabolismus des LPA	14
1.4.3	Lysophospholipide als Rezeptoragonisten	14
1.4.4	Lysophospholipidrezeptoragonisten und -antagonisten	17
1.5	Stickstoffmonoxid (NO)	19
1.5.1	Die Biosynthese des NO	19
1.5.2	NO-Synthasen	20
1.5.3	Physiologische Bedeutung des NO	22
1.5.4	Bedeutung des NO für die Haut	23
1.5.5	Regulation der Apoptose durch NO	24
1.6	Insulin	25
1.6.1	Der Insulinrezeptor	25
1.6.2	Signaltransduktion des Insulinrezeptors	26
1.6.3	Einfluss von Insulin auf die Haut	26
1.7	Proteinkinase C	27
1.7.1	Isoenzyme der PKC	27
1.7.2	PKC in der Haut	27
1.8	Fragestellung und Zielsetzung	28
2	Material und Methoden	29
2.1	Materialien	30
2.1.1	Geräte	30
2.1.2	Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	31
2.2	Methoden	35
2.2.1	Kultivierung von Zellen	35
2.2.2	Lösungen der Testsubstanzen	39
2.2.3	Gezieltes Ausschalten von Genen	40
2.2.4	Antisense Untersuchungen	41
2.2.5	siRNA Untersuchungen	42

2.2.6	Untersuchung der mRNA-Transkription	42
2.2.7	Proteinanalytische Methoden	47
2.2.8	Untersuchungen zur Zellproliferation	52
2.2.9	Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate	53
2.2.10	Quantifizierung der NO-Produktion	56
2.2.11	Statistik	58
3	Ergebnisse	59
3.1	Interaktion Insulin- und S1P-vermittelter Signalwege	60
3.1.1	Aktivierung der Akt Kinase	60
3.1.2	Hemmung der Akt Kinase durch S1P	60
3.1.3	Hemmung der Proliferation humaner Keratinozyten	63
3.1.4	Einfluss der Hemmung der PKC auf die Akt Aktivität	64
3.1.5	Einfluss der PKC Aktivierung auf die Akt Aktivität	65
3.1.6	PKC Aktivierung durch S1P	66
3.1.7	Einfluss der PKC Aktivierung auf die Proliferation	67
3.1.8	Einfluss der PKC δ Hemmung auf die Akt Aktivität	68
3.1.9	PKC δ Aktivierung durch S1P	69
3.1.10	PKC δ vermittelt Hemmung der Proliferation	70
3.1.11	Expression der S1P Rezeptoren in humanen Keratinozyten	71
3.1.12	Beeinflussung der Regulation der Akt Aktivität durch PTX	72
3.1.13	Beteiligung der S1P Rezeptorsubtypen an der Regulation der Akt Kinase	73
3.1.14	Hemmung der Proliferation über S1P ₂	74
3.1.15	Beeinflussung der Akt Kinase durch JTE013 und FTY720-P	75
3.1.16	Wirkung des FTY720-P auf die Proliferation humaner Keratinozyten	76
3.1.17	Aktivierung der PKC δ über S1P ₂	77
3.1.18	Zytoprotektive Wirkung des Insulins auf Keratinozyten	78
3.1.19	Antiapoptotischer Effekt des S1P	79
3.1.20	Interferenz antiapoptotischer Signalwege des S1P mit Insulin und IGF-I	80
3.1.21	Beteiligung des S1P ₂ Rezeptorsubtyps	80
3.2	Charakterisierung des antiapoptotischen Effektes des S1P in Keratinozyten	82
3.2.1	Rolle der Akt Kinase in der Vermittlung des antiapoptotischen Effektes des S1P	82
3.2.2	Beteiligung der S1P Rezeptoren an der zytoprotektiven Wirkung des S1P	83
3.2.3	Einfluss der S1P Rezeptorsubtypen auf die antiapoptotische Wirkung des S1P	83
3.2.4	Einfluss von S1P ₁ auf die antiapoptotische Wirkung des S1P	84
3.2.5	Einfluss von S1P ₂ auf die antiapoptotische Wirkung des S1P	85
3.2.6	Antiapoptotische Eigenschaften von FTY720-P	86
3.2.7	NO-Abhängigkeit der antiapoptotischen Wirkung	87
3.2.8	NO-Abhängigkeit der Bcl-2 Induktion	88
3.2.9	Expression der NO-Synthasen in humanen Keratinozyten	89
3.2.10	Aktivierung der eNOS	89
3.2.11	Einfluss von S1P auf NO-Bildung	90
3.2.12	Hemmung der NO-Bildung	92
3.2.13	Einfluss von PTX auf die eNOS Aktivierung und NO-Bildung	92
3.2.14	Rolle des S1P ₃ Rezeptors in der eNOS Aktivierung	93
3.2.15	Einfluss der PI3K auf die eNOS Aktivierung und NO-Bildung	93

3.2.16	Induktion der eNOS mRNA	94
3.2.17	Hemmung der Induktion der iNOS	95
3.2.18	Einfluss von PTX auf die Hemmung der iNOS Induktion	97
3.3	Charakterisierung antiapoptotischer Signalwege des LPA in Endothelzellen	98
3.3.1	Antiapoptotische Eigenschaften von LPA in Endothelzellen	98
3.3.2	Akt Aktivierung vermittelt antiapoptotische Wirkung	98
3.3.3	Beteiligung der LPA Rezeptoren	100
4	Diskussion	101
4.1	Interaktion von S1P mit Insulin-vermittelten Signalwegen	102
4.1.1	Regulation der Akt Kinase	102
4.1.2	Regulation der Proliferation	104
4.1.3	Beteiligung der PKC	106
4.1.4	Beteiligung des S1P ₂ Rezeptors	108
4.1.5	Bedeutung für die Therapie der Psoriasis	110
4.1.6	Folgen der Interaktion von S1P mit Insulin-vermittelten Signalwegen für die Apoptose	111
4.1.7	Rolle der Akt Kinase in der antiapoptotischen Wirkung des S1P	113
4.1.8	Rolle des S1P ₂ Rezeptors in der Modulation der antiapoptotischen Wirkung des Insulins	114
4.2	Charakterisierung des antiapoptotischen Effektes des S1P	115
4.2.1	S1P ₃ vermittelt die antiapoptotische Wirkung	115
4.2.2	Rolle des S1P ₂ Rezeptors	116
4.2.3	Antiapoptotische Wirkung des FTY720-P	117
4.3	NO-Abhängigkeit des antiapoptotischen Effektes	118
4.3.1	Rolle des NO in der Apoptose	118
4.3.2	NO-Synthasen	120
4.3.3	Aktivierung der eNOS	121
4.3.4	Signalweg der eNOS Aktivierung	123
4.3.5	Regulation der eNOS mRNA	124
4.3.6	Regulation der iNOS	125
4.3.7	Bedeutung für die Therapie der Psoriasis	127
4.4	Antiapoptotische Eigenschaften des LPA in BAEC	127
4.5	Ausblick	130
5	Zusammenfassung	132
5.1	Zusammenfassung	133
5.2	Abstract	136
6	Literaturverzeichnis	139

ADP	Adenosindiphosphat
Apaf-1	apoptosis protease activating factor-1
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
ASO	Antisense Oligodesoxynukleotid
ATP	Adenosintriphosphat
BAEC	bovine aortic endothelial cells
Bak	Bcl-2 antagonist killer protein
Bax	Bcl-2 associated x protein
Bcl	B-cell lymphoma
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
Bid	Bcl-2 interacting domain death agonist
bp	base pair
BPE	boviner Hypophysenextrakt
BSA	bovines Serumalbumin
CARD	caspase recruiting domain
CDK	cyclin-dependent kinase
CDKI	CDK-inhibitor
cDNA	copy deoxyribonucleic acid
DAF-2DA	4,5-Diaminofluoresceindiacetat
DD	death domain
DED	death effector domain
DEPC	Diethylpyrocarbonat
cGMP	zyklischen Guanosinmonophosphat
DGPP	Diocetylglycerolpyrophosphat
Cip	CDK inhibiting protein
d	Tag
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
edg	endothelial differentiation gene
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor

eNOS	endotheliale NO-Synthase
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FAD	Flavinadenindinukleotid
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
FMN	Flavinadeninmononukleotid
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
hEGF	human epidermal growthfactor
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure
HRP	horseradish peroxidase
IGF	insulin-like growth factor
IGF-IR	IGF-I Rezeptor
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IR	Insulinrezeptor
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
IUPHAR	International Union of Pharmacology
JNK	c-Jun nuclear kinase
KBM	Keratinozyten-Basalmedium
KGM	Keratinozyten-Wachstumsmedium
Kip	kinase inhibiting protein
KO	Knockout
L-NAME	<i>N</i> _ω -Nitro- <i>L</i> -argininmethylesterhydrochlorid
LPA	Lysophosphatidsäure
LPS	Lipopolysaccharide

MAPK	mitogen-activated protein kinase
mdm2	murine double minute 2
MEME	Minimum Essential Medium Eagle
min	Minute
mRNA	messenger ribonucleic acid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotiddiphosphat
NF-κB	nukleärer Faktor κB
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
1,25(OH) ₂ D ₃	1α,25-Dihydroxyvitamin D ₃
ODN	Oligodesoxynukleotid
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	polymerase chain reaktion
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
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTEN	phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10
PTX	Pertussistoxin
PVDF	Polyvinyliden-difluorid
RNA	ribonucleic acid
RNAi	RNA Interferenz
s	Sekunde
S1P	Sphingosin-1-phosphat
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHC	SH2-containing protein
siRNA	small interfering RNA
SNAP	S-Nitroso <i>N</i> -acetylpenicillamin
SphK	Sphingosin-Kinase

SSC	sideward scatter
TBS	Tris-buffered solution
TBST	Tween in TBS
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylenethyldiamin
TGF β	transforming growth factor β
TNF	tumor necrosis factor
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
Tris	Trishydroxymethylenaminomethan
u	units
VEGF	vascular endothelial growth factor