

## **4 Diskussion**

---

### 4.1 Interaktion von S1P mit Insulin-vermittelten Signalwegen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die biologischen Konsequenzen der Hemmung der Akt Kinase durch S1P untersucht werden. Die Akt Kinase reguliert eine Vielzahl von zellulären Prozessen. So wurden die Konsequenzen dieser Interaktion von S1P mit Insulin-vermittelten Signalwegen hinsichtlich des Wachstums der Keratinozyten und der Regulation antiapoptotischer Signalwege untersucht.

#### 4.1.1 Regulation der Akt Kinase

Die Akt Kinase ist von entscheidender Bedeutung für die Regulation des zellulären Wachstums. Um die antiproliferative Wirkung des S1P in humanen Keratinozyten zu charakterisieren, wurde die Regulation der Akt Kinase durch S1P untersucht.

Zu diesem Zweck wurde in der vorliegenden Arbeit die Aktivierung der Akt Kinase durch Detektion der Phosphorylierung an bestimmt. Neben Ser<sup>473</sup> besitzt die Kinase jedoch noch eine weitere Phosphorylierungsstelle im Bereich der Kinase Domäne, Thr<sup>308</sup>. Die Phosphorylierung an Thr<sup>308</sup> aktiviert nur teilweise die Akt Kinase, wohingegen eine volle Aktivität erst nach Phosphorylierung beider Aminosäuren auftritt. Jedoch wird erst nach der Phosphorylierung von Thr<sup>308</sup> eine Phosphorylierung an Ser<sup>473</sup> über einen noch unklaren Weg ausgelöst. Dabei gilt, dass nach einer Phosphorylierung an Ser<sup>473</sup> eine volle Aktivierung der Akt Kinase vorliegt (Song et al. 2005). Dies zeigt die große Aussagekraft der Detektion der Akt Phosphorylierung an Ser<sup>473</sup> als Marker der Akt Aktivierung. Jedoch wurde kürzlich gezeigt, dass auch eine Regulation der Aktivität der Kinase über eine ausschließliche Phosphorylierung an Thr<sup>308</sup> möglich ist (Kuo et al. 2007).

Insulin und IGF-I vermitteln nahezu alle zellulären Effekte über Akt-abhängige Signalwege (Alessi et al. 1998). Daher war es nicht verwunderlich, dass Insulin und IGF-I eine starke Aktivierung der Akt Kinase hervorriefen. Dagegen war die Wirkung des S1P auf die Akt Kinase sehr überraschend, da bisher vor allem ein positiver Einfluss des S1P auf die Aktivität der Akt Kinase in verschiedenen Zellen beschrieben wurde (Igarashi et al. 2001a; Baudhuin et al. 2002; Hsieh et al. 2007). Jedoch wäre es möglich, dass dieser Effekt vom unterschiedlichen Expressionsstatus der S1P Rezeptoren in den jeweiligen Zellen abhängt und damit Zelltyp-spezifisch ist. Für die Wirkung des S1P in primären humanen Keratinozyten konnte eine deutliche Hemmung der Aktivität der Akt Kinase durch

Dephosphorylierung gezeigt werden. Diese Beobachtung steht in Einklang zu den Ergebnissen von Bernardi et al., die für  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  eine negative Beeinflussung der Akt Kinase in Zellen des Plattenepithelkarzinoms zeigen konnten (Bernardi et al. 2002). Dieses Ergebnis ist von besonders großer Aussagekraft, da die Wirkung von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in Keratinozyten durch intrazelluläre Bildung von S1P vermittelt wird (Manggau et al. 2001). Eine direkte Wirkung des S1P auf die Akt Kinase konnte von Kim et al. gezeigt werden. In Einklang zu den hier gezeigten Ergebnissen wurde eine Hemmung der Kinase durch S1P beobachtet (Kim et al. 2004).

Ein möglicher Ansatz für den Signalweg, über den S1P eine Dephosphorylierung der Akt Kinase vermittelt, wäre eine Regulation von Lipidphosphatasen durch S1P. So ist besonders das Tumorsuppressorgen PTEN ein etablierter negativer Regulator der Signalwege des Insulins (Lazar et al. 2006; Vinciguerra et al. 2006). Das Produkt der PI3K, das  $\text{PIP}_3$ , ist das Hauptsubstrat der PTEN. Die durch PTEN hervorgerufene Dephosphorylierung des  $\text{PIP}_3$  führt zu einer Hemmung der PI3K/Akt-vermittelten Signalwege. Die Bedeutung dieser Phosphatase für die Regulation der Aktivität der Akt Kinase wird in PTEN-defizienten Fibroblasten deutlich, die neben erhöhten  $\text{PIP}_3$  Spiegeln eine konstitutiv aktive Akt Kinase aufweisen (Stambolic et al. 1998). Darüber hinaus korreliert die Abwesenheit von PTEN mit der übermäßigen Aktivierung der Akt Kinase in Tumoren (Wu et al. 2003; Sansal et al. 2004). Da PTEN durch S1P reguliert werden kann, wäre eine Hemmung der Akt Kinase unter Vermittlung von PTEN denkbar. Interessanterweise vermittelt gerade der  $\text{S1P}_2$  Rezeptor die Aktivierung der PTEN durch S1P (Sanchez et al. 2005). Darüber hinaus wurde eine Hemmung des PI3K/Akt Signalweges über eine Aktivierung der PTEN in Endothelzellen gezeigt. Die Aktivierung der Phosphatase wurde auch hier durch den  $\text{S1P}_2$  Rezeptor hervorgerufen (Sanchez et al. 2007). Diese Theorie wäre daher ein interessanter Ansatz für weiterführende Studien.

Über die Hemmung der basalen Aktivität der Akt Kinase hinaus konnte eine eindeutige Hemmung der Wirkung der Akt Aktivatoren Insulin und IGF-I durch S1P beobachtet werden. So führte die Vorinkubation der Keratinozyten mit S1P zu einer massiven Dephosphorylierung der aktivierten Kinase. Dies war besonders interessant, da bisher nur wenige Beispiele für eine Interaktion von S1P mit Insulin-vermittelten Signalwegen beschrieben wurden. So konnte bisher eine hemmende Wirkung des S1P auf die Insulin-induzierte Bildung von Leptin in Adipozyten oder auf die durch IGF-I hervorgerufene Migration von Myoblasten gezeigt werden (Becciolini

et al. 2006; Jun et al. 2006). Auffällig ist, dass in beiden Fällen eine negative Beeinflussung der Signalwege des IGF-I oder Insulins durch S1P gezeigt wurde. Eine Hemmung der Aktivität der Akt Kinase ist bei der Behandlung von Tumoren ein möglicher Therapieansatz, denn eine Überexpression der Akt Kinase in Keratinozyten stellt das initiale Ereignis der Entstehung von Tumoren der Haut dar (Segrelles et al. 2002). Daneben führt eine Überaktivierung oder Überexpression des Protoonkogens Akt zu einem Ungleichgewicht zwischen Zellvermehrung und Zelluntergang in zahlreichen, verschiedensten Krebsarten (Nicholson et al. 2002). Eine konstitutiv aktive Akt Kinase scheint eine Voraussetzung für das Auslösen der onkogenen Transformation von Zellen zu sein. Da die Akt Kinase neben der Zellproliferation noch zahlreiche weitere zelluläre Prozesse, die mit der Tumorbildung assoziiert sind einschließlich Zytoprotektion, Migration, Epithelialer-Mesenchymaler Transformation und Angiogenese reguliert, stellt die Akt Kinase ein denkbare Target in der Behandlung des Hautkrebses dar (Cheng et al. 2005; Crowell et al. 2007).

### 4.1.2 Regulation der Proliferation

Das zelluläre Wachstum unterliegt der strengen Kontrolle durch den Zellzyklus. So fördert die Akt Kinase die Progression des Zellzyklus durch transkriptionale und translationale Regulation von CDKI wie p21<sup>Waf1/cip1</sup> oder p27<sup>Kip1</sup> oder von Cyclinen (Lawlor et al. 2001). Auf diese Weise vermittelt die Akt Kinase eine Förderung des zellulären Wachstums.

Der PI3K-Akt Signalweg ist von großer Bedeutung für die Vermittlung der Insulineffekte, denn der Einsatz von Hemmstoffen der PI3K oder die Überexpression dominant-negativer PI3K Mutanten führt zur Blockade nahezu aller zellulärer Antworten auf eine Stimulation mit Insulin (Lawlor et al. 2001). Wie diese Arbeit zeigt, wird die starke mitogene Wirkung des Insulins in humanen Keratinozyten über eine Aktivierung der Akt Kinase vermittelt, denn die Dephosphorylierung der Akt Kinase resultiert in einer Hemmung der Zellproliferation. Dies konnte in *in vivo* Experimenten bestätigt werden, da eine Hemmung Insulin-vermittelter Signaltransduktion in IR-defizienten Mäusen zu einer verminderten Proliferation der Haut führt (Wertheimer et al. 2001).

Neben der physiologischen Bedeutung des Insulins für die Entwicklung der Haut kann eine pathologisch verstärkte Aktivierung der Akt Kinase durch Überaktivierung

der Insulin/IGF-vermittelten Signalwege zur Hyperproliferation der Zellen führen. So wurde gezeigt, dass Keratinozyten aus psoriatischer Haut eine wesentlich stärkere mitogene Reaktion auf die Stimulation mit IGF-I zeigen als Zellen der gesunden Haut (Ristow 1993). Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass der IGF-IR in psoriatischen Läsionen deutlich überexprimiert vorliegt (Hodak et al. 1996). So lässt sich das Krankheitsbild der Psoriasis, das durch eine Hyperproliferation epidermaler Keratinozyten charakterisiert ist, zumindest zum Teil durch eine Überaktivität der Insulin/IGF-vermittelten Signalwege erklären. Daraus ergibt sich ein interessanter therapeutischer Ansatz diese Signalwege zu hemmen, welcher bereits von Wraight et al. bestätigt wurde. So führte der Einsatz von IGF-IR Antisense Oligonukleotiden *in vivo* durch wiederholte Injektion der Oligonukleotide in psoriatischen Läsionen zu einer eindeutigen Verringerung der epidermalen Hyperplasie (Wraight et al. 2000).

Diese durch Insulin und IGF-I hervorgerufenen pathologischen Veränderungen lassen sich auch auf der Ebene der Akt Aktivierung bestätigen. So sind diese hyperproliferativen Erkrankungen der Haut mit übermäßig verstärkter Aktivität der Akt Kinase assoziiert. Es konnte in psoriatischer Haut eine starke Induktion der Akt Phosphorylierung gezeigt werden (Rosenberger et al. 2007). Auch die in der Pathogenese der Psoriasis auftretende Induktion der Chemokinbildung durch IL-18 wird über eine Aktivierung der Akt Kinase vermittelt wird (Kanda et al. 2007).

Daher wäre es denkbar, die Hemmung der Aktivität der Akt Kinase als therapeutischen Ansatz zur Behandlung hyperproliferativer Erkrankungen zu nutzen. Dies bestätigt das Potential des S1P in der Behandlung der Psoriasis, da im Rahmen dieser Arbeit nicht nur ein antiproliferativer Effekt des S1P auf humane Keratinozyten gezeigt wurde, sondern darüber hinaus eine Hemmung des mitogenen Effektes des Insulins.

Der hemmende Einfluss des S1P auf das Insulin-vermittelte Wachstum der Zellen wurde in einer massiven Reduktion der [<sup>3</sup>H]Thymidin Inkorporation um bis zu 70 % sichtbar, wenn Keratinozyten vor der Stimulation mit Insulin mit 10 µM S1P für 10 min vorbehandelt wurden. Damit sind diese Versuchsbedingungen vergleichbar mit der Analyse der Akt Aktivität, die zu diesem Zeitpunkt den Maximaleffekt des S1P in der Hemmung der Insulin-induzierten Akt Phosphorylierung aufwies. Diese Beobachtung zeigt deutlich die enge Verknüpfung der Aktivität der Akt Kinase mit der Proliferation der Zellen.

Zahlreiche Studien zeigen S1P als Promotor des zellulären Wachstums in verschiedenen Zellenarten (Watterson et al. 2003; Radeff-Huang et al. 2004). Dies scheint angesichts der hier gezeigten antiproliferativen Wirkung des S1P überraschend, ist jedoch damit zu erklären, dass S1P in diesen Zellen auch eine Aktivierung der Akt Kinase auszulösen vermag. So wurde beispielsweise in Zellen der glatten Muskulatur sowohl ein starker proliferativer Effekt des S1P als auch eine Aktivierung der Akt Kinase nach Stimulation mit S1P gezeigt (Hsieh et al. 2007). In hepatischen Myofibroblasten, Hepatozyten und murinen Myoblasten wurde ein antiproliferativer Effekt von S1P beschrieben (Davaille et al. 2000; Ikeda et al. 2003; Donati et al. 2005). In Übereinstimmung zu dieser Arbeit wurde ein wachstumshemmender Effekt des S1P auch in humanen Keratinozyten gezeigt. Die Proliferation der Keratinozyten ließ sich ebenso durch LY294002 hemmen. Da die gleichzeitige Stimulation mit S1P und LY294002 keinen stärkeren synergistischen Effekt für die Wachstumshemmung hatte, wurde ein gemeinsamer Signalweg für die Vermittlung der Proliferationshemmung angenommen (Kim et al. 2004). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Erstmals wurde darüber hinaus die Interaktion mit mitogenen Signalwegen des Insulins gezeigt, die durch eine Hemmung der Aktivität der Akt Kinase vermittelt wird.

### 4.1.3 Beteiligung der PKC

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die zugrunde liegenden Signalwege des S1P, die zur Akt Dephosphorylierung und nachfolgenden Hemmung der Proliferation führen, untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass S1P über eine Aktivierung der PKC $\delta$  die Hemmung der Akt Kinase und die dadurch bedingte wachstumshemmende Wirkung vermittelt. Dies konnte sowohl unter basalen Bedingungen, als auch bei Stimulation mit Insulin gezeigt werden. Die Aussagekraft der Experimente wurde durch die gegensätzlichen Ansätze, die Hemmung der PKC und deren Aktivierung durch TPA, verstärkt. So zeigt der PKC Aktivator ein analoges Verhalten zum S1P, wobei die Hemmung der Insulin-induzierten Akt Phosphorylierung durch TPA etwas stärker ausfiel als bei der Vorinkubation mit S1P. Daneben führte die Aktivierung der PKC auch zu einer vergleichbaren Beeinflussung des mitogenen Insulineffektes, denn sowohl S1P als auch TPA hemmten die Insulin-induzierte Proliferation.

Die Aktivierung der PKC durch S1P setzte sehr rasch ein. So konnte sowohl die Western Blot-Analyse der PKC (pan) als auch der PKC $\delta$  Phosphorylierung

übereinstimmend zeigen, dass bereits nach 5 min eine Aktivierung vorlag. Damit trat die PKC $\delta$  Aktivierung rascher ein als die durch S1P hervorgerufene Dephosphorylierung der durch Insulin aktivierten Akt Kinase. Daher ist es möglich, dass S1P seine hemmenden Einflüsse auf die Aktivität der Akt Kinase und die Proliferation über eine Aktivierung der PKC $\delta$  vermittelt. In Analogie zu den hier gezeigten Ergebnissen konnte in murinen Keratinozyten eine Dephosphorylierung der Akt Kinase im basalen Zustand sowie nach Aktivierung durch IGF-I durch TPA hervorgerufen werden. Auch hier wurde die PKC $\delta$  als negativer Regulator der Akt Kinase identifiziert. Li et al. zeigten jedoch außerdem, dass die negative Beeinflussung der Akt Kinase neben der PKC $\delta$  noch durch den PKC $\epsilon$  Subtyp vermittelt wurde. Weiterhin zeigte diese Studie, dass PKC $\alpha$  die Phosphorylierung der Akt verstärkte (Li et al. 2006). In Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit wurde auch in Endothelzellen eine durch die PKC $\delta$  vermittelte Dephosphorylierung der Akt Kinase beschrieben (Thors et al. 2003). Die Effekte einer PKC Aktivierung auf Keratinozyten werden jedoch konträr diskutiert. Wie bereits angedeutet, spielen dabei subtypspezifische Effekte eine große Rolle. So führte die Überexpression der PKC $\alpha$  oder der PKC $\delta$  zu einer verminderten Proliferation von Zellen der immortalisierten humanen Keratinozyten-Zelllinie HaCaT, wohingegen eine verstärkte Expression der PKC $\beta$  oder der PKC $\epsilon$  erhöhtes Zellwachstum hervorrief (Papp et al. 2004). Dies ist damit in Analogie zu den Proliferationsmessungen in Gegenwart von PKC $\delta$  siRNA, die ebenso den wachstumshemmenden Effekt der PKC $\delta$  zeigen. In mit PKC $\delta$  siRNA behandelten Keratinozyten vermochte S1P weder die basale Wachstumsrate zu reduzieren noch das durch Insulin induzierte Wachstum. Doch führte die Abwesenheit der PKC $\delta$  nicht zu einer Erhöhung der Proliferationsrate, was jedoch durch den kurzen Beobachtungszeitraum erklärbar ist. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von T. Tennenbaum eine positive Rolle der PKC $\delta$  in der Proliferation von Keratinozyten gezeigt: So führte die Überexpression der PKC $\delta$  zu einem verstärkten Zellwachstum (Gartsbein et al. 2006). Daneben konnte außerdem gezeigt werden, dass der mitogene Effekt des Insulins über eine Aktivierung der PKC $\delta$  durch Insulin vermittelt wird (Shen et al. 2001). Dies steht damit im klaren Gegensatz zu dem hier gezeigten negativen Einfluss der PKC $\delta$  auf die Proliferation humaner Keratinozyten. Der mitogene Effekt des Insulins kann in dem hier zugrunde liegenden Zellsystem jedoch nicht durch eine Aktivierung der PKC $\delta$  vermittelt werden, da Insulin keineswegs die

Phosphorylierung der PKC $\delta$  zu induzieren vermochte. Abschließend ist allerdings zu sagen, dass die Mehrzahl aller Studien eine negative Beeinflussung der zellulären Proliferation durch PKC $\delta$  zeigen (Jackson et al. 2004).

Eine Aktivierung der PKC $\delta$  durch S1P wurde in dieser Arbeit erstmals in Keratinozyten gezeigt. Für 1,25(OH) $_2$ D $_3$  konnte bereits eine PKC Aktivierung in Keratinozyten gezeigt werden, die jedoch nicht auf die Ebene der PKC Subtypen differenziert betrachtet wurde (Hanafin et al. 1995; Manggau et al. 2001). Die Aktivierung der PKC ist von entscheidender Bedeutung für die Induktion der Differenzierung der Keratinozyten durch 1,25(OH) $_2$ D $_3$  (Bollinger-Bollag et al. 2001). Damit ist die hier gezeigte Aktivierung der PKC $\delta$  durch S1P in Einklang zu der Fähigkeit des Sphingolipids, die Differenzierung der Keratinozyten auszulösen (Sun et al. 2008).

Eine Aktivierung der PKC $\delta$  wird oft mit der Vermittlung apoptotischer Signalwege assoziiert. So kann die Überexpression der PKC $\delta$  auch zu einer Induktion der Apoptose in Keratinozyten führen (Li et al. 1999). Doch ist eindeutig, dass der antiproliferative Effekt des S1P zwar auf eine Aktivierung der PKC $\delta$  zurückzuführen ist, dieser aber nicht durch eine Induktion der Apoptose hervorgerufen wird, denn S1P zeigt ausgesprochene zytoprotektive Eigenschaften in humanen Keratinozyten. Wie die Experimente mit den Hemmstoffen der PKC, Ro-31-8220 und Rottlerin, zeigen, existiert eine basale Kontrolle der Aktivität der Akt Kinase durch die PKC, da in unstimulierten Keratinozyten die Hemmung der PKC zu einer massiven Verstärkung der Phosphorylierung der Akt Kinase führte. Eine Bestätigung dieser Theorie kann in der Messung der Akt Phosphorylierung in Gegenwart von PKC $\delta$  siRNA gesehen werden, da in Abwesenheit der PKC $\delta$  Insulin eine stärkere Phosphorylierung zu induzieren vermochte als in Anwesenheit dieses PKC Subtyps.

### 4.1.4 Beteiligung des S1P $_2$ Rezeptors

Die hier gezeigte Hemmung der Insulin-induzierten Akt Phosphorylierung durch S1P erwies sich als nicht vollständig PTX-sensitiv. In Einklang dazu war auch der antiproliferative Effekt des S1P in Keratinozyten nur teilweise durch PTX hemmbar (Vogler et al. 2003). Dies zeigt eine Beteiligung der S1P Rezeptoren an der Hemmung der Akt Kinase, obgleich intrazelluläre Effekte aufgrund der nur teilweisen Hemmung des S1P-Effektes durch PTX nicht ausgeschlossen werden können. Jedoch vermittelt S1P nahezu alle Effekte über die Aktivierung seiner Rezeptoren.

So wird auch die Regulation der Proliferation durch die Aktivierung der GPCR vermittelt (Radeff-Huang et al. 2004). Die PTX-Experimente deuten darauf hin, dass S1P Rezeptoren an diesem Signalweg beteiligt sind, die nicht ausschließlich über G<sub>i</sub>-Proteine agieren. Die Experimente unter Anwendung der Antisense Strategie zur Hemmung der Rezeptorexpression zeigten, dass eindeutig der S1P<sub>2</sub> Rezeptor der einzige für die Dephosphorylierung der aktivierten Akt Kinase verantwortliche Rezeptorsubtyp ist. Da in Abwesenheit des S1P<sub>2</sub> Rezeptors S1P zu keinerlei Beeinflussung der Insulin-induzierten Akt Phosphorylierung führte, können intrazelluläre S1P-Effekte ausgeschlossen werden. Der Expressionsstatus der jeweiligen S1P Rezeptoren ist von großer Bedeutung für die zelluläre Antwort auf eine Stimulation mit S1P. Damit ist zu erklären, dass S1P abhängig von der Zellart proliferative wie auch antiproliferative Wirkungen hervorrufen kann. In glatten Muskelzellen kann die Aktivierung des S1P<sub>1</sub> Rezeptors durch S1P zu einer Induktion der Proliferation führen (Kluk et al. 2001). Dagegen wurde für die Proliferation humaner Endothelzellen eine Beteiligung von sowohl S1P<sub>1</sub> als auch S1P<sub>3</sub> gezeigt (Kimura et al. 2000).

Primäre humane Keratinozyten exprimieren alle fünf S1P Rezeptoren. Diese Arbeit zeigt allerdings eindeutig die Rolle des S1P<sub>2</sub> Rezeptorsubtyps in der Hemmung der Insulin-induzierten Proliferation. Dies konnte auf allen Ebenen des Signalweges bestätigt werden. So ist der S1P<sub>2</sub> Rezeptor an der PKC $\delta$  Aktivierung, der Dephosphorylierung der aktivierten Akt Kinase und schließlich an der Proliferationshemmung beteiligt. Damit wurde dem S1P<sub>2</sub> Rezeptor erstmals eine zelluläre Funktion in humanen Keratinozyten zugewiesen. In Einklang zu den hier vorgestellten Ergebnissen vermittelt S1P in Hepatozyten und Myoblasten eine Hemmung der Proliferation über diesen Rezeptorsubtyp (Ikeda et al. 2003; Donati et al. 2005). Doch kann der S1P<sub>2</sub> Rezeptor im Gegensatz dazu in hepatischen Myofibroblasten oder Mesangiumzellen eine mitogene Wirkung vermitteln (Katsuma et al. 2002; Serriere-Lanneau et al. 2007). Diese divergenten Effekte des S1P können zumindest teilweise durch das individuelle zelluläre Kopplungsmuster der S1P Rezeptorsubtypen erklärt werden.

Die Rolle des S1P<sub>2</sub> Rezeptors in der Vermittlung der Dephosphorylierung der durch Insulin aktivierten Akt Kinase wurde neben der Hemmung der Expression des Rezeptors durch Antisense ODN durch den Einsatz des S1P<sub>2</sub> Rezeptorantagonisten JTE013 und des Rezeptoragonisten FTY720-P gezeigt. FTY720-P vermag an allen

S1P Rezeptoren außer dem S1P<sub>2</sub> Rezeptor agonistisch zu wirken. Daher war es nicht überraschend, dass FTY720-P das Wachstum der Keratinozyten nicht beeinflusste und die mitogene Wirkung des S1P nicht hemmte.

In Analogie zum Einfluss des FTY720-P auf das Wachstum der Keratinozyten wird ebenso die Proliferation der B- und T-Zellen nicht beeinflusst, was die innovative Wirkungsweise des FTY720 gegenüber konventionellen Immunsuppressiva verdeutlicht (Brinkmann et al. 2004). Darüber hinaus wurde eine weitere Beeinflussung der zellulären Proliferation durch FTY720 gezeigt, denn FTY720 wirkt antiproliferativ in Zellen des Leberkarzinoms, nicht aber in gesunden Hepatozyten (Ho et al. 2005). Es ist von großer Bedeutung, die Wirkung des Immunomodulators FTY720 in Geweben zu untersuchen, die unabhängig von seinem Wirkort, den Lymphozyten, sind. Da sich FTY720 derzeit noch in klinischen Prüfungen befindet, sind Wirkungen auf andere Zellen für das Abschätzen möglicher Nebenwirkungen von Interesse.

Weniger eindeutig als die Beteiligung des S1P<sub>2</sub> Rezeptors an der Dephosphorylierung der Akt war allerdings dessen Beteiligung an der Aktivierung der PKC $\delta$ . Sowohl in Gegenwart von S1P<sub>2</sub> Rezeptor Antisense ODN als auch im Falle der Nichtstimulation des S1P<sub>2</sub> Rezeptors durch FTY720-P oder durch die Hemmung des Rezeptors mit JTE013 war eine leichte Aktivierung der PKC $\delta$  detektierbar. Dies deutet darauf hin, dass an diesem Punkt der Signalkaskade neben dem S1P<sub>2</sub> Rezeptor möglicherweise noch ein weiterer Rezeptorsubtyp beteiligt ist.

### 4.1.5 Bedeutung für die Therapie der Psoriasis

Abschließend ist zu sagen, dass diese Ergebnisse zur Interaktion von Insulin-vermittelten Signalwegen durch S1P in der Regulation der Akt Kinase einen wichtigen Ansatzpunkt in der Behandlung hyperproliferativer Erkrankungen aufzeigen. Die Beteiligung der S1P<sub>2</sub> Rezeptors an der Dephosphorylierung der Akt Kinase verdeutlicht einen maßgeblichen Unterschied in der Wirkung des S1P und des Rezeptoragonisten FTY720-P. Daraus lässt sich eine Überlegenheit des S1P gegenüber FTY720-P in der Behandlung hyperproliferativer Erkrankungen ableiten. Hinzu kommt, dass die PKC ein wichtiger Regulator der Proliferation der Keratinozyten ist. Daher ist es nicht verwunderlich, dass die Pathogenese der Psoriasis mit einer stark geminderten Aktivität der PKC assoziiert ist (Horn et al.

1987; Inohara et al. 1988). So wird deutlich, dass S1P über eine Aktivierung der PKC $\delta$  zu einer Normalisierung der deregulierten Proliferation führen kann.

### **4.1.6 Folgen der Interaktion von S1P mit Insulin-vermittelten Signalwegen für die Apoptose**

Die Regulation der Apoptose spielt für die epidermale Entwicklung eine tragende Rolle, wobei die Balance zwischen Apoptose und Proliferation für die Aufrechterhaltung der Dicke der Epidermis und der Bildung der Hornschicht verantwortlich ist. Doch kann eine Deregulation der Apoptose sowie der Proliferation die Pathogenese der Psoriasis oder die Tumorbildung fördern. Epidermale Hyperplasie oder Hyperkeratose sind durch verminderte Apoptose der Keratinozyten gekennzeichnet. So zeigen Keratinozyten psoriatischer Läsionen eine verminderte spontane Apoptoserate und sind resistent gegen eine Induktion der Apoptose (Raj et al. 2006).

Wie bereits eingangs erwähnt ist die psoriatische Haut durch eine Überaktivität der Insulin/IGF-vermittelten Signalwege gekennzeichnet, was durch eine verstärkte Phosphorylierung der Akt Kinase in den psoriatischen Läsionen zur Hyperproliferation der Keratinozyten führt. Neben dem starken mitogenen Effekt des Insulins kommt aber ebenso der antiapoptotische Effekt des Insulins in der psoriatischen Haut zum Tragen.

Die antiapoptotische Wirkung des Insulins auf Keratinozyten ist schon lange bekannt. So schützt Insulin humane Keratinozyten vor der durch UVB Strahlung induzierten Apoptose (Kuhn et al. 1999). Daneben vermag Insulin in verschiedensten Zellarten, wie in Kardiomyozyten, Makrophagen oder Endothelzellen, antiapoptotisch zu wirken (Hermann et al. 2000; Leffler et al. 2007; Morisco et al. 2007). Ebenso schützt IGF-I murine Keratinozyten vor UVC-induzierter Apoptose (Li et al. 2006). Im Rahmen dieser Arbeit konnte die starke hemmende Wirkung des Insulins auf die Induktion der Apoptose durch TNF $\alpha$  und Actinomycin D in primären humanen Keratinozyten bestätigt werden.

Da nahezu alle durch Insulin hervorgerufenen Effekte über den PI3K/Akt Signalweg vermittelt werden, kommt diesem Signalweg auch in der Regulation der Apoptose eine besondere Rolle zu. So wird der antiapoptotische Effekt des Insulins durch eine Aktivierung der Akt Kinase hervorgerufen (Lawlor et al. 2001). Gleiches gilt für die antiapoptotische Wirkung des IGF-I, welche ebenso über die Akt Kinase vermittelt wird (Vincent et al. 2002). Die Signalwege, über die die Akt Kinase eine

antiapoptotische Wirkung ausübt, wurden bereits sehr gut charakterisiert (Song et al. 2005).

Ausgehend von der Rolle der Akt Kinase in der Insulin-vermittelten Zytoprotektion wäre eine Interferenz der antiapoptotischen Signalwege des Insulins und des S1P denkbar, da S1P eine ausgeprägte Dephosphorylierung der Akt Kinase hervorrief. Eine derartige Interaktion konnte bereits für die Beeinflussung der Proliferation in humanen Keratinozyten nachgewiesen werden. Tatsächlich konnte erstmals auch eine Interferenz der antiapoptotischen Signalwege des S1P mit denen des Insulins im Experiment gezeigt werden.

So führte eine Vorinkubation mit S1P zu einer Reduktion des antiapoptotischen Effektes des Insulins. Diese Interferenz ist besonders bemerkenswert, da S1P selbst eine protektive Wirkung auf Keratinozyten ausübt und ebenso wie Insulin einen potenten Schutz vor der durch TNF $\alpha$  und Actinomycin D induzierten Apoptose darstellt. Die antiapoptotische Wirkung des S1P ist in einer Vielzahl von Zellarten beschrieben worden. So wurde eine Zytoprotektion von Melanozyten, Neutrophilen, Makrophagen, Endothelzellen oder Myofibroblasten gezeigt (Radeff-Huang et al. 2004). Interessanterweise führte die Vorinkubation der Zellen mit S1P nicht nur zu einer Reduktion des antiapoptotischen Effektes des Insulins sondern auch des IGF-I. Dies bestätigt, dass S1P über die Dephosphorylierung der Akt Kinase eine Reduktion des antiapoptotischen Effektes evoziert, da sowohl Insulin als auch IGF-I ihre antiapoptotische Wirkung über die Akt Kinase vermitteln.

Darüber hinaus verdeutlichen diese Ergebnisse, dass S1P und Insulin ihre antiapoptotische Wirkung jeweils über verschiedene unabhängige Signalwege vermitteln, die in der Signaltransduktion der Keratinozyten koexistieren. Doch ergibt sich aus der Hemmung der Akt Kinase durch S1P eine Interferenz dieser Signalwege. Daher kommt es bei der Vorbehandlung der Zellen mit S1P vor der Stimulation mit Insulin zu einer Reduktion der antiapoptotischen Wirkung auf das Niveau der Wirkung des S1P allein, da in diesem Fall nur noch der protektive Signalweg des S1P zum Tragen kommt. Die Existenz zweier alternativer antiapoptotischer Signalwege in der gleichen Zelle, von denen der eine Akt-abhängig und der andere Akt-unabhängig ist, wurde bereits in Fibroblasten gezeigt (Kulik et al. 1998).

### 4.1.7 Rolle der Akt Kinase in der antiapoptotischen Wirkung des S1P

Die bisher gezeigten Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass S1P seine antiapoptotische Wirkung über einen Akt-unabhängigen Signalweg vermittelt. Diese Vermutung sollte durch den Einsatz des Hemmstoffs der PI3K LY294002 bestätigt werden. Überraschenderweise führte die Hemmung der PI3K jedoch zu einer vollständigen Aufhebung des S1P-Effektes. So zeigte S1P keinerlei zytoprotektive Wirkung in Gegenwart von LY294002. Dieses überraschende Ergebnis lässt sich auf verschiedene Weise deuten: Die einfachste Erklärung, dass der antiapoptotische Effekt des S1P doch über einen Akt-abhängigen Signalweg vermittelt wird, ist definitiv auszuschließen, da S1P keine Aktivierung der Akt Kinase hervorruft, diese sogar hemmt. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass für die Vermittlung einer Zytoprotektion eine gewisse basale Aktivität der Akt Kinase notwendig ist. Dieser Ansatz wird dadurch bestätigt, dass S1P die Akt Kinase nicht vollständig hemmte. Die Behandlung der Zellen mit LY294002 führte dagegen zu einer massiven Reduktion der Akt Phosphorylierung auf ein nicht mehr detektierbares Niveau, das weit über den durch S1P erzeugten Effekt hinausgeht. Auf diese Weise könnte ein proapoptotischer Effekt des LY294002 den antiapoptotischen Effekt des S1P vollständig überlagern.

Möglich ist es außerdem, dass S1P über einen PI3K-abhängigen jedoch Akt-unabhängigen Signalweg seine antiapoptotische Wirkung vermittelt. Da LY294002 einen Hemmstoff der PI3K darstellt, ist streng genommen lediglich eine Aussage über die Beteiligung der PI3K möglich. Zwar wird die Aktivierung der Akt Kinase hauptsächlich über die PI3K vermittelt, doch wurden auch PI3K-unabhängige Signalwege zur Aktivierung beschrieben. So kann eine Aktivierung der Akt ebenso durch die PKA oder  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Kinase vermittelt werden (Song et al. 2005). Bestätigt wird diese Erklärung durch Untersuchungen in sinusoidalen Endothelzellen. Auch hier war der antiapoptotische Effekt des S1P von der Akt Kinase unabhängig, jedoch PI3K-abhängig (Zheng et al. 2006). Ebenso wurde für die antiapoptotische Wirkung des S1P auf Osteoblasten eine PI3K-Abhängigkeit und Akt-Unabhängigkeit gezeigt (Grey et al. 2002). Somit wäre für die protektive Wirkung des S1P in Keratinozyten eine Beteiligung der PI3K denkbar, obwohl die Akt Kinase gehemmt wird.

Fast alle Untersuchungen zur antiapoptotischen Wirkung des S1P in verschiedensten Zellen zeigen eine Beteiligung der Akt Kinase. Doch gerade in humanen

Keratinocyten konnten bereits antiapoptotische Signalwege gezeigt werden, die nicht durch die Akt Kinase vermittelt werden. So wird die Expression des antiapoptotischen Bcl-2 Proteins unabhängig vom PI3K/Akt Signalweg reguliert (Jost et al. 2001). Dies ist besonders interessant, da der zytoprotektive Signalweg des S1P bereits durch eine Induktion der Bcl-2 Expression in Keratinocyten beschrieben worden ist (Manggau et al. 2001). Dies bestätigt die Theorie, dass S1P über einen PI3K/Akt-unabhängigen Signalweg durch eine Induktion des Bcl-2 Proteins antiapoptotisch wirkt. Auch die antiapoptotische Wirkung des  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in Keratinocyten wird Akt-unabhängig durch eine Reduktion der Aktivität der Caspasen vermittelt (Diker-Cohen et al. 2006).

### **4.1.8 Rolle des S1P<sub>2</sub> Rezeptors in der Modulation der antiapoptotischen Wirkung des Insulins**

Die Interferenz der antiapoptotischen Signalwege des Insulins und des S1P wird durch die Dephosphorylierung der Akt Kinase durch S1P ausgelöst. Da eindeutig gezeigt werden konnte, dass die Aktivierung des S1P<sub>2</sub> Rezeptors für die Dephosphorylierung verantwortlich ist, sollte auch dieser Rezeptorsubtyp für die Interferenz der antiapoptotischen Signalwege verantwortlich sein. Dies konnte durch den Einsatz von JTE013 und FTY720-P bestätigt werden. So kam es zu keiner signifikanten Beeinflussung der antiapoptotischen Wirkung des Insulins durch S1P in Gegenwart von JTE013 oder durch FTY720-P. Dies bestätigt die entscheidende Rolle des S1P<sub>2</sub> Rezeptors in der Hemmung der Akt Phosphorylierung und den damit verbundenen zellulären Konsequenzen für die Zytoprotektion. Dies zeigt weiterhin die Überlegenheit des S1P gegenüber FTY720-P in der Behandlung hyperproliferativer Erkrankungen, da nur S1P zu einer Hemmung der überaktiven Insulin/IGF-vermittelten Signalwege führen kann und damit eine pathologisch verminderte Apoptoserate der Keratinocyten auf ein normales Niveau zu regulieren vermag.

Abb. 59 fasst die Beeinflussung der antiapoptotischen Signalwege des Insulins durch S1P unter Berücksichtigung der durch S1P selbst hervorgerufenen Zytoprotektion schematisch zusammen:

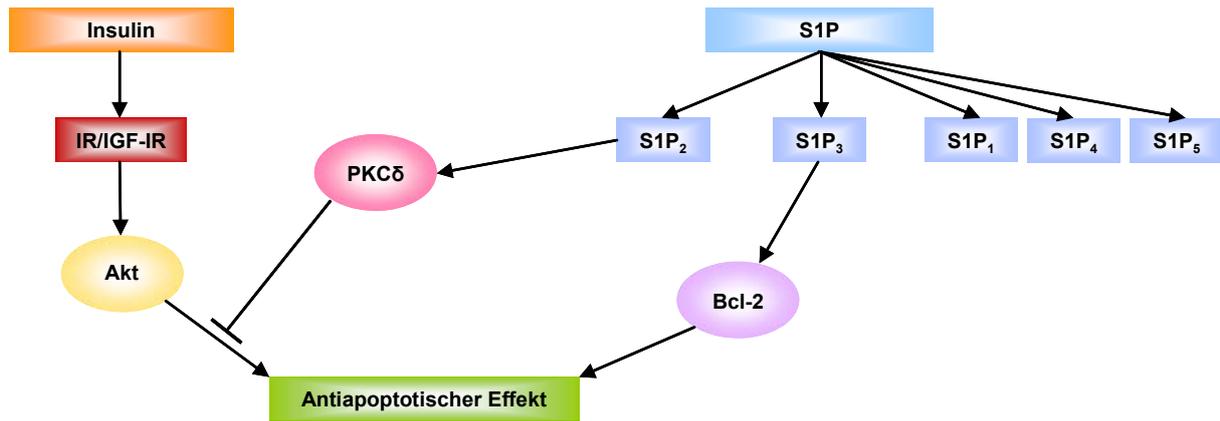


Abb. 59: Schematische Darstellung der Interaktion antiapoptotischer Signalwege des Insulins und des S1P

## 4.2 Charakterisierung des antiapoptotischen Effektes des S1P

Zwar ist die antiapoptotische Wirkung des S1P in humanen Keratinozyten bereits beschrieben worden, jedoch waren die zugrunde liegenden Signalwege nicht bekannt. Lediglich wurde eine Beteiligung des Bcl-2 Proteins an der Vermittlung der Protektion der Keratinozyten vor Apoptose beschrieben (Manggau et al. 2001). Daher sollten die beteiligten Signalwege, die den antiapoptotischen Effekt des S1P in Keratinozyten vermitteln, charakterisiert werden.

### 4.2.1 S1P<sub>3</sub> vermittelt die antiapoptotische Wirkung

Über die Beteiligung der S1P Rezeptoren an der Vermittlung der antiapoptotischen Wirkung in Keratinozyten lagen bisher keinerlei Kenntnisse vor. Durch den Einsatz von PTX konnte eine Beteiligung der S1P Rezeptoren bestätigt werden, da eine Hemmung der Vermittlung über G<sub>i</sub>-Proteine die antiapoptotische Wirkung des S1P reduzierte. Da der Effekt des S1P jedoch nicht vollständig aufgehoben wurde, sind entweder intrazelluläre Effekte oder S1P Rezeptoren für die antiapoptotische Wirkung verantwortlich, die nicht ausschließlich über G<sub>i</sub>-Proteine wirken. Bis auf den S1P<sub>1</sub> Rezeptor koppeln alle anderen Rezeptorsubtypen über mindestens ein weiteres G-Protein außer dem G<sub>i</sub>-Protein (Spiegel et al. 2003b). Damit konnte eine ausschließliche Beteiligung des S1P<sub>1</sub> Rezeptors ausgeschlossen werden. Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Subtyp neben weiteren Rezeptoren oder intrazellulären Effekten beteiligt ist. Durch die Messung der antiapoptotischen Wirkung des S1P<sub>1</sub> Rezeptorantagonisten SEW2871 und des S1P in mit S1P<sub>1</sub> Antisense ODN behandelten Zellen konnte eine Beteiligung des S1P<sub>1</sub> Rezeptors jedoch eindeutig ausgeschlossen werden. Im Rahmen dieser Arbeit

durchgeführte Experimente, in denen die Expression der jeweiligen S1P Rezeptorsubtypen durch Antisense ODN gehemmt worden war, zeigten, dass ausschließlich der S1P<sub>3</sub> Rezeptor die antiapoptotische Wirkung des S1P in humanen Keratinozyten vermittelt.

Der S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3</sub> Rezeptorsubtyp sind vornehmlich an der Zytoprotektion beteiligt (Radeff-Huang et al. 2004). Im Gegensatz zu der hier gezeigten Nichtbeteiligung des S1P<sub>1</sub> Rezeptors wurde eine Vermittlung der antiapoptotischen Wirkung über eine Aktivierung dieses Rezeptorsubtyps in humanen und bovinen Endothelzellen gezeigt (Morales-Ruiz et al. 2001; Igarashi et al. 2001a). Auch zeigte der S1P<sub>1</sub> Rezeptorantagonist SEW2871, im Gegensatz zu seiner Wirkung in Keratinozyten, in Kardiomyozyten zytoprotektives Potential (Zhang et al. 2007). In Übereinstimmung zu den Ergebnissen dieser Arbeit wurde die Bedeutung des S1P<sub>3</sub> Rezeptors in der Vermittlung antiapoptotischer Signalwege in embryonalen Fibroblasten über eine Aktivierung der Akt Kinase gezeigt (Baudhuin et al. 2004). Darüber hinaus führte eine stabile Transfektion des S1P<sub>3</sub> Rezeptors in Hepatomzellen wie auch in CHO (Chinese Hamster Ovary) Zellen zu einer Induktion antiapoptotischer Signalwege (An et al. 2000; Banno et al. 2001). Die Bedeutung des S1P<sub>3</sub> Rezeptorsubtyps für die Vermittlung antiapoptotischer Signalwege konnte in der vorliegenden Arbeit ebenso in Keratinozyten gezeigt werden. So verlor S1P vollkommen seine antiapoptotische Wirkung, wenn die Expression des S1P<sub>3</sub> Rezeptors gehemmt war.

Jedoch ist trotz der eindeutigen Identifizierung des S1P<sub>3</sub> Rezeptors an der Vermittlung der antiapoptotischen Wirkung eine mögliche intrazelluläre Wirkung des S1P aufgrund der Ergebnisse mit PTX nicht auszuschließen. So führt eine Überexpression der SphK in verschiedenen Zellarten durch eine Erhöhung des intrazellulären S1P Spiegels zu einer antiapoptotischen Wirkung (Olivera et al. 1999; Cuvillier et al. 2001). Zweifelsohne ist daher das intrazelluläre Gleichgewicht zwischen proapoptotischen Ceramiden und dem antiapoptotischen S1P von entscheidender Bedeutung für das Überleben einer Zelle (Spiegel et al. 2003b).

### 4.2.2 Rolle des S1P<sub>2</sub> Rezeptors

Interessanterweise wurde der antiapoptotische Effekt des S1P eindeutig stärker, wenn der S1P<sub>2</sub> oder der S1P<sub>4</sub> Rezeptor nicht zur Interaktion zur Verfügung standen. So konnte durch die Anwendung der Antisense-Technologie gezeigt werden, dass sowohl bei der mit Transfektion Antisense ODN gegen den S1P<sub>2</sub> oder S1P<sub>4</sub> Rezeptor

als auch mit scrambled ODN S1P eindeutig antiapoptotisch wirkte. Jedoch war das Ausmaß dieses Effektes im Falle der Abwesenheit dieser Rezeptoren noch stärker. Die Unterschiede zwischen den mit Antisense oder scrambled ODN behandelten Zellen waren jedoch nicht signifikant. Um zu klären, ob es sich hierbei um unspezifische Effekte der Antisense ODN handelt, wurde die antiapoptotische Wirkung des S1P in Gegenwart des Rezeptorantagonisten JTE013 untersucht. In Übereinstimmung zu den Ergebnissen der Antisense Experimente führte S1P in Gegenwart des Antagonisten auch hier zu einem stärkeren antiapoptotischen Effekt. Dies war zu erwarten und lässt sich durch eine verminderte Dephosphorylierung der basalen Akt Kinase erklären, da S1P diese Wirkung über den S1P<sub>2</sub> Rezeptorsubtyp vermittelt. Damit ergibt sich neben dem Akt-unabhängigen antiapoptotischen Signalweg durch die Hemmung der basalen Akt Kinase noch ein tendenziell proapoptotisches Signal, das aber durch die dominierende protektive Wirkung des S1P überlagert wird. Ist dieser Weg allerdings durch Hemmung des S1P<sub>2</sub> Rezeptors ausgeschaltet, kommen ausschließlich antiapoptotische Effekte zum Tragen, was sich in einer stärkeren Reduktion der Apoptoserate niederschlägt. Die Tatsache, dass S1P in einer Zelle über Aktivierung seiner jeweiligen Rezeptorsubtypen gegensätzliche Effekte ausüben kann, ist sehr interessant. Ein derartiger Zusammenhang wurde bereits für die Migration der CHO Zellen intensiv untersucht. In Analogie zu den Ergebnissen zum antiapoptotischen Effekt in Keratinozyten wirkt der S1P<sub>2</sub> Rezeptor hemmend auf die Migration der CHO Zellen, wohingegen der S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3</sub> Rezeptor diese fördern. Diese gegensätzliche Wirkung auf die Migration wird durch die rezeptorsubtypspezifische Regulation der GTPasen der Rho Familie vermittelt (Takuwa 2002). Die Verstärkung der antiapoptotischen Wirkung des S1P in Abwesenheit des S1P<sub>4</sub> Rezeptors konnte nicht geklärt werden und ist möglicherweise ein Effekt des Antisense ODN. Für einen toxischen Effekt des S1P<sub>4</sub> Antisense ODN spricht die Beobachtung, dass die Insulin-induzierte Akt Phosphorylierung in Gegenwart von S1P<sub>4</sub> Antisense ODN eindeutig vermindert war.

### 4.2.3 Antiapoptotische Wirkung des FTY720-P

Abschließend wurde eine mögliche Regulation der Apoptose durch FTY720-P untersucht. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse sollte die Aktivierung der S1P Rezeptoren, insbesondere des S1P<sub>3</sub> Rezeptorsubtyps, eine ausgeprägte antiapoptotische Wirkung hervorrufen. Dies konnte im Experiment bestätigt werden

und so führte die Stimulation mit FTY720-P zu einem eindeutigen Schutz der Keratinozyten vor Apoptose. Unabhängig vom Wirkort in den Lymphozyten wurde das antiapoptotische Potential des FTY720-P bereits in verschiedenen Zellen untersucht. So wird ein protektiver Effekt auf die Gefäße und ein antiatherogenes Potential des FTY720 beschrieben (Tölle et al. 2007). Ein Teilaspekt dieser protektiven Wirkung des FTY720 wird bedingt durch die Aktivierung antiapoptotischer Signalwege in Endothelzellen, die durch eine Phosphorylierung der Akt Kinase durch FTY720-P vermittelt werden (Sanchez et al. 2003). In verschiedenen Krebszellen kann jedoch ein proapoptotischer Effekt des FTY720-P beobachtet werden (Lee et al. 2004; Shen et al. 2007). Diese Unterschiede lassen sich durch differierende Expressionsmuster der S1P Rezeptoren erklären, welche von großer Bedeutung für die Wirkung seines Agonisten sind.

### 4.3 NO-Abhängigkeit des antiapoptotischen Effektes

#### 4.3.1 Rolle des NO in der Apoptose

Bei der Vermittlung der antiapoptotischen Wirkung des S1P spielt die eNOS eine große Rolle. Radeff-Huang et al. beschreiben diesen Signalweg über eine PI3K/Akt-vermittelte Aktivierung der eNOS als den dominierenden antiapoptotischen Signalweg des S1P (Radeff-Huang et al. 2004).

In der Haut ist der Botenstoff NO für die Regulation physiologischer wie auch pathophysiologischer Prozesse von großer Bedeutung (Cals-Grierson et al. 2004). Jedoch ist die Wirkung des NO hinsichtlich der Zytotoxizität als janusköpfig zu beschreiben, denn niedrige Level an NO wirken antiapoptotisch, während hohe NO-Spiegel die Apoptose fördern. Auf der einen Seite wirkt NO proapoptotisch durch oxidative Schädigung der DNA. Oft entsteht aus der Reaktion von NO mit reaktiven Sauerstoffspezies Peroxynitrit, das als potentes Oxidans zur DNA-Fragmentierung führen kann. Auf der anderen Seite kann NO über cGMP-abhängige Signalwege antiapoptotisch wirken, indem die Aktivität der Caspasen gehemmt wird oder die Expression des Bcl-2 Proteins gesteigert wird. Darüber hinaus kann NO über eine direkte S-Nitrosylierung der Caspasen deren Aktivität hemmen, direkt den Abbau von Bcl-2 hemmen oder die Freisetzung von Cytochrom c verhindern (Kim et al. 1999). Experimente mit verschiedenen NO Donatoren verdeutlichen ebenso die biphasische Wirkung des NO: So wirken geringe Konzentrationen des NO Donators

(0,01 - 0,25 mM) proliferationsfördernd auf Keratinozyten, während Konzentrationen > 0,5 mM zytostatisch wirken (Krischel et al. 1998).

In humanen Keratinozyten konnte im Rahmen dieser Arbeit eine positive Wirkung des NO gezeigt werden. So wirkte NO protektiv auf Keratinozyten. Dies konnte zum einen durch den Einsatz eines NO Donators gezeigt werden, der Keratinozyten potent vor der Apoptose zu schützen vermochte. Zum anderen erwies sich der antiapoptotische Signalweg des S1P als NO-abhängig, denn die Hemmung der NO-Synthese führte zur vollständigen Aufhebung der protektiven Wirkung des S1P. Somit konnte erstmals der zytoprotektive Signalweg des S1P in Keratinozyten näher charakterisiert und als NO-abhängig beschrieben werden. Die zytoprotektive Wirkung des NO in Keratinozyten wurde bereits intensiv von Weller et al. untersucht. Sie zeigten, dass die durch UVB-induzierte Apoptose eindeutig durch L-NAME gefördert und durch strukturell verschiedene NO Donatoren gehemmt wurde. Darüber hinaus zeigten KO-Mäuse mit gehemmter NO-Synthese in den Zellen der Haut deutlich höhere Apoptosemarker wie Caspase-3 Aktivität und DNA-Fragmentierung nach Bestrahlung mit UVB als Wildtyp Mäuse (Weller et al. 2003). Die antiapoptotische Wirkung des NO konnte ebenso in murinen Keratinozyten bestätigt werden (Yamaoka et al. 2004).

Für den antiapoptotischen Effekt des S1P wurde bereits eine Beteiligung des Bcl-2 Proteins gezeigt (Manggau et al. 2001). Diese Arbeit beschreibt erstmals die Induktion der Expression des Bcl-2 Proteins durch S1P als NO-abhängigen Effekt. So wird die Förderung der Expression des Proteins durch die Stimulation mit S1P im Falle der Hemmung der NO-Synthese deutlich gemindert. Dies steht in Einklang zum Wirkmechanismus des NO, Keratinozyten durch NO-abhängige Induktion des Bcl-2 Proteins vor UVA-induzierter Apoptose zu schützen (Suschek et al. 1999). Yamaoka et al. bestätigten diesen antiapoptotischen Signalweg des NO in murinen Keratinozyten. Sie konnten neben einer Induktion der Bcl-2 Expression durch NO eine verminderte Expression des p53 Proteins und damit verbunden eine Hemmung der Cytochrom c Freisetzung sowie eine Reduktion der Aktivität der Caspase-3, Caspase-8 und Caspase-9 durch NO beobachten (Yamaoka et al. 2004).

### 4.3.2 NO-Synthasen

NO wird intrazellulär in einer enzymatischen Reaktion aus dem Substrat *L*-Arginin durch die NO-Synthasen gebildet. Zwar werden alle NO-Synthasen in der Haut exprimiert, jedoch ist das Expressionsmuster der NO-Synthasen in den jeweiligen Schichten der Haut unklar (Cals-Grierson et al. 2004). Gerade in Keratinozyten wird die Expression der NO-Synthasen konträr diskutiert. Durch PCR Analyse konnte die Expression der nNOS mRNA in der humanen Haut gezeigt werden, nicht aber der eNOS mRNA (Sirsjo et al. 1996). Dies konnte auf Ebene des Proteins von Baudouin und Tachon bestätigt werden, die eindeutig nur das nNOS Protein als konstitutive NO-Synthase in Keratinozyten identifizieren konnten (Baudouin et al. 1996). Das Gegenteil wurde von Shimizu et al. gezeigt, die die Expression des Proteins der eNOS nicht aber der nNOS in Keratinozyten detektieren konnten (Shimizu et al. 1997). Auch in der humanen Haut war nur der Nachweis des eNOS Proteins möglich (Sakai et al. 1996). Dies wurde durch Untersuchungen widerlegt, die zeigten, dass Melanozyten, nicht Keratinozyten, die Quelle der eNOS mRNA in der Haut darstellen (Jackson et al. 1998). Zwei aktuellere Studien zeigten jedoch sowohl die Expression der nNOS als auch der eNOS auf Protein- und mRNA-Ebene in primären humanen Keratinozyten und HaCaT Zellen (Stallmeyer et al. 2002; Boissel et al. 2004). Dagegen wurde die Expression der iNOS in Keratinozyten weniger stark diskutiert. Zwar herrscht Uneinigkeit über eine mögliche konstitutive Expression, doch wurde vielfach eine Induktion der iNOS in Keratinozyten gezeigt. So ist eine Induktion der iNOS durch verschiedene Zytokine wie Interleukine, TNF $\alpha$ , Interferon- $\gamma$  oder LPS in Keratinozyten beschrieben worden (Bruch-Gerharz et al. 1996; Sirsjo et al. 1996; Yamaoka et al. 2000). Darüber hinaus ist eine Induktion der iNOS auch durch UV-Strahlung möglich (Chang et al. 2003; Gonzalez-Maglio et al. 2005).

Aus dieser konträren Diskussion ergab sich die Notwendigkeit, das Expressionsmuster der NO-Synthasen für die in dieser Arbeit eingesetzten primären humanen Keratinozyten eindeutig zu klären. So konnte durch die PCR Analyse eine Expression der konstitutiven NO-Synthasen eNOS und nNOS festgestellt werden. Die Expression der eNOS konnte ebenso auf Proteinebene gezeigt werden. Doch war das Ausmaß der Proteinexpression in Keratinozyten wesentlich geringer als in Endothelzellen. In unstimulierten Keratinozyten war darüber hinaus keine iNOS mRNA detektierbar. Diese ließ sich jedoch durch TNF $\alpha$  und UV-Strahlung induzieren.

Dies steht in Einklang zu der Tatsache, dass entzündliche Erkrankungen der Haut wie Psoriasis oder atopische Dermatitis mit einer starken Induktion der iNOS Expression assoziiert sind (Cals-Grierson et al. 2004). Erstaunlich war allerdings, dass die Expression des iNOS Proteins in unbehandelten Keratinozyten nachweisbar war, obwohl in unstimulierten Zellen keine iNOS mRNA detektiert werden konnte. Jedoch konnte eine konstitutive Expression des iNOS Proteins in der Haut von weiteren Arbeitsgruppen bestätigt werden (Valacchi et al. 2002; Gonzalez-Maglio et al. 2005).

### 4.3.3 Aktivierung der eNOS

Durch die Bestätigung, dass konstitutive NO-Synthasen in humanen Keratinozyten exprimiert werden, war es nun möglich, die eNOS als die NO-Synthase zu identifizieren, die den antiapoptotischen Effekt des S1P vermittelt. Der NO-Synthase Hemmstoff L-NAME gilt zwar als unspezifisch, weist jedoch eine gewisse Selektivität für die konstitutiven NO-Synthasen auf ( $IC_{50}$  Werte: iNOS 14  $\mu$ M, nNOS 10  $\mu$ M und eNOS 5,9  $\mu$ M) (Salerno et al. 2002). Damit ergab sich aus der Aufhebung des antiapoptotischen Effektes des S1P durch L-NAME eine Beteiligung der konstitutiven NO-Synthasen.

Die große Bedeutung der eNOS für die Vermittlung antiapoptotischer Signalwege ist für verschiedene Zellarten, insbesondere Endothelzellen, eindeutig gezeigt worden (Albrecht et al. 2003). Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass S1P auch eine Aktivierung der eNOS in humanen Keratinozyten induzierte. Erstmals wurde damit eine Beteiligung der eNOS an der antiapoptotischen Wirkung des S1P in Keratinozyten gezeigt. Dass die eNOS antiapoptotische Signalwege in Keratinozyten vermittelt, wurde bisher lediglich in eNOS KO-Mäusen gezeigt, deren Keratinozyten verstärkte Apoptoseraten aufweisen (Weller et al. 2003). Um die Beteiligung der eNOS an der antiapoptotischen Wirkung des S1P zu untermauern, wären Untersuchungen in eNOS KO-Mäusen wünschenswert.

In humanen Keratinozyten aktivierte S1P die eNOS durch Phosphorylierung an Ser<sup>1177</sup>. Diese Aktivierung der eNOS führte somit zu einer gesteigerten Bildung von NO in Keratinozyten. Ebenso wie die Aktivierung der eNOS erwies sich die Induktion der NO-Synthase als konzentrationsabhängig. Übereinstimmend führte eine Stimulation der Keratinozyten mit 10  $\mu$ M S1P sowohl in der Aktivierung der eNOS als auch der NO-Bildung zum Maximaleffekt. Die Aktivität der eNOS kann

posttranslational durch Acetylierung, durch Protein-Protein-Interaktion oder durch Phosphorylierung reguliert werden. Dabei erhöht eine Phosphorylierung an Ser<sup>1177</sup> die Aktivität, während eine Phosphorylierung an Thr<sup>495</sup> die Aktivität reduziert (Fleming et al. 2003).

Eine Aktivierung der eNOS kann durch polypeptidische Wachstumsfaktoren wie VEGF (vascular endothelial growth factor), Hormone, Liganden der GPCR oder auch über nichtrezeptorvermittelte Signalwege wie durch Scherstress ausgelöst werden (Dudzinski et al. 2006). Unter den Liganden der GPCR sind LPA und S1P von besonderem Interesse. So ist die Aktivierung der eNOS in Endothelzellen durch S1P bereits vielfach beschrieben (Morales-Ruiz et al. 2001; Igarashi et al. 2001a; Igarashi et al. 2001b). Auch in sinusoidalen Endothelzellen wird die antiapoptotische Wirkung des S1P durch eine Aktivierung der eNOS durch Phosphorylierung an Ser<sup>1177</sup> evoziert (Zheng et al. 2006). Ebenso vermag der S1P Rezeptoragonist FTY720-P eine Aktivierung der eNOS im Endothel hervorzurufen und so eine Vasodilatation zu vermitteln (Tölle et al. 2005). Die extrazelluläre Regulation der Aktivität der eNOS durch GPCR konnte nun ebenso in humanen Keratinozyten gezeigt werden, da PTX sowohl die Aktivierung der eNOS durch S1P hemmte als auch auf der nachfolgenden Ebene die S1P-induzierte NO-Bildung aufhob. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass die antiapoptotische Wirkung des S1P in Keratinozyten durch eine Aktivierung des S1P<sub>3</sub> Rezeptorsubtyps vermittelt wird, war es nicht verwunderlich, dass eben dieser Rezeptorsubtyp die Aktivierung der eNOS vermittelte. Eine Beteiligung von G<sub>i</sub>-Proteinen an der S1P-vermittelten Aktivierung der eNOS wurde bereits in Endothelzellen gezeigt (Morales-Ruiz et al. 2001; Igarashi et al. 2001a).

In Einklang zu den Ergebnissen dieser Arbeit wurde bereits eine Beteiligung der eNOS an der Vermittlung antiapoptotischer Signalwege des S1P in Endothelzellen gezeigt. So schützte S1P HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) Zellen durch einen NO-abhängigen Signalweg vor Apoptose, welcher auch durch eine Aktivierung der S1P Rezeptoren hervorgerufen wurde. Allerdings wurde hier die Zytoprotektion im Gegensatz zur Wirkung in Keratinozyten vorrangig durch den S1P<sub>1</sub> Rezeptor und nur teilweise über den S1P<sub>3</sub> Rezeptor hervorgerufen (Kwon et al. 2001).

### 4.3.4 Signalweg der eNOS Aktivierung

S1P vermittelte seine antiapoptotische Wirkung in humanen Keratinozyten durch eine gesteigerte NO-Bildung, die durch eine Aktivierung der eNOS verursacht wurde. Dies steht in Einklang zu den Ergebnissen von Kwon et al., die zeigen konnten, dass die Protektion von Endothelzellen durch S1P ausschließlich durch eine gesteigerte Aktivität der eNOS hervorgerufen wurde und nicht durch Induktion des Proteins (Kwon et al. 2001).

Die Aktivierung der eNOS kann in humanen Keratinozyten nicht durch die Akt Kinase erfolgen, da S1P eine eindeutige Hemmung der Akt Kinase bewirkte. Durch den Einsatz der beiden strukturell unabhängigen PI3K Hemmstoffe Wortmannin und LY294002 konnte dies allerdings nicht bestätigt werden. So führte Wortmannin zu einer eindeutigen Hemmung der S1P-vermittelten Aktivierung der eNOS und Induktion der Bildung von NO. Auch in Gegenwart von LY294002 wurde die S1P-induzierte eNOS Phosphorylierung gehemmt. Diese Ergebnisse waren besonders überraschend, da S1P in Keratinozyten keine Aktivierung der Akt Kinase zu evozieren vermochte. Doch sind die Ergebnisse in Analogie zu der beobachteten Hemmung des antiapoptotischen Effektes des S1P durch LY294002 zu sehen. Bemerkenswert ist, dass die Untersuchung der eNOS Phosphorylierung in Gegenwart von Wortmannin eine maximale Dephosphorylierung des Proteins in unstimulierten Zellen zeigte. Möglicherweise führt der Hemmstoff daher zu einer so starken basalen Hemmung des Proteins, dass keinerlei Effekte durch Stimulation ausgelöst werden können. Unabhängig davon ist es wie bereits erwähnt möglich, dass S1P antiapoptotische Signalwege über PI3K-abhängige und Akt-unabhängige Signalwege aktiviert. So wird auch in sinusoidalen Endothelzellen die zytoprotektive Wirkung des S1P über eine Aktivierung der eNOS vermittelt, wobei in diesen Zellen allerdings keine Aktivierung der Akt Kinase durch S1P beobachtet werden konnte. Jedoch konnte auch hier eine Hemmung der S1P-induzierten eNOS Phosphorylierung durch LY294002 gezeigt werden (Zheng et al. 2006). Darüber hinaus wurde für die Aktivierung der eNOS in BAEC Zellen ebenso eine Akt-Unabhängigkeit beschrieben und die Überexpression einer dominant-negativen Akt Mutante führte zu keiner Beeinflussung der eNOS Aktivität. Dennoch erwies sich die eNOS Phosphorylierung eindeutig als PI3K-anhängig, da sie durch Wortmannin gehemmt wurde (Boo et al. 2002). Die in dieser Arbeit beobachteten Unterschiede in der Hemmung der eNOS Phosphorylierung durch Wortmannin und LY294002 lassen

sich durch die unterschiedliche Effektivität der Hemmstoffe erklären. So konnte bereits gezeigt werden, dass beide Hemmstoffe, trotz gleicher Wirkung auf die Hemmung der PI3K, eine unterschiedliche Hemmung der nachfolgenden zellulären Effekte wie die Insulin-induzierte Akt Phosphorylierung hervorrufen (Adi et al. 2001). Abschließend ist daher zu sagen, dass LY294002 und Wortmannin keine adäquaten Werkzeuge darstellen, um eine Beteiligung der Akt Kinase an zellulären Signalwegen zu untersuchen.

Der Signalweg, über den S1P eine Aktivierung der eNOS in Keratinozyten induziert, bleibt unklar. Die Phosphorylierung der eNOS an Ser<sup>1177</sup> wird zwar hauptsächlich über die Akt Kinase vermittelt, doch kann die Vermittlung auch über alternative Kinasen erfolgen. So ist eine Phosphorylierung an Ser<sup>1177</sup> auch durch die PKA, die Calmodulinkinase II (CaMKII) oder die AMP Kinase (AMPK) möglich (Sessa 2004). Die Beteiligung der CaMKII wurde durch den Einsatz des spezifischen Hemmstoffs KN-93 untersucht wie die der AMPK durch den spezifischen Aktivator AICAR (nicht gezeigt). Doch führten beide Ansätze nicht zum Nachweis einer eindeutigen Beteiligung dieser Kinasen an der S1P-vermittelten eNOS Aktivierung.

### 4.3.5 Regulation der eNOS mRNA

S1P vermittelte nicht nur die Phosphorylierung der eNOS, sondern die Stimulation der Keratinozyten mit S1P führte auch zu einer starken Induktion der eNOS mRNA. Bereits nach einer Stunde wurde eine gesteigerte Transkription des eNOS Gens beobachtet. Eine Induktion der eNOS Transkription wurde durch zahlreiche Faktoren beschrieben. So führen Scherstress, Wachstumsfaktoren wie TGF $\beta$ , VEGF oder PDGF (platelet-derived growth factor) oder Hormone wie Insulin oder Estradiol zu einer gesteigerten Bindung von Transkriptionsfaktoren an ihre spezifischen eNOS Promotor Sequenzen und damit zu einer erhöhten Bildung von eNOS mRNA. Demgegenüber ist auch eine Hemmung der Transkription durch Zytokine möglich (Li et al. 2002).

TGF $\beta$  reguliert die Transkription von Zielgenen über eine Aktivierung des Smad Signalweges. Ein durch den TGF $\beta$  Rezeptor aktivierter Komplex aus Rezeptor Smad Protein und kooperativem Smad Protein wandert in den Zellkern ein, wo er Wechselwirkungen mit Transkriptionsfaktoren eingeht oder durch direkte Interaktion mit der DNA die Transkription beeinflusst (Massague et al. 2005). Da auch S1P die Aktivierung dieses Smad Signalweges in Keratinozyten hervorrufen kann, wäre eine

Regulation der Transkription der eNOS auf diesem Wege denkbar (Sauer et al. 2004).

Der Schluss, dass S1P die Bildung von NO durch eine verstärkte Transkription und nachfolgend einer gesteigerten Translation vermittelt, konnte nicht bestätigt werden, da S1P die Expression des eNOS Proteins zu keinem Zeitpunkt beeinflusste. Doch auch noch auf posttranskriptionaler Ebene ist eine Regulation der eNOS mRNA möglich, was aufgrund einer beschleunigten Degradation der mRNA zu einer verminderten Expression des Proteins führen kann (Fleming et al. 2003). Für diesen Ansatz liegen allerdings keinerlei Anhaltspunkte vor. Die Tatsache, dass der Level der Expression von eNOS mRNA und Protein nicht übereinstimmen, steht in Einklang zu den Ergebnissen von Stallmeyer et al., die eindeutig eNOS mRNA und dagegen nur sehr geringe Level an Protein in primären humanen Keratinozyten und HaCaT Zellen, nachweisen konnten (Stallmeyer et al. 2002).

Wahrscheinlich besitzt die Induktion der eNOS mRNA jedoch keinerlei Relevanz für die antiapoptotische Wirkung des S1P. Ebenso wie in Keratinozyten vermittelt S1P in HUVEC Zellen eine antiapoptotische Wirkung durch eine Induktion der Bildung von NO über eine Aktivierung der eNOS. Doch in Analogie zu den hier gezeigten Ergebnissen wird die Expression des eNOS Proteins durch S1P nicht beeinflusst, wohingegen eine deutliche Aktivierung des Enzyms beobachtet werden konnte (Kwon et al. 2001). Die entscheidende Regulation der Enzymaktivität der eNOS besteht nicht in der Modulation der Expression sondern in der Phosphorylierung des Proteins. Die beobachtete Induktion der NO-Synthese durch S1P muss daher ausschließlich auf die Steigerung der Enzymaktivität durch Phosphorylierung zurückgeführt werden, da der Level an eNOS Protein nicht erhöht wurde.

### **4.3.6 Regulation der iNOS**

Neben der Vermittlung des antiapoptotischen Effektes des S1P durch die Aktivierung der eNOS zeigte sich noch eine weitere Wirkung des S1P auf den NO-Haushalt. Da beobachtet werden konnte, dass das Auslösen der Apoptose durch Stimulation der Zellen mit TNF $\alpha$  und Actinomycin D mit einer Induktion der iNOS einherging, war es von Interesse, die Wirkung des S1P auf diese NO-Synthase zu untersuchen. So zeigte sich, dass S1P die Induktion der iNOS sowohl auf transkriptionaler als auch auf translationaler Ebene hemmte. Damit konnten zwei verschiedene Signalwege des S1P gezeigt werden, die durch Regulation des NO-Haushaltes den

antiapoptotischen Effekt vermitteln. Wie auch die eNOS Aktivierung erwies sich die Hemmung der Expression der iNOS als ein durch S1P Rezeptoren vermittelter Prozess.

Die Tatsache, dass NO sowohl an der Induktion der Apoptose als auch an zytoprotektiven Signalwegen beteiligt ist, offenbart das janusköpfige Verhalten des NO. Dies wird durch die Mengen an NO, die auf eine Zelle wirken, und damit der spezifischen Aktivierung der jeweiligen NO-Synthase erklärt. Der iNOS wird, bedingt durch ihr Vermögen zytotoxische Mengen an NO zu bilden, eine proapoptotische Wirkung zugeschrieben (Dimmeler et al. 1997). Dies steht in Einklang zu der Tatsache, dass TNF $\alpha$  und Actinomycin D eine Induktion der iNOS sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene auslösten. Der Schwellenwert der Menge an NO, der zu einer Induktion der Apoptose führen kann, ist von Zelle zu Zelle verschieden und wird auch durch den Redoxzustand der Zelle sowie die Expression antiapoptotischer Proteine bestimmt. Möglicherweise ist hierin auch der Grund für den geringen Effekt der Stimulation mit TNF $\alpha$  allein zu sehen, da eine Induktion der iNOS nur in Gegenwart von Actinomycin D auftrat, das eine Hemmung der Transkription antiapoptotischer Gene verursacht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eindeutig die Induktion der iNOS mit dem Auslösen der Apoptose in Keratinozyten assoziiert werden. Im Gegensatz dazu konnte jedoch eine protektive Wirkung der iNOS gezeigt werden. So wiesen zwei Arbeitsgruppen nach, dass eine Induktion der iNOS die Haut vor Schädigung durch UV-Strahlung schützt. Die UV-Exposition verursacht eine zytotoxische Peroxidation von Lipiden, die durch iNOS-generiertes NO vermindert werden kann (Lee et al. 2000; Gonzalez-Maglio et al. 2005). Jedoch bleibt das oxidative Potential des NO unbestritten.

Eine solche Hemmung der Induktion der iNOS durch S1P wurde bereits in Mesangiumzellen beobachtet. Auch hier führte S1P zu einer deutlichen Hemmung der Expression der durch IL-1 $\beta$  induzierten iNOS. Über eine Aktivierung des Smad Signalweges durch S1P war eine Kontrolle der Transkription des iNOS Gens möglich, was sich in einer verminderten Expression der iNOS mRNA und verminderter Enzymaktivität niederschlug (Xin et al. 2004). Daher ist auch in humanen Keratinozyten eine Hemmung der iNOS Expression über die Aktivierung des Smad Signalweges durch S1P denkbar. Die Wirkung des S1P konnte in Chondrozyten und VSMC (vascular smooth muscle cells) Zellen bestätigt werden,

denn auch hier führte S1P zu einer Hemmung der durch IL-1 $\beta$  induzierten iNOS (Stradner et al. 2007; Machida et al. 2008). Die Hemmung der iNOS Expression durch TGF $\beta$  wurde bereits in zahlreichen Zellen beschrieben (Geller et al. 1998).

Die Hemmung der durch TNF $\alpha$  und Actinomycin D induzierten iNOS durch S1P konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals in humanen Keratinozyten nachgewiesen werden.

### 4.3.7 Bedeutung für die Therapie der Psoriasis

Der iNOS kommt eine besondere Bedeutung in entzündlichen Erkrankungen zu. Daher ist es nicht verwunderlich, dass eine starke Induktion der iNOS bei entzündlichen Erkrankungen der Haut zu beobachten ist. Die verstärkte Expression der iNOS bei Psoriasis ist lang bekannt und gut beschrieben (Bruch-Gerharz et al. 1996; Sirsjo et al. 1996; Ormerod et al. 1998). Daraus ergibt sich ein scheinbarer Widerspruch, da psoriatische Haut durch eine Hyperproliferation der Keratinozyten gekennzeichnet ist und demgegenüber die iNOS zytostatische NO-Mengen bildet. Diese Beobachtung wird dadurch erklärt, dass in der psoriatischen Epidermis neben der Induktion der iNOS eine verstärkte Expression der Arginase-1 zu beobachten ist. Auf diese Weise wird das Substratangebot für die iNOS gesenkt und die so produzierte geringere NO-Menge wirkt proliferationsfördernd (Bruch-Gerharz et al. 2003). Daher ergibt sich aus der hier gezeigten Wirkung des S1P, die Induktion der iNOS zu hemmen, neben der Proliferationshemmung ein weiterer Ansatz, S1P in der Therapie der Psoriasis einzusetzen.

## 4.4 Antiapoptotische Eigenschaften des LPA in BAEC

Die antiapoptotische Wirkung des Lysophospholipids LPA konnte erstmals in Endothelzellen gezeigt werden und steht in Einklang zu der positiven Beeinflussung der endothelialen Wundheilung und der Förderung der Angiogenese durch LPA (Moolenaar et al. 2004). Es konnte gezeigt werden, dass der antiapoptotische Effekt des LPA über eine Aktivierung der Akt Kinase vermittelt wird. Die hier gezeigte Zytoprotektion der Endothelzellen durch LPA wurde bisher noch nicht beschrieben, obwohl für den verwandten Lipidmediator S1P bereits vielfach berichtet (Siess 2002). Eine Aktivierung der Akt Kinase durch LPA wurde dagegen bereits in BAEC Zellen beobachtet. So führte die Aktivierung der LPA Rezeptoren unter Vermittlung der Akt Kinase zu einer Aktivierung der eNOS (Kou et al. 2002). Doch wurde daraus keinerlei

zelluläre Konsequenz abgeleitet. In Übereinstimmung dazu konnte in unserer Arbeitsgruppe eine Aktivierung der eNOS durch Phosphorylierung an Ser<sup>1179</sup> durch LPA beobachtet werden. Die Aktivierung der eNOS führte zu einer Steigerung der intrazellulären NO-Bildung. Diese Ergebnisse erklären den der antiapoptotischen Wirkung des LPA zugrunde liegenden Signalweg. So führt die Aktivierung der Akt Kinase unter Vermittlung der eNOS zum Schutz der BAEC Zellen vor TNF $\alpha$  und Actinomycin D induzierter Apoptose. In Analogie zur Wirkung des S1P in Keratinozyten aktiviert LPA in Endothelzellen über eine Phosphorylierung der eNOS antiapoptotische Signalwege. Jedoch unterscheiden sich diese Signalwege in dem Mechanismus, der zur Aktivierung der eNOS führt. In Endothelzellen konnte eindeutig eine Aktivierung der Akt Kinase durch LPA beobachtet werden sowie deren Beteiligung an antiapoptotischen Signalwegen. Die Akt Kinase stellt nicht nur einen bedeutenden Regulator der Zytoprotektion dar, sondern vermittelt ebenso die Angiogenese (Kim et al. 2002). Dies offenbart damit eine kritische Rolle des LPA in der Regulation des Tumorwachstums. Auch in der Pathogenese der Atherosklerose kommt dem LPA eine große Bedeutung zu. LPA und S1P werden vornehmlich von aktivierten Thrombozyten gebildet. Ins Blut freigesetzte Lysophospholipide werden an Albumin oder in Form von Lipoproteinen gebunden. Dabei scheint das LDL (low density lipoprotein) die vornehmliche Quelle des LPA zu sein und die des S1P das HDL (high density lipoprotein). Damit erklärt sich die erhöhte Konzentration von LPA in atherosklerotischen Plaques. Beiden Lipoproteinen werden atherogene Eigenschaften zugeschrieben (Siess 2002). Doch konnte eindeutig eine zytoprotektive Wirkung des HDL gezeigt werden, die auf den antiapoptotischen Effekt des S1P in Endothelzellen zurückzuführen ist (Kimura et al. 2003). Erstmals wurde hier die antiapoptotische Wirkung des LPA in Endothelzellen nachgewiesen. Die Aktivierung der Akt Kinase durch LPA stellt das entscheidende Ereignis in der nachgeschalteten Aktivierung der eNOS dar. Damit konnte ein weiterer Mechanismus aufgezeigt werden, durch den auch LPA atheroprotektiv wirken kann, da die positive Rolle des durch die eNOS generierten NO im Schutz der Gefäße vor Atherosklerose bereits hinlänglich beschrieben worden (Mineo et al. 2006). Mit der hier gezeigten antiapoptotischen Wirkung des LPA auf Endothelzellen ist die Rolle des LPA in der Pathogenese der Atherosklerose differenzierter zu betrachten. Eine Beteiligung der LPA Rezeptoren an der Aktivierung der Akt Kinase und der damit verbundenen Zytoprotektion konnte durch den Einsatz von PTX gezeigt

werden. Dies steht in Einklang zu den Ergebnissen von Kou et al., die in BAEC Zellen ebenso eine PTX-sensitive Aktivierung der eNOS durch LPA beobachten konnten (Kou et al. 2002). Eine Beteiligung des LPA<sub>1</sub> Rezeptors an antiapoptotischen Signalwegen konnte bereits in Schwannschen Zellen gezeigt werden (Weiner et al. 1999). Die Aktivierung der LPA<sub>1</sub> und LPA<sub>2</sub> Rezeptoren führt außerdem zu einer Zytoprotektion von T-Lymphozyten (Goetzl et al. 1999). Dies verdeutlicht die vielfältige Wirkung der LPA Rezeptoren. Die spezifische Beteiligung der LPA Rezeptorsubtypen an der Vermittlung des antiapoptotischen Effektes über eine Aktivierung Akt Kinase sollte jedoch noch eindeutig geklärt werden.

### 4.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte die antiproliferative und antiapoptotische Wirkung von S1P auf Keratinozyten hinsichtlich der zugrunde liegenden Signaltransduktion näher charakterisiert und mit der Stimulation spezifischer Rezeptoren assoziiert werden. Aufgrund seines vielfältigen Wirkungsspektrums stellt S1P einen potenten Ansatz für neuartige Therapieformen dar. Aufgrund des wachstumshemmenden und differenzierungsfördernden Einfluss auf Keratinozyten, bietet sich die topische Anwendung von S1P in der Behandlung hyperproliferativer Erkrankungen wie der Psoriasis vulgaris an. Neben der Hemmung des Wachstums basaler Keratinozyten konnte erstmals eine Interaktion mit den mitogenen Signalwegen des Insulins gezeigt werden. Diese Wirkung verstärkt die Effizienz der Behandlung der Psoriasis mit S1P, da die Pathogenese der Psoriasis mit einer verstärkten Insulin/IGF-I-vermittelten Signaltransduktion assoziiert ist. Die Herunterregulation dieser Signalwege mittels Antisense-Technologie führt zu einer drastischen Normalisierung hyperplastischer Epidermis und verdeutlicht das Potential dieses Ansatzes in der Therapie der Psoriasis (Wraight et al. 2000). Die Charakterisierung der spezifischen Rolle der einzelnen Rezeptorsubtypen in der Vermittlung der Wachstumshemmung konnte die ausschließliche Beteiligung des S1P<sub>2</sub> Rezeptors zeigen. Daher wäre die Entwicklung eines selektiven S1P<sub>2</sub> Rezeptoragonisten von großer Bedeutung für die Behandlung hyperproliferativer Erkrankungen. Die alleinige Beteiligung des S1P<sub>2</sub> Rezeptors an der antiproliferativen Wirkung des S1P offenbart den Vorteil des S1P gegenüber FTY720, da FTY720 diesen Rezeptorsubtyp nicht zu aktivieren vermag. Darüber hinaus ergibt sich ein weiterer Ansatz aus der Interaktion antiapoptotischer Signalwege durch S1P. So konnte eine Modulation antiapoptotischer Signalwege des Insulins über eine Aktivierung des S1P<sub>2</sub> Rezeptor gezeigt werden. Auf diese Weise könnte die verminderte Apoptose der Keratinozyten, welche mit der Pathogenese der Psoriasis einhergeht, über den S1P<sub>2</sub> Rezeptor normalisiert werden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die in dieser Arbeit gezeigte Regulation der NO Synthesen durch S1P. Die Kenntnisse über die Modulation der NO-Level über eine Regulation der eNOS und iNOS in den Keratinozyten sind von großem Interesse für die positive Beeinflussung der epidermalen Wundheilung. Da S1P die Wundheilung der Haut fördert, sollte die Rolle des NO in den der Wundheilung zugrunde liegenden Prozessen näher untersucht werden.

Darüber hinaus ergibt sich aus der Hemmung der Expression der iNOS ein weiterer interessanter Ansatzpunkt für die Behandlung der Psoriasis, welche mit einer starken Induktion der iNOS assoziiert ist. Sollte die iNOS als neues Target genutzt werden, wäre die Identifikation des S1P Rezeptorsubtyps, der die Hemmung der iNOS Induktion vermittelt, von großem Interesse.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Kenntnisse über antiapoptotische und antiproliferative Signalwege des S1P in humanen Keratinozyten das enorme Potential dieses Lysophospholipids in der Behandlung der Psoriasis vulgaris verdeutlichen. Daher ist die Entwicklung eines topischen S1P-haltigen Arzneimittels sehr wünschenswert.