

Sphingosin-1-Phosphat in der β -Zelldysfunktion bei Typ 2 Diabetes

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

Elisabeth Inga Schmitz

geboren in Forchheim

März 2013

Die vorliegende Arbeit wurde von August 2008 bis März 2013 auf Anregung und unter Anleitung von

Herrn Prof. Dr. Burkhard Kleuser

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

und in der Abteilung für Ernährungstoxikologie
des Instituts für Ernährungswissenschaft
der Universität Potsdam

angefertigt.

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

Datum der Disputation: 14.11.2013

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Burkhard Kleuser (Universität Potsdam) danke ich sehr herzlich für die Betreuung meiner Arbeit.

Großer Dank geht an die Frauenförderung der Freien Universität Berlin für die Finanzierung des Großteils meiner Dissertation.

Vielen Dank auch an Frau Prof. Dr. Parr (Freie Universität Berlin) für die freundliche Finanzierung im letzten Teil meiner Arbeit.

Ebenfalls Dank geht an Herrn Prof. Dr. Melzig (Freie Universität Berlin) für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Püschel (Universität Potsdam) danke ich für die Erlaubnis zur Nutzung des Radioaktivlabors.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. Anja Lüth (Universität Potsdam) für die Analyse meiner Proben mittels der HPLC-MS-Anlage.

Für die Bereitstellung der in meiner Arbeit verwendeten Zellen danke ich Frau Prof. Dr. Schürmann (DIfE Rehbrücke), Herrn Prof. Dr. Maechler (Universität Genf) und den kooperierenden Ärzten bei den Zirkumzisionen in und um Berlin.

Allen beteiligten Mitgliedern der Arbeitskreise von Herrn Prof. Dr. Burkhard Kleuser, Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting, Herrn Prof. Dr. Püschel und Frau Prof. Dr. Schürmann danke ich für die Zusammenarbeit. Besonderer Dank geht auch an meine fleißigen Praktikanten.

Für das Korrekturlesen der Arbeit bedanke ich mich bei Frau Vera Baatz und Frau Dr. Anja Lüth.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern und meiner Familie, ohne die ein Studium und eine Doktorarbeit niemals möglich geworden wäre, und meinen Freunden für die unersetzliche Unterstützung.



Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	3
Inhaltsverzeichnis	5
1 Einleitung	11
1.1 Insulin	11
1.1.1 Signalkaskade am Insulinrezeptor	12
1.2 Diabetes mellitus	12
1.2.1 Typ 1 Diabetes Mellitus	13
1.2.2 Typ 2 Diabetes Mellitus	14
1.2.2.1 Die Rolle von Palmitat und Sphingolipiden im Krankheitsbild des T2DM	16
1.2.2.2 Tiermodelle und Zelllinien	17
1.3 Der programmierte Zelltod	18
1.3.1 Die Apoptose	19
1.3.2 Der apoptotische Signalweg	20
1.3.3 Die Bedeutung der Apoptose in pankreatischen β -Zellen	23
1.3.4 Die Bedeutung der Apoptose in Keratinozyten	24
1.4 Die Proliferation	25
1.4.1 Die Bedeutung der Proliferation in pankreatischen β -Zellen	26
1.5 Die Akt-Kinase	27
1.5.1 Die Aktivierung der Akt-Kinase	29
1.5.2 Die Rolle der Akt-Kinase in der Apoptose	30
1.5.3 Die Rolle der Akt-Kinase in der Proliferation	30
1.5.4 Die Rolle der Akt-Kinase im Krankheitsbild des T2DM	31
1.6 Sphingosin-1-Phosphat	32
1.6.1 Das Sphingolipidreostat	34
1.6.2 Sphingolipidrezeptoren	36

1.6.3	Modulatoren des S1P-Stoffwechsels	39
1.7	Fragestellung und Zielsetzung	40
2	Material und Methoden	43
2.1	Material	43
2.1.1	Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	43
2.1.2	Zellkultur	47
2.1.2.1	Zellen	47
2.1.2.2	Lösungen für die Zellkultur	47
2.1.2.3	Zellkulturmedien	48
2.1.2.4	Testsubstanzen zur Stimulation in der Zellkultur	49
2.1.3	Versuchstiere	50
2.1.3.1	Versuchstiernahrung	51
2.1.4	Proteinanalytik	51
2.1.5	Durchflusszytometrie	53
2.1.6	RNA-Analytik	53
2.2	Geräte	54
2.3	Methoden	55
2.3.1	Kultivierung der Zellen	55
2.3.1.1	Gewinnung primärer humaner Keratinozyten	55
2.3.1.2	Passagierung der primären Zellen und Zelllinien	56
2.3.1.3	Quantifizierung zur Einsaat der Zellen	57
2.3.1.4	Lagerung und Reaktivierung der Zellen	58
2.3.2	Tierversuche	58
2.3.3	Proteinanalytik	59
2.3.3.1	Zellyse und Proteinaufreinigung	59
2.3.3.2	Proteinquantifizierung	59
2.3.3.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	60
2.3.3.4	Western Blot und Immundetektion	61
2.3.4	Fluoreszenzmikroskopie	62
2.3.4.1	Proteinfärbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern	63
2.3.4.2	Bestimmung von Stickstoffmonoxid durch DAF-2DA	63
2.3.5	Zellproliferationsmessungen	64
2.3.6	Bestimmung der Apoptoserate	64
2.3.6.1	Durchflusszytometrie	64

2.3.6.2	TUNEL- Färbung	66
2.3.7	Untersuchung der mRNA-Transkription	67
2.3.7.1	Isolation der mRNA	67
2.3.7.2	cDNA-Synthese	68
2.3.7.3	Real-Time PCR	68
2.3.8	RNA-Interferenz (RNAi)	69
2.3.8.1	Verwendung von siRNA	69
2.3.9	ESI-RRLC/MS/MS	70
2.3.9.1	Bestimmung von S1P	71
2.3.10	Software	72
2.3.10.1	Statistik	72
2.3.10.2	Textverarbeitung und graphische Darstellung	73
3	Ergebnisse	75
3.1	Interaktion von S1P mit dem Insulinsignalweg in den β -Zellen der Bauchspeicheldrüse	75
3.1.1	Geeignete Zelllinien	75
3.1.2	Bedeutung der Akt-Aktivierung im Insulinsignalweg	77
3.1.3	Einfluss von S1P auf die insulinvermittelte Akt-Aktivierung	78
3.1.4	Einfluss von S1P auf die insulinvermittelte Zellproliferation	80
3.1.5	Einfluss von S1P auf die antiapoptotische Wirkung des Insulins	81
3.1.6	Charakterisierung der an der Hemmung der Akt-Aktivierung durch S1P beteiligten S1P-Rezeptoren	82
3.1.6.1	Beeinflussung der S1P-Wirkung auf die Akt-Aktivierung durch PTX	82
3.1.6.2	Einfluss von S1P-Rezeptor-Modulatoren auf die Hemmung der Akt-Aktivierung durch S1P	84
3.1.6.3	Einfluss von S1P-Rezeptormodulatoren auf die insulininduzierte Proliferation	86
3.1.6.4	Einfluss von S1P-Rezeptormodulatoren auf die antiapoptotische Wirkung des Insulins	86

3.2	Bedeutung von S1P in der Wirkung von Palmitat auf pankreatische β -Zellen	88
3.2.1	Regulation der Akt-Aktivierung durch Palmitat	88
3.2.1.1	Rolle von S1P in der Hemmung der Akt-Aktivierung durch Palmitat	90
3.2.2	Beeinflussung der S1P-Spiegel im Blut durch den Fettgehalt der Nahrung von Mäusen mit und ohne Prädisposition für T2DM .	92
3.2.3	Beeinflussung der S1P-Spiegel in MIN-6 Zellen durch Stimulation mit Palmitat	92
3.2.4	Expression der SphK und SPL in MIN-6 Zellen	95
3.2.5	Einfluss von Palmitat auf die Expression der SphK und SPL in MIN-6 Zellen	95
3.3	Signalwege der antiapoptotischen Wirkung von S1P in Keratinozyten .	97
3.3.1	S1P wirkt antiapoptotisch in Keratinozyten	97
3.3.1.1	S1P wirkt über die Aktivierung der eNOS antiapoptotisch	98
3.3.2	Beteiligung des S1P ₃ Rezeptors an der Apoptosehemmung durch S1P	100
4	Diskussion	105
4.1	Interaktion von S1P mit insulinvermittelten Signalwegen in β -Zellen .	105
4.1.1	Die Regulation der Akt-Kinase durch S1P	105
4.1.2	Die Regulation der Proliferation durch S1P	107
4.1.3	Die Regulation der Apoptose durch S1P	109
4.1.4	Die Beteiligung des S1P ₂ -Rezeptors	110
4.2	Beteiligung von S1P an den Wirkungen auf den Insulinsignalweg durch Palmitat in β -Zellen	114
4.3	Charakterisierung des durch S1P ausgelösten antiapoptotischen Effekts in Keratinozyten	119
4.3.1	Die Rolle der eNOS in der antiapoptotischen Wirkung des S1P	119
4.3.2	S1P ₃ vermittelt die antiapoptotische Wirkung des S1P	120
4.3.3	Bedeutung der antiapoptotischen Wirkung von S1P in Keratinozyten	121
4.4	Ausblick	122

5 Zusammenfassung	125
5.1 Zusammenfassung	125
5.2 Abstract	127
Literaturverzeichnis	129
Originalarbeiten	159
Vorträge	159
Abkürzungsverzeichnis	161
Abbildungsverzeichnis	167
Tabellenverzeichnis	169

1 Einleitung

1.1 Insulin

Insulin, ein aus zwei mit Disulfidbindungen verbundenen Polypeptidketten bestehendes Peptidhormon aus den Langerhans'schen Inseln des Pankreas', reguliert die Aufnahme von Glucose in die Zellen der Leber, der Muskeln und des Fettgewebes [1]. Es wird in den β -Zellen der Bauchspeicheldrüse über mehrere Vorstufen an den Ribosomen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) gebildet und als Hexamer mit Zink- Ionen in Golgi- Vesikeln an der Zellmembran gespeichert. Eine Ausschüttung des Insulins durch Exozytose der Speichervesikel erfolgt durch eine insulinunabhängige Aufnahme von Glucose in die β -Zelle über eine intrazelluläre Signalkaskade ab einem Anstieg des Glucosespiegels im Blut über 5 mM, jedoch können auch Hormone wie Gastrin, Sekretin und GLP-1 oder auch freie Fettsäuren zu einer Insulinausschüttung führen. Die biologische Halbwertszeit des Insulins beträgt im Blut etwa 5 min. Nach der sogenannten Akutphase der Insulinausschüttung, in welcher nur vesikulär gespeichertes Insulin ausgeschüttet wird, folgt eine oszillierende Freisetzung neugebildeten Insulins alle 3-6 min. Die Wirkungen des Insulins sind vielfältig, können aber allgemein als anabol zusammengefasst werden:

- es steigert die Glucoseaufnahme in Muskel- und Fettzellen durch den Einbau insulinabhängiger GLUT4- Glucosetransporter in die Zellmembran
- es fördert den Aufbau der Glucosespeicherform Glykogen im Körper und hemmt gleichzeitig deren Abbau
- es hemmt die Gluconeogenese in der Leber

- es hemmt die Lipolyse, fördert die Speicherung von Fett in den Adipozyten und trägt somit zu einer Senkung der freien Fettsäuren im Blut bei [2, 3]

Auch für die insulinproduzierende β -Zelle selbst ist die Autostimulation mit Insulin von überlebenswichtiger Bedeutung [4].

1.1.1 Signalkaskade am Insulinrezeptor

Seine Wirkungen entfaltet das Insulin durch Bindung an den Insulinrezeptor (IR). Dieser besteht als Transmembranrezeptor aus einer extrazellulären Bindungsstelle für das Insulin und aus einer intrazellulären Untereinheit mit Tyrosinkinaseaktivität [5]. Bindet ein Insulinmolekül an den IR, so findet eine Autophosphorylierung der intrazellulären Untereinheiten des IR statt und durch Aktivierung weiterer Kinasedomänen werden Bindungsstellen für Substrate des aktivierten IR wie der Insulinrezeptorsubstrate IRS1 und IRS2 freigelegt [6, 7]. Diese stellen Adapterproteine zwischen dem IR und weiteren, Src-homologie 2 Domainhaltigen Zielproteinen dar. Zu diesen potentiellen Zielproteinen zählen die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K), welcher der Akt-Signalweg nachgeschaltet ist, und die Mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK), die ihre Wirkungen über den Ras/Raf-Signalweg vermittelt [8–10]. Über die Akt kann Insulin unter anderem die Relokalisation der GLUT4 an die Zellmembran, die Aktivierung der Glykogensynthese und die Gentranskription zur Steigerung des Zellüberlebens und der Proliferation steuern [11, 12]. Nach Aktivierung des IR durch Insulin wird dieser internalisiert und steht erst nach einem Recyclingzyklus, welcher unter anderem eine katalytische Dephosphorylierung des Rezeptors und der Substrate beinhaltet, wieder an der Zelloberfläche zur Verfügung. Diese Dephosphorylierung wird durch Protein-Tyrosin-Phosphatasen vermittelt [13].

1.2 Diabetes mellitus

Beim Diabetes Mellitus, der zu deutsch etwa mit „honigsüßer Durchfluss“ übersetzt werden kann, handelt es sich um eine Gruppe von Stoffwechselerkrankungen, die

aus unterschiedlichen Gründen in unbehandelter Form mit dem Hauptsymptom des Ausscheidens von Glucose im Urin einhergehen. Die Ursache dieses Symptoms ist meist eine massive Ansammlung von Glucose im Blut, eine Hyperglykämie. Von einer Deregulation des Glucosstoffwechsels spricht man, wenn über 11 mM Glucose im Blut gemessen werden. Normalerweise liegt der Blutglucosespiegel bei etwa 5-7 mM. Zu den Hauptmechanismen, die zu einer solchen Deregulation des Glucose-spiegels im Blut führen, gehören Störungen im Stoffwechsel des Hauptregulations-hormons für den Glucosstoffwechsel, des Insulins. Die am häufigsten auftretenden Störungen beinhalten hierbei sowohl den absoluten Insulinmangel, bei dem kein Insulin mehr im Körper zur Verfügung steht, den relativen Insulinmangel, bei dem die Insulinmenge aus verschiedensten Gründen nicht ausreicht, um die vorhandene Glucose im Blut zu verstoffwechseln als auch die Insulinresistenz, bei welcher sogar meist zu viel Insulin zur Verfügung steht, dieses aber vom Körper nicht genutzt werden kann. Die Diabetesprävalenz liegt in Deutschland etwa bei 9 % mit steigender Tendenz. Das bedeutet, dass alleine in Deutschland über 7 Millionen Menschen an Diabetes erkrankt sind. Man spricht von einer epidemieartigen Ausbreitung besonders in der gesellschaftlichen Unterschicht der westlichen Industrienationen, neuerdings aber auch beispielsweise in Ländern der Dritten Welt, wo sich westliche Ernährungsformen durchsetzen, die als eine der Hauptursachen für das Ausbreiten des Diabetes Mellitus gelten [14].

1.2.1 Typ 1 Diabetes Mellitus

Der Typ 1 Diabetes Mellitus (T1DM) ist durch eine komplette Zerstörung der β -Zellen durch das körpereigene Immunsystem auf Grund einer Entzündungsreaktion gekennzeichnet und führt zu einem absoluten Insulinmangel. Dadurch steigt die Glucosekonzentration im Blut sehr stark an, gleichzeitig kommt es aber durch fehlende Aufnahme von Glucose in die Zellen zu intrazellulärem Substratmangel [15]. Der T1DM gehört zu den Autoimmunerkrankungen. Als Ursache werden genetische Mutationen im Bereich der Major Histocompatibility Complex (MHC) Proteine diskutiert, als auch virale Ursachen wie Röteln-, Cytomegalievirus- oder Herpesinfektionen und Umwelttoxine [16–18].

1.2.2 Typ 2 Diabetes Mellitus

Mit 90 % der Diabetesfälle stellt der Typ 2 Diabetes Mellitus (T2DM) weltweit den größten Anteil der Diabetesfälle dar. T2DM, früher auch oft als Altersdiabetes betitelt, stellt einen Teil des Metabolischen Syndroms dar und charakterisiert sich durch Insulinresistenz und β -Zellfunktionsstörungen mit β -Zelluntergang, welche zu relativem, als auch absolutem Insulinmangel führen können [19–23]. Die Insulinresistenz entwickelt sich hierbei meist als erstes Symptom, kann jedoch vom Körper noch eine Weile durch Steigerung der β -Zellmasse und -funktion kaschiert werden, sodass die Diagnose der Krankheit meist erst verzögert gestellt wird, wenn die Kompensationsmechanismen nicht mehr aufrechterhalten werden können, da die β -Zellen schon stark geschädigt sind [24].

Meist geht der T2DM mit Adipositas, ausgelöst durch westlichen Lebensstil mit hyperkalorischer Ernährung und Bewegungsmangel einher, wobei es nicht zwingend durch die Entwicklung eines Übergewichts zu T2DM kommen muss. Genetisch bedingte Prädisposition durch Zugehörigkeit zu bestimmten ethnischen Gruppen oder bestimmte Gendefekte und auch weibliches Geschlecht stellen Risikofaktoren für die Entwicklung eines T2DM dar [25, 26]. Beispiele für ausschließlich genetisch bedingte Varianten des T2DM sind Mutationen im Cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKN) 2A- und CDKN2B- Gen, die zu reduzierter β -Zellmasse und somit verminderter Insulinsekretion führen, sowie auch Veränderungen in Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11 (KCNJ11), welche die Funktion der Inselzellen massiv beeinträchtigen und so zu T2DM führen. Mutationen in Calpain 10 (CAPN10), Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) und IRS1 gelten ebenfalls als Risikofaktor für die Entwicklung von T2DM [27, 28]. In einer Studie mit Mutanten des Hepatocyte nuclear factor (HNF) Gens, einer mit T2DM assoziierten Mutation, konnte zudem gezeigt werden, dass es zu stark erhöhten Apoptoseraten im Zuge einer Absenkung der Akt-Phosphorylierung in β -Zellen kommt, wenn die Mutante exprimiert wird [29].

Beim T2DM tritt als erstes Phänomen die Insulinresistenz auf, welche meist mit Übergewicht und Hypertriglyceridämie einher geht [30, 31]. Die Insulinresistenz definiert sich als ein Zustand, in dem die im Körper ausgelösten Effekte des Insulins nicht mehr zur Glucoseverwertung und zur Unterdrückung der endogenen, hepatischen Gluconeogenese ausreichen [32]. Als Ursachen für die Insulinresistenz werden eine verminderte Insulinrezeptorkonzentration, eine verminderte Kinaseaktivität am

IR, eine Reduktion von IRS1/2 und Blockade der PI3K- Signalkaskade durch freie Fettsäuren wie Palmitat und aus Adipozyten freigesetzte Adipozytokine wie TNF α diskutiert [33–35]. In Folge kommt es zu Hyperinsulinismus als Kompensationsmechanismus zu der Insulinresistenz und gleichzeitig zur Hyperglykämie auf Grund der fehlenden Insulinwirkungen in Muskeln und Leber.

Diese Hyperglykämie führt zusammen mit den erhöhten freien Fettsäuren (FFA) als Gluco-Lipo-Toxizität zu β -Zellschädigungen, β -Zellfunktionsstörungen und zur Abnahme der β -Zellmasse, was im Endeffekt auch in das Krankheitsbild des absoluten Insulinmangels mit β -Zellverlust münden kann [36–38]. Die Abnahme der β -Zellmasse und die β -Zellfunktionsstörungen, beispielsweise durch Störung des PI3K-Signalwegs, stellen hierbei zusätzlich zur Insulinresistenz, den zweiten kritischen Schritt in der Entstehung des T2DM dar.

Die Glucotoxizität wird auf erhöhte Glucosespiegel zurückgeführt, welche durch die auch in der β -Zelle stattfindende Glykolyse natürlicherweise zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beitragen. Diese werden normalerweise durch Enzyme wie Katalase und Superoxiddismutase eliminiert, allerdings besitzen β -Zellen extrem wenige dieser Enzyme und sind so bei chronisch erhöhter Glykolyserate besonders anfällig für ROS-ausgelöste Zellschädigungen und Apoptose [39].

Palmitat, eine ungesättigte FFA, ist ebenfalls in der Lage, bei vermehrtem Auftreten im Blut über gesteigerte Bildung von ROS β -Zellschädigungen hervorzurufen [40]. Durch FFA hervorgerufene β -Zellschädigungen werden als Lipotoxizität bezeichnet. Durch erhöhte FFA-Spiegel treten im Zuge der Lipotoxizität unter anderem eine Inhibition der PI3K- und Akt-Aktivität, erhöhte Apoptoseraten und eine Erhöhung der Glucoseproduktion in der Leber auf [41]. Auch besteht eine direkte Korrelation zwischen erhöhten FFA- Spiegeln und Insulinresistenz [42].

Auch durch erhöhte Ausschüttung von Zytokinen wie TNF α aus dem Fettgewebe kann das Überleben und die Funktion der β -Zellen durch Apoptoseinduktion und Beeinträchtigung des Insulinsignalwegs maßgeblich vermindert werden [43].

Besonders die korrekte Funktion des Insulinsignalwegs innerhalb der β -Zelle ist für das Überleben der β -Zelle und die zuverlässige Bereitstellung des Insulins entscheidend, da durch den Insulinsignalweg sowohl die β -Zellmasse als auch die β -Zellfunktion maßgeblich gesteuert werden [44]. Zudem ist in Mäusen, die eine dominant negative Form von Akt1 exprimieren und somit eine Funktionsstörung im

Insulinsignalweg aufweisen eine direkte Korrelation mit einem erhöhten Diabetesrisiko bei stark fetthaltiger Diät nachgewiesen [45].

1.2.2.1 Die Rolle von Palmitat und Sphingolipiden im Krankheitsbild des T2DM

Der westliche Ernährungsstil und das immer häufiger vorkommende Übergewicht gehen Hand in Hand mit erhöhten freien Fettsäuren im Blut der Menschen [46]. Diese freien Fettsäuren gelten als einer der Hauptmediatoren von β -Zelldysfunktion und β -Zellverlust in der Progression des T2DM und hohe Spiegel an FFA an sich stellen einen entscheidenden Risikofaktor für die Entwicklung des T2DM dar [47–49]. Palmitat stellt dabei knapp vor Oleat die häufigste Fettsäure in Nahrung und Körper dar, spielt in ihrer Häufigkeit aber eine janusköpfige Rolle in seinem Einfluß auf die β -Zelle [50].

Eine akute, kurzzeitige Stimulation mit Palmitat ist vorteilhaft für die β -Zelle: die Insulinsekretion wird stimuliert, überlebenswichtige Signalwege werden angestoßen [51, 52]. Kommt es allerdings zu einer chronischen Langzeitstimulation mit hohen Palmitatspiegeln, so sind β -Zellfunktionsstörungen und Apoptose die Folge [53, 54]. Diese verheerenden Wirkungen werden hauptsächlich über eine Beeinflussung des Insulinsignalwegs und akuten Streß am ER vermittelt, mit welchem die β -Zelle, wie schon erwähnt, besonders schlecht umgehen kann [55]. Eine Hemmung der überlebenswichtigen Akt-Kinase durch erhöhte Palmitatspiegel und somit eine Beiteiligung am Krankheitsbild der Insulinresistenz wird beispielsweise aus Hepatozyten, C2C12 Muskelzellen und auch MIN-6 β -Zellen berichtet [56–58].

Jedoch kann die Insulinresistenz nicht nur durch Palmitat alleine, sondern auch durch die daraus gebildeten Metabolite vermittelt werden. So ist beispielsweise aus Leber- und Muskelzellen bekannt, dass Palmitat dosis- und zeitabhängig zu dem Sphingolipid Ceramid metabolisiert und in das Plasma sezerniert wird [59, 60]. Diese Ceramide akkumulieren in insulinresistenten Geweben und hemmen dort maßgeblich den Insulinsignalweg [61, 62]. Auch speziell aus den β -Zellen des Pankreas' ist diese Umwandlung bekannt, und eine erhöhte Ceramidproduktion führt dort außerdem zu gesteigerter Zellapoptose [63]. Jedoch ist aus der Insulinomzelllinie Ins1 auch ein Anstieg von Sphingoidbasenphosphaten nach Inkubation mit erhöhten Palmitatspiegeln bekannt [64]. Sphingoidbasenphosphate, allen voran das Sphingosin-1-phosphat (S1P), stellen im Vergleich zu den Ceramiden einen bedeutend kleineren

Anteil der Sphingolipide dar, besitzen aber zusätzlich sehr potente Funktionen als Rezeptorliganden und Second Messenger. Über die Rolle der Sphingoidbasenphosphate in Bezug auf Diabetes ist bisher nur sehr wenig bekannt.

1.2.2.2 Tiermodelle und Zelllinien

Da die Möglichkeiten für *in vivo* Untersuchungen mit humanen pankreatischen β -Zellen verständlicherweise sehr beschränkt sind und meist nur eine retrospektive Autopsie in Frage kommt, greift man oft auf geeignete Tiermodelle oder *in vitro* Studien an Zelllinien zurück. Die meisten Tiermodelle lassen sich dabei einteilen in solche, die spontan eine bestimmte Erkrankung entwickeln und solche, die durch Applikation bestimmter Substanzen (wie z.B. Alloxan oder Streptozotocin für Diabetes Mellitus) ein bestimmtes Krankheitsbild repräsentieren. Auf der Suche nach geeigneten Tiermodellen für T2DM erwies sich besonders die selektive Inzucht von Tieren mit T2DM-ähnlichem Phänotyp wie peripherer Insulinresistenz als geeignete Methode zur Etablierung bestimmter Modellstämme.

Besonders wichtig bei der Auswahl einer geeigneten Zelllinie für *in vitro* Versuche ist die Ähnlichkeit der Zelllinie zur nativen β -Zelle. Besonderes Augenmerk wird speziell bei β -Zellen auf die korrekte glucoseinduzierte Insulinsekretion gelegt.

Die NZO- Maus Bei der New Zealand Obese (NZO) Maus handelt es sich um einen Maus-Inzuchtstamm mit polygen bedingter Adipositas, Hyperphagie, Insulinresistenz, Dyslipidämie und Hypertonie [65]. Im Vergleich zu anderen Tiermodellen, die meist nur einen Aspekt des humanen T2DM repräsentieren, schließt dieser Mausstamm viele aus dem Menschen bekannte Symptome mit ein. Er wurde 1948 von M. und F. Bielschowsky an der Universität Otago gezüchtet und weist wesentliche metabolische Störungen sowohl im Kohlenhydrat- als auch im Lipidmetabolismus auf, die auf Veränderungen in sogenannten Quantitative Trait Loci zurückzuführen sind [66]. Interessant ist hierbei, dass die Defekte ziemlich genau die Schlüsselfunktionen in der Entstehung des humanen T2DM repräsentieren: eine unnormale Insulinsekretion nach Glucosestimulus, eine periphere Insulinresistenz, und eine gesteigerte und vermindert hemmbare

hepatische Gluconeogenese [67–69]. Eine Besonderheit des Mäusestammes liegt in der diätabhängigen Induzierbarkeit verschiedener Stoffwechsellagen [70]. So kann beispielsweise durch Fütterung einer Hochfettdiät bei diesen Mäusen in sehr kurzer Zeit der dem T2DM ähnliche Krankheitsverlauf induziert werden.

MIN-6 Zellen MIN-6 Zellen stammen aus dem Insulinom einer transgenen, „large T-antigen of SV40“-positiven Maus und stellen in Bezug auf Glucosemetabolismus und Insulinsekretion eine vergleichbare Alternative zu isolierten Inselzellen dar [71]. Da die Fähigkeit zur Insulinsekretion nach Glucosestimulation in MIN-6 Zellen nach Passage 22 sukzessive verloren geht, und die Zellen ab dieser Passage auch beginnen, ihre Proteinzusammensetzung zu verändern, sollte darauf geachtet werden, diese Zellen möglichst zwischen Passage 17 und 22 für Versuche zu benutzen, wenn eine Autostimulation mit Insulin durch Glucosezugabe erwünscht ist [72].

INS-1e Zellen INS-1e Zellen stellen eine von C. B. Wollheim und P. Maechler an der Universität Genf selektierte klonale Subzelllinie der sehr heterogenen INS-1 Zellen dar, die über lange Zeit stabil passagiert werden können. INS-1 Zellen wurden ursprünglich aus dem strahleninduzierten Insulinom einer Ratte isoliert, konnten aber nur über eine begrenzte Anzahl an Passagen in Kultur gehalten werden, bevor sie ihre Eigenschaften änderten. INS-1e Zellen wurden bisher bis Passage 116 kultiviert, und zeigten bis dahin keine Änderung in ihren den primären β -Zellen sehr ähnlichen Eigenschaften bezüglich Glucosemetabolismus und Insulinantwort [73].

1.3 Der programmierte Zelltod

Der programmierte Zelltod (PCD) ist ein vom Körper organisiert angestoßener Prozess, um Zellen aus Geweben zu entfernen; sei es, da diese alt, beschädigt oder entartet sind, oder da dies aus Gründen der Weiterentwicklung des Organismus, wie beispielsweise bei der embryonalen Organentwicklung nötig ist [74, 75].

Dabei lässt sich der PCD in die Apoptose und die Autophagie aufteilen. Die Einteilung erfolgt hierbei grob nach morphologischen Gesichtspunkten und dem auslösenden Signalweg [76].

Die Apoptose gilt als der wichtigste und am besten untersuchte Weg des PCD [77]. Durch Apoptose können Zellen ohne die Auslösung einer Entzündungsreaktion oder die Beeinflussung von Nachbarzellen aus Gewebsverbänden entfernt werden, da die Plasmamembran bis zum Ende der Apoptose intakt bleibt [78]. Wichtige Kennzeichen der Apoptose sind die Schrumpfung und Herauslösung der Zelle aus dem Zellverband und der stufenweise Abbau der Zelle über Degradierung der DNA und die Bildung kleiner Vesikel, so genannter „apoptotic bodies“, die von Makrophagen phagozytiert werden.

Im Gegensatz dazu ist die Autophagie ein Prozess, der meist bei Nährstoffmangel angestoßen wird, um nur einzelne Zellorganellen zur Rückgewinnung von Rohstoffen zu recyceln [79]. Autophagie kann aber auch genutzt werden, um in besonders stoffwechselstarken Zellen wie pankreatischen β -Zellen bestimmte Zellorganellen wie beispielsweise Mitochondrien zu erneuern [80]. Die zu degradierenden Zellorganellen werden dabei in doppelmembranhaltige Vesikel, so genannte Autophagievakuolen, eingeschlossen und nach der Verschmelzung mit Lysosomen innerhalb der intakten Zelle degradiert [81]. Bei Überaktivierung kann eine Zelle allerdings auch durch Autophagie getötet werden [82].

Davon abzugrenzen ist die Nekrose oder auch Oncose, die im Gegensatz zum PCD keine Energie verbraucht. Geht eine Zelle nekrotisch zu Grunde, so kommt es nach Anschwellen der Plasmamembran zu einer Fragmentierung selbiger und der Zellinhalt wird in den Extrazellularraum freigesetzt, was eine lokale Entzündungsreaktion nach sich zieht. Dieser Vorgang betrifft meist größere Zellverbände bis hin zu ganzen Geweben. Auslöser der Nekrose sind äußere Einflüsse wie Toxine, Infektionen oder auch Hitze und Kälte [83].

Im folgenden soll besonders auf die Apoptose näher eingegangen werden, da Dysregulationen in der Apoptosekontrolle eine große Rolle bei der Krebsentstehung spielen aber auch bei Krankheiten wie T2DM als kritischer Faktor gelten, da diese unter anderem durch einen übermäßigen Untergang insulinproduzierender Zellen gekennzeichnet sind [74, 84].

1.3.1 Die Apoptose

Die erste Beschreibung eines morphologisch der Apoptose zuzuordnenden Prozesses findet sich 1842 von Carl Vogt bei der Beobachtung der Kaulquappenentwicklung der

Geburtshelferkröte [85]. Weiterhin wurde 1965 von Lockshin ein ähnlicher Mechanismus bei der Verpuppung und Metamorphose der Seidenmotte beschrieben [86]. 1972 wurde der Prozess das erste Mal mit dem griechischen Wort *Apoptose* bezeichnet, in Anlehnung an fallende Blätter im Herbst [87].

Aus den oben genannten ersten Beschreibungen der Apoptose lässt sich schon ihre Hauptaufgabe als Steuerungsmechanismus in der embryonalen Entwicklung und in der Gewebshomöostase des lebenden Organismus' ableiten. Durch Apoptose können sowohl schädliche, entartete oder alte Zellen ohne Schädigung des umliegenden Gewebes entfernt werden, Zellverbände wie zum Beispiel im Riechepithel erneuert werden oder auch Gewebestrukturen geformt und erhalten werden, wie beispielsweise in der Hirn- oder Extremitätenentwicklung und bei der Kontrolle der Größe von Geweben im adulten Organismus [88]. Die Wichtigkeit der Apoptose wird deutlich, wenn man bedenkt, dass ein Organismus ohne das kontrollierte Entfernen von Zellen im Laufe seines Lebens 2 Tonnen Knochenmark und Lymphgewebe sowie 16 Kilometer Darmepithel produzieren würde [89]. Ein ungenügender Zelltod durch Defekte im Apoptosesignalweg oder durch Mutationen in den die Apoptose kontrollierenden B-Cell Lymphoma 2 (Bcl2) Proteinen liegt vielen Krebserkrankungen zu Grunde [90].

In der Zellkultur ist zu beachten, dass durch das Fehlen von Phagozyten der Abbau der Zellvesikel nach erfolgreicher Apoptose nicht erfolgen kann, und es folglich durch Freisetzung des Zellinhalts anschließend zu nekrotischem Zelluntergang kommen kann [91].

1.3.2 Der apoptotische Signalweg

Die zentrale Rolle im apoptotischen Signalweg stellen die Caspasen dar. Sie werden auch als Exekutoren des Zelltods bezeichnet, da alle Apoptosesignale am Ende auf eine Aktivierung von Caspasesignalkaskaden hinauslaufen. Bei den Caspasen handelt es sich um cysteinabhängige, Aspartat-spezifische Proteasen, die eine Cystein-haltige Seitenkette besitzen, mit Hilfe derer sie Aspartat-haltige Proteinsubstrate spalten können [92]. Aktiviert werden können die Caspasen über zwei verschiedene Wege, die sich in ihrer Initiationsphase unterscheiden: den extrinsischen und den intrinsischen Signalweg [93].

Der extrinsische Signalweg zeichnet sich durch Rezeptor-Ligand-Mechanismen aus, und wird durch ellloberflächengebundene Todesrezeptoren der TNF-Rezeptorfamilie

wie Fas und TNF-Rezeptor 1 vermittelt [94]. Bindet ein Ligand, wie der auf der T-Zelloberfläche vorkommende FasLigand oder das Zytokin $\text{TNF}\alpha$ an die Todesrezeptoren, so findet intrazellulär eine Trimerisierung von Todesdomänenhaltigen Proteinen wie Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein (TRADD) mit der Todesdomäne des Todesrezeptors und weiteren Effektorproteinen wie Fas-associated protein with death domain (FADD) statt [95]. FADD besitzt im Gegensatz zu TRADD eine Todeseffektordomäne (DED), welche Procaspasen wie Caspase 8 / 10 binden kann und zur Ausbildung des Death inducing signalling complex (DISC) führt [96]. Im DISC findet die proteolytische Spaltung der Procaspasen zu den aktiven Initiatorcaspasen statt [97]. Diese wiederum aktivieren die Effektorcaspasen, zu welchen beispielweise Caspase 3 / 7 gehören [98].

Bemerkenswert ist, dass TRADD über eine Aktivierung von TNF receptor-associated factor (TRAF) oder Receptor interacting protein (Rip) auch antiapoptotisch wirken kann [99].

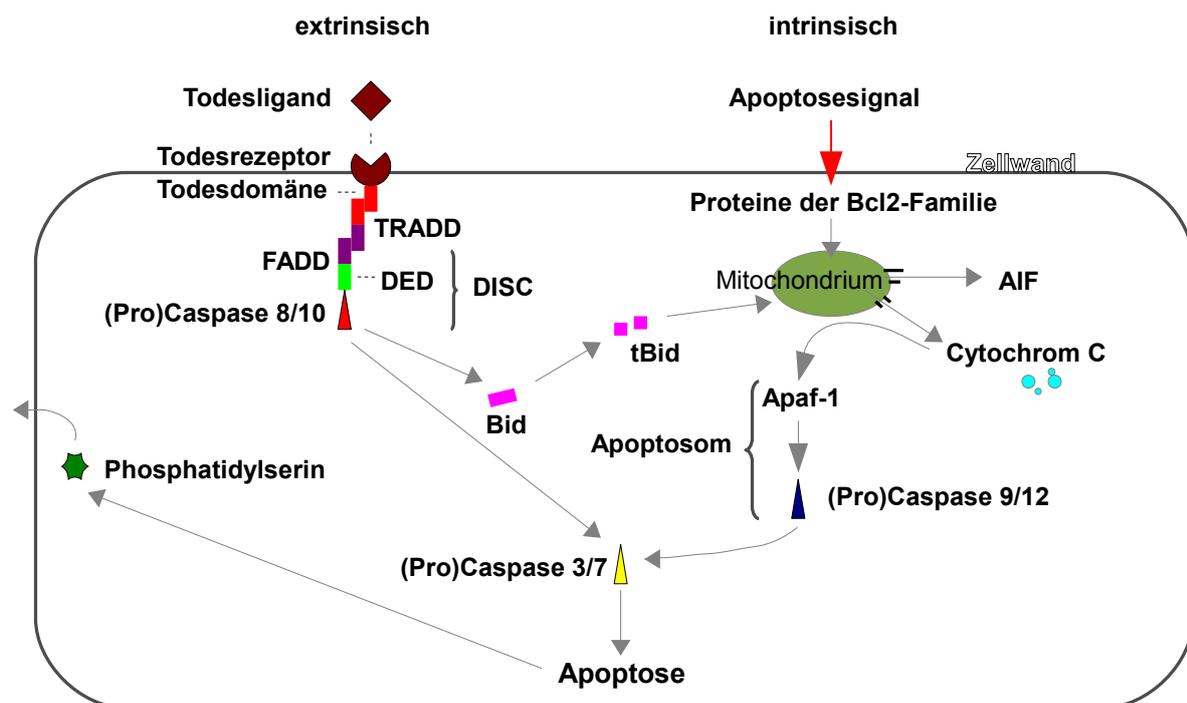


Abbildung 1.3.1: Schematische Darstellung der Apoptosesignalwege.

Der intrinsische Signalweg läuft beispielsweise nach Erbgutschädigung durch Strahlung, Calcium-Hyperpolarisation, Glucosemangel, Stickstoffmonoxid (NO)-Bildung

oder Hypoxie über ER- Streß ab, und beinhaltet nach Anstieg des Mitochondrienpotentials und Bildung einer Pore in der Mitochondrienmembran durch Beteiligung von Proteinen der Bcl2 Familie oder auch p53 die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien [100–102]. Cytochrom C führt zur Ablösung von Apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1) vom Mitochondrium und Bildung des Apoptosoms, welches einen Komplex aus Apaf-1 und Procaspase 9 / 12 darstellt [101, 103]. Im Apoptosom wird die Caspase 9 / 12 aktiviert und führt zur nachgeschalteten Aktivierung der Effektorcaspasen 3 / 7 [104]. Zusätzlich zur Bildung des Apoptosoms kann nach Aktivierung des intrinsischen Signalwegs aber auch Apoptosis inducing factor (AIF) aus dem intermembranären Raum der Mitochondrien freigesetzt werden, welches nach Translokation in den Nukleus zur Defragmentierung und dementsprechend zum Abbau der DNA führt [105].

Eine Verbindung von extrinsischem und intrinsischem Signalweg wird über das proapoptische Bcl2- Familienprotein BH3 interacting death domain (Bid) hergestellt [106]. Bid kann durch Caspase 8 im extrinsischen Signalweg in truncated Bid (tBid) gespalten werden, transloziert dadurch zum Mitochondrium und veranlasst dort die Freisetzung von Cytochrom C [107]. Aber auch andere Bcl2- Familien- Proteine können, sogar teilweise noch vor der Aktivierung von Caspasen oder der Freisetzung von Cytochrom C, in die Apoptosesignalkaskade eingreifen, und werden deshalb auch als Oncogene eingestuft [108]. Zu diesen antiapoptotischen Oncogenen zählt beispielsweise das Bcl2 selbst sowie auch B-Cell Lymphoma extra large (Bcl_{XL}) und Induced myeloid leukemia cell differentiation protein (Mcl-1). Bcl-2-associated X protein (Bax), Bcl-2 homologous antagonist/killer (Bak), Bcl-2-associated death promoter (Bad) und Bid zählen zu den pro-apoptotischen Mitgliedern der Bcl2-Proteinfamilie [109]. Bemerkenswert bei den Bcl2-Proteinen ist, dass sie stark zur Heterodimerisierung neigen und somit eine Fülle von Kontrollpunkten im Apoptosesignalweg bereitstellen. Bcl2, als prominentester, antiapoptotischer Vertreter der Familie, aber auch Bcl_{XL} können beispielsweise durch Heterodimerisierung mit Bax, Bad oder Bid diese inhibieren und somit apoptotische Signale stoppen [110]. Andererseits kann das antiapoptotische Bcl2 auch von proapoptotischen Vertretern der Familie, wie Bax, gehemmt werden. Ob tatsächlich eine Apoptoseauslösung in einer Zelle zu Stande kommt, hängt also entscheidend von den jeweiligen Verhältnissen der Bcl-Proteine zueinander ab und ist kein Weg ohne Umkehrmöglichkeit [111, 112].

Dem extrinsischen und intrinsischen Signalwegen gemeinsam ist, dass nach Aktivierung der Effektorcaspasen eine Fragmentierung der Zelle einsetzt, und das nor-

malerweise durch Flippase an der Innenseite der Zellmembran gehaltene Phosphatidylserin durch caspaseinitiierte Inhibition der Flippase auf der Zellaussenseite präsentiert wird [113]. Das Phosphatidylserin wird von Phosphatidylserinrezeptoren auf Makrophagen erkannt, und die Zelle wird phagozytiert [114]. Anzumerken ist allerdings, dass neben dem Phosphatidylserinsignalweg auch noch andere Signalwege wie zum Beispiel über Scavenger Rezeptoren oder Oberflächenmarker wie CD36 und CD14 zur Erkennung und Phagozytose apoptotischer Zellen führen können.

1.3.3 Die Bedeutung der Apoptose in pankreatischen β -Zellen

Wie schon erwähnt, spielt die Apoptose eine entscheidende Rolle in der embryonalen Organentwicklung. Auch für die Strukturierung des Pankreas' in der Entwicklung des Menschen ist die Apoptose unersetzlich, und Defekte im Apoptoseprogramm können zu schwerwiegenden Krankheiten des Insulinstoffwechsels wie *Hyperinsulinism of infancy* führen [115]. Aber auch im adulten Pankreas können Veränderungen im Apoptoseprogramm zu Krankheiten wie Diabetes Mellitus führen. Beim Diabetes Mellitus führt eine erhöhte Apoptose der β -Zellen des Pankreas' zu Insulinmangel und zum Krankheitsbild der Blutglucoseregulation. In diesem Zusammenhang wurde sowohl für T1DM als auch für T2DM ein β -Zellverlust durch extrem erhöhte Apoptoseraten im Pankreas als ursächlich nachgewiesen [116]. Beim T1DM spielt besonders der extrinsische Signalweg über die Aktivierung von Todesrezeptoren nach Stimulation durch T-Zellen eine Rolle, da es sich bei diesem Typ um eine Autoimmunerkrankung handelt, in deren Verlauf es zu einem kompletten Verlust der β -Zellen kommt [117]. Jedoch geht auch die Progression des T2DM mit einem langsamen Verlust der β -Zellen durch erhöhte Apoptoseraten einher [84, 118]. Hierbei wird sowohl eine Apoptoseinduktion über aus dem Fettgewebe durch chronische Entzündungsmechanismen freigesetztes TNF α als auch eine durch ER- Stress ausgelöste, über das Protein C/EBP homologous protein (CHOP), NO und ROS vermittelte Apoptoseinduktion diskutiert [119–121]. β -Zellen sind durch ihre hohe ER- Aktivität bei der Produktion des Insulins besonders anfällig für durch ER- Stress ausgelöste Apoptose [122]. Als Auslöser des apoptotischen ER- Stresses gelten erhöhte Konzentrationen an Glucose und FFA wie Palmitat in den β -Zellen von Patienten mit T2DM. Zudem wurde eine Beeinflussung des Bcl2 / Bax- Gleichgewichtes zugunsten des proapoptoti-

schen Bax, und eine vermehrte Aktivierung von Bad und Bid durch erhöhte Glucose- und Fettsäurekonzentrationen bewiesen, und auch eine erhöhte Aktivität der Caspasen 3 und 8 konnte in Patienten mit T2DM nachgewiesen werden [119, 123, 124].

In der Zucker Diabetic Fat (ZDF) Ratte, einem Modelltier für übergewichtsassozierten T2DM, führt die intrazelluläre Akkumulation freier Fettsäuren zu einem Anstieg der DNA-Fragmentierung und der Apoptose, was von der Arbeitsgruppe auf einen Anstieg der intrazellulären Ceramidspiegel zurückgeführt wurde [125].

Besonders die durch eine Überakkumulation von Glucose und freien Fettsäuren in den β -Zellen ausgelöste Apoptose kann allerdings durch Aktivierung der Akt-Kinase positiv beeinflusst werden und somit die Apoptose und sogar die diabetische Stoffwechsellage verhindert werden [126].

1.3.4 Die Bedeutung der Apoptose in Keratinozyten

Die Apoptose stellt in der Haut, und besonders in den Keratinozyten als verhornenden Zellen des Stratum Corneum, einen entscheidenden Faktor in der Regulation der Hautbeschaffenheit dar. Für die Verhornung und Bildung des Stratum Corneum ist eine Umwandlung der Keratinozyten in Korneozyten durch terminale Differenzierung notwendig, welche durch ein Apoptosesignal unterbrochen werden kann [127]. Bei Auslösung eines Apoptosesignals werden die apoptotischen Zellen aus dem Gewebsverband eliminiert und stehen so nicht mehr für die Bildung der Hautbarriere zur Verfügung. In verschiedenen Erkrankungen der Haut, die mit Verhornungsstörungen verknüpft sind, wie der Psoriasis, der Sklerodermie oder auch beim Hautkrebs konnte eine veränderte Regulation der Apoptose beobachtet werden [128, 129]. Des Weiteren nimmt die Apoptose auch eine wichtige Rolle in der Kontrolle und Eliminierung geschädigter Zellen nach UV-Exposition ein. So stellen die sogenannten *sunburn cells*, die nach übermäßiger UV-Einstrahlung auftreten, nichts anderes als apoptotische Zellen dar [130].

In der Wundheilung nimmt die Apoptose als Gegenspieler der zur Schließung der Wunde wichtigen Proliferation ebenfalls einen zentralen Platz ein. Hier spielen besonders die Expression der Proteine Bcl2, Bax und des Tumorsuppressors p53 eine Rolle [131]. In Studien mit antiapoptotisch wirksamen Substanzen konnte eine positive Auswirkung auf die Wundheilung beobachtet werden [132–134].

1.4 Die Proliferation

Die Zellproliferation stellt zusammen mit der Apoptose einen der wichtigsten Regulationsmechanismen für die Gewebshomöostase dar. Sie lässt sich in die beiden Unterabschnitte Zellwachstum und Zellteilung differenzieren [135]. Das Zellwachstum wird durch den Zellzyklus gesteuert, welcher sich als der Zeitraum zwischen zwei mitotischen Zellteilungen definieren lässt.

Die Cykline und die von ihnen abhängigen Cyclinabhängigen Kinasen (CDK) sind die zentrale Regulatoren des Zellzyklus'. Für ihre Entdeckung wurde den Forschern Hartwell, Hunt und Nurse 2001 der Nobelpreis verliehen. CDKs werden konstitutiv während des ganzen Zellzyklus' gebildet, werden aber nur in bestimmten Phasen durch die korrespondierenden Zyklone bei Dimerisierung an ihrer Kinasefunktion aktiviert [136]. Dabei bilden die Zyklone die regulatorische Untereinheit, welche die CDK als katalytische Untereinheit kontrollieren [137]. Die Zyklone werden speziell an Kontrollpunkten der Wachstumsphase synthetisiert und steuern sowohl die CDKs als auch deren Inhibitoren, die CDKI. CDKI wie beispielsweise p21, p27 oder p57 werden verstärkt gebildet, wenn die Zelle nicht weiter in den Zellzyklus eintreten soll. Sie binden direkt an Zyklone und verhindern so durch katalytische Inaktivierung das Fortschreiten der Proliferation. Sie stehen häufig am Ende langer Signalkaskaden, welche die Zellproliferation steuern. Besonders wichtig sind in diesem Zusammenhang die CDKI der CDK-inhibiting protein/ Kinase Inhibiting Protein (Cip/Kip)- Familie, welche universelle Inhibitoren der Zyklin-CDK-Komplexe darstellen. Ihre wichtigsten Vertreter sind p21Waf1/Cip1 und p27Kip1 [138]. Interessant ist, dass bei erfolgreicher Auslösung eines Proliferationssignals die CDKI auch von CDKs ubiquitiniert und somit für den Abbau markiert werden können.

Eine bedeutende Regulation erfährt der Zellzyklus auch durch bestimmte Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (Myc) oder die E2F-Familie, welche als bedeutende Modulatoren der Cyklone, CDKs und Checkpointproteine im Übergang von der G1 in die S-Phase gelten [139, 140]. Die E2F- Transkriptionsfaktoren werden von Retinoblastom Family Proteinen reguliert und gliedern sich sowohl in Aktivatoren als auch Suppressoren der Proliferation

[141, 142].

p53, ein Tumorsuppressor, kann als Transkriptionsfaktor sowohl Apoptoseproteine wie Bax als auch den CDKI p21 transaktivieren, und somit die Proliferation verhindern [143].

1.4.1 Die Bedeutung der Proliferation in pankreatischen β -Zellen

Untersuchungen in Mäusen zeigen eine deutliche Beteiligung der Proliferation an der Regulation der β -Zellmasse in adulten Tieren [144]. Eine besonders große Rolle spielt die Proliferation in der embryonalen und auch postnatalen Entwicklung des Pankreas' [145–147].

Die β -Zellmasse kann sich aber auch im adulten Zustand als Kompensationsmechanismus durch Faktoren wie Übergewicht, periphere Insulinresistenz oder Schwangerschaft noch stark erhöhen [148–150]. Diese Veränderung in der β -Zellmasse konnte auf erhöhte Proliferation und erhöhtes Zellwachstum zurückgeführt werden, und sie wird als eine der wichtigsten Quellen für neue β -Zellen in erwachsenen Mäusen gesehen [151–153]. Beim Menschen ist die β -Zellproliferation im adulten Stadium im Vergleich zu Mäusen verlangsamt, und man ist sich bezüglich des Ursprungs der neu gebildeten β -Zellen unschlüssig [154]. In Frage kämen sowohl Proliferation aus ausdifferenzierten β -Zellen als auch Neogenese aus Stammzellen. Sicher ist, dass nach partieller Pankreatektomie zumindest bei Ratten neue β -Zellen aus den übriggebliebenen Zellen durch mitotische Teilung nachgebildet werden können [155].

Bei Veränderungen der β -Zellmasse wie beispielsweise bei einer Abnahme der β -Zellmasse beim T2DM spielt eine verminderte Proliferationsrate eine entscheidende Rolle. Ein Hauptforschungsgebiet bezüglich der β -Zellproliferation stellt der Anstoß zum Übergang der β -Zellen von der G1 in die S-Phase dar [156]. Hierzu wurden unter anderem Versuche mit Cyklin-D-überexprimierenden Zellen gemacht, welche eine extrem erhöhte Proliferationsrate besaßen [157, 158]. Bei Ausschaltung bestimmter Cykline oder CDKs wie Cyklin E und CDK2 in β -Zellen kam es dagegen zu einem vollständigen Stillstand der Proliferation [159]. E2F1^{-/-}- Mäuse zeigen einen diabetischen Phänotyp mit verminderter β -Zellmasse durch stark

gehemmte Proliferation und dementsprechend verminderter Insulinsekretion [160]. Die CDKI P19ink4d und p27Kip1/2 wurden als verantwortliche Regulatoren für den Rückgang der β -Zellproliferation im Erwachsenenalter identifiziert [161, 162]. P19ink4d^{-/-}- Mäuse zeigen dementsprechend eine stark erhöhte Proliferationsrate [163].

Ligandenbindungen an Rezeptoren, welche den IRS1/2- Signalweg oder den PI3K / Akt- Signalweg aktivieren, sind für die β -Zellproliferation äußerst wichtig [159, 164]. Hierbei wurde Insulin als ein entscheidender Faktor in der β -Zellproliferation identifiziert [165]. Bei Bindung von Insulin an den IR und nachgeschaltete Aktivierung des Akt- Signalwegs kommt es unter anderem zu einer Herunterregulation des CDKI p27Kip1, sowie zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors FoxO1 und dementsprechend zu einer Steigerung der β -Zellproliferation [166–168]. IR^{-/-}-Mäuse zeigen eine stark verminderte Inselgröße und eine stark gestörte Glucosetoleranz [44]. Weitere Studien mit IRS1/2^{-/-}-Mäusen unterstreichen die Wichtigkeit des Insulinsignalwegs in der β -Zellproliferation, da es auch hier durch die Ausschaltung des Proteins zu erheblichen Störungen der Inselgröße und des Glucosestoffwechsel kam [150, 169]. Glucose kann über die nachgeschaltete Insulinausschüttung und damit die autokrine Stimulation der β -Zellen ebenfalls proliferationsfördernd wirken, allerdings kommt es hierbei stark auf die Glucosekonzentration und die Dauer der Stimulation an [164, 170]. Lang andauernde Stimulation von β -Zellen mit hohen Glucosekonzentrationen senkte die Proliferationsrate und erhöhte die Apoptoserate in den Inseln eines diabetischen Gerbils [171].

1.5 Die Akt-Kinase

Die Akt-Kinase, oder auch Proteinkinase B, ist eine Phosphoryltransferase, die eine Phosphatgruppe eines Donors, meist ATP, auf die Seitenkettenhydroxylgruppe der Aminosäuren Serin oder Threonin überträgt. Voraussetzung für die Übertragung einer Phosphatgruppe durch die Akt ist das Vorhandensein des zu phosphorylierenden Serins oder Threonins in der Konsensussequenz R/K-X-R/K-X-X-S/T am Zielprotein [172].

Durch die Akt-Kinase werden im Rahmen des PI3K/Akt/mTOR- Signalwegs un-

ter anderem der Glucosemetabolismus, die Apoptose, die Zellproliferation, die Transkription und die Zellmigration gesteuert [173].

Die Akt-Kinase ist strukturell stark mit den Proteinkinasen A und C verwandt, und wurde 1991 auf der Suche nach strukturhomologen Enzymen zu PKA und PKC entdeckt [174].

Zeitgleich identifizierte eine andere Arbeitsgruppe das virale Pendant der Akt-Kinase als onkogenen Faktor in dem Retrovirus Akt8, der aus Thymomzellen der Mauslinie „AKR“ isoliert wurde, die zu spontanen Thymuslymphomen neigt [175]. Die daraufhin klonierte humane Form desselben Proteins wurde dementsprechend „v-Akt murine thymoma viral oncogene homolog 1“, kurz „Akt1“ genannt [176].

Inzwischen wurden drei verschiedene Isoformen der Akt-Kinase identifiziert, die als Akt1-3 bezeichnet werden.

Akt1, als die am häufigsten vorkommende Isoform der Akt-Kinase [177], steuert Überlebenssignalwege in der Zelle durch Unterdrückung apoptotischer Prozesse und steigert über Beeinflussung der Zellzyklusphasen und der Proteinsynthese das Gewebewachstum. Akt1 spielt eine besonders wichtige Rolle in der Proliferation, der Apoptose, der Krebsentstehung und bei Krankheiten wie dem Proteus- Syndrom, einer Punktmutation im Akt1-Gen, die durch ein krankhaft übersteigertes Zellwachstum ausgezeichnet ist [178]. Akt1^{-/-}-Mäuse zeigen ein vermindertes Größenwachstum [177].

Akt2 ist ein wichtiges Enzym des Insulinsignalwegs. Es steuert unter anderem den Glucosetransport über Regulation des Glucosetransporters GLUT4 und steigert durch inhibitorische Phosphorylierung von GSK-3 die Glykogensynthese [179, 180]. Akt2^{-/-}-Mäuse zeigen einen diabetischen Phänotyp, geprägt durch starke Insulinresistenz [181, 182].

Akt3 wird vorwiegend im Gehirn exprimiert. Akt3^{-/-}-Mäuse zeichnen sich durch ein stark vermindertes Hirnwachstum aus [183].

1.5.1 Die Aktivierung der Akt-Kinase

Die Aktivierung der Akt-Kinase erfolgt klassischerweise über einen mehrstufigen Prozess nach Aktivierung der PI3K, die an Wachstumsfaktorrezeptoren gekoppelt ist [184]. Einen der Hauptinduktoren der PI3K-Kaskade stellt das Hormon Insulin dar. Wird die PI3K durch Rezeptortyrosinkinasen oder GPCRs aktiviert, so generiert diese die für die Akt-Aktivierung wichtigen Phosphatidylinositiden Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2) und Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (PIP_3), welche mit hoher Affinität an die N-terminale Pleckstrin Homologie (PH) Domäne der Akt binden können und diese damit aus dem Zytosol zur Plasmamembran rekrutieren und voraktivieren [185–187]. Diese Voraktivierung stellt den kritischen Schritt in der Akt-Aktivierung dar, mit welchem die Phosphorylierung der Akt durch PDKs erst ermöglicht wird [188]. An der Plasmamembran bildet sich durch Konformationsänderung ein Komplex aus der Akt, dem an die PH-domäne gebundenen PIP_2/PIP_3 und den PIP_3 -abhängigen Kinasen PDK1 und PDK2, welche die Akt an Threonin308 in der T-Schleife der zentralen Kinasedomäne und an Serin473 in der C-terminalen, regulatorischen Domäne aktivieren [9, 189–192]. Die aktivierte Akt kann nun nach Lösung von der Zellmembran durch ihre Kinaseaktivität nachgeschaltete Substrate wie z.B. Mammalian Target of Rapamycin (mTOR), MAPK oder Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK-3) phosphorylieren und damit aktivieren oder inaktivieren [193]. Die Aktivität der Akt-Kinase kann über die Menge an vorhandenem PIP_2/PIP_3 eng durch den Gegenspieler der PI3K, die Phosphatase and Tensin homolog (PTEN) kontrolliert werden, welche die Akt- rekrutierenden Phosphatidylinositolderivate dephosphorylieren kann und somit einen Verbleib der inaktiven Akt-Kinase im Cytosol bewirkt. Bei Mutationen oder Fehlfunktionen der PTEN kann es zu unkontrolliertem Zellwachstum kommen, weshalb dieser Faktor auch als Tumorsuppressor bezeichnet wird [194–196].

Eine Beeinflussung der PIP_3 -Spiegel kann auch durch Mitglieder der Src homology-2 domain-containing inositol polyphosphate 5'- phosphatase (SHIP) Familie, einer Familie von Inositolphosphatasen, erfolgen [197].

Des weiteren kann die Akt- Aktivität über Modulatoren der Phosphorylierung an Ser473 wie Integrin- linked Kinase (ILK), PKCs oder PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase (PHLPP), oder auch durch alternative Phosphorylierung der zentralen Kinasedomäne z.B. durch die Src-Tyrosinkinase beeinflusst werden [198–201]. Auch durch Oligomerisierung mit anderen Proteinen wie beispielsweise dem

Onkogen Telomerase Component 1 kann die Aktivität der Akt-Kinase beeinflusst werden [202]. Jedoch kann die Akt-Kinase auch unabhängig von der PI3K, z.B. durch die cGMP-abhängige Proteinkinase PKA oder durch die Bindung an Hitzeschockproteine reguliert werden [203–206]. Auch eine PH-domänenunabhängige Aktivierung der Akt-Kinase durch PKC δ bei Zellstress wird diskutiert [207].

1.5.2 Die Rolle der Akt-Kinase in der Apoptose

Die Akt-Kinase nimmt durch Inhibierung proapoptotischer Proteine und durch Beeinflussung nukleärer Transkriptionsfaktoren eine Schlüsselrolle in der Apoptosehemmung ein.

Das proapoptotische Protein Bad beispielsweise wird von Akt an Serin136 phosphoryliert, dissoziiert damit vom Bcl2 / Bcl_{XL}-Komplex und verliert seinen hemmenden Einfluß auf das antiapoptotische Bcl2 [208, 209]. Die direkte Aktivierung von Bcl2 durch Akt ist ebenfalls möglich [210].

Auch die proapoptotische Initiatorcaspase Caspase9, das proapoptotische Protein Fox01 und die Mitogenaktivierte Proteinkinase ASK1 werden von der Akt-Kinase durch Phosphorylierung gehemmt [211–213].

Des Weiteren ist Akt in der Lage, über eine Phosphorylierung des I κ Ba-Kinase-Komplexes den Abbau der hemmenden I κ Ba-Proteine sowie die Bildung von Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells (NF κ B) zu steigern und so die Transkription antiapoptotischer Gene wie dem Bcl2-Gen zu fördern [214]. Auch der Transkriptionsfaktor cAMP response element-binding protein (CREB) kann durch Einwirkung von Akt die Produktion des antiapoptotischen Bcl2 und Mcl-1 induzieren [215]. Acinus, ein nukleärer Faktor, der eine entscheidende Rolle bei der Chromatinkondensation spielt, kann durch Akt gehemmt werden und dadurch einen Schutz gegen die proteolytische Aktivität der Caspasen bieten [216].

1.5.3 Die Rolle der Akt-Kinase in der Proliferation

Die Proliferation der Zelle wird zum größten Teil über Wachstumsfaktoren vermittelt, welche wiederum im häufigsten Fall den PI3K/Akt -Signalweg zur Aktivierung des Zellzyklus' verwenden. Dabei findet die Vermittlung des Proliferationssignals meist

über das Protein mTOR statt, welches die Translation von wichtigen Proteinen für die Progression des Zellzyklus' steigert [217]. mTOR wird von Akt sowohl direkt als auch indirekt phosphoryliert und aktiviert.

Der prominente Tumorsuppressor p53, ein Regulator der Expression von antiapoptischen und proliferationsfördernden Genen nach DNA-Schädigung, wird durch Akt-vermittelte Phosphorylierung von Mouse double minute 2 homolog (MDM2) / Human double minute 2 homolog (HDM2) gehemmt, und es kann somit zu verstärktem Zellwachstum kommen [218]. Moesin-Ezrin-Radixin-Like Protein (Merlin), ein weiterer Tumorsuppressor, der die kontaktvermittelte Wachstumsinhibierung steuert kann ebenfalls durch Phosphorylierung gehemmt werden, indem seine Bindung an Partnerproteine verhindert und er durch Ubiquitinierung abgebaut wird [219]. Auch ein Inhibitor der cyclinabhängigen Kinasen, das p21Cip1, wird durch Akt gehemmt und die Proliferation wird gesteigert [212, 220]. Ein weiterer Kontrolleur der Cyclin-Familie findet sich mit GSK3, welches durch Akt inhibiert wird und so die Transkription und die Stabilität von Cyclin D erhöht [212, 221]. Die Checkpointkinase 1 (ChK1) wird durch Akt an Ser280 phosphoryliert, daraufhin ins Zytosol transloziert und steigert so die Mitoseprogression.

ALY, ein mRNA-Exportprotein, und Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT), welche die Telomeraseaktivität steigert, werden durch Akt- abhängige Phosphorylierung aktiviert und tragen so ebenfalls Akt- abhängig zur Zellteilung und Proliferation bei [222, 223].

1.5.4 Die Rolle der Akt-Kinase im Krankheitsbild des T2DM

Eine Hemmung oder Störung der Funktion der Akt-Kinase und somit in der Weiterleitung des Signals im Insulinsignalweg gilt als ursächlich für die Entstehung der Insulinresistenz im Krankheitsverlauf des T2DM. So ist es nicht verwunderlich, dass die Ausschaltung der Akt2 in einer Mäuselinie zu einem diabetesähnlichen Syndrom führt, welches durch starke Insulinresistenz gekennzeichnet ist [182]. Auch konnte bei insulinresistenten Patienten eine starke Akkumulation von Sphingolipiden wie Ceramiden gemessen werden, die in der Zellkultur durch Hemmung der Akt-Phosphorylierung zu einem der Insulinresistenz vergleichbaren Zustand führen [61, 62]. Diese Studien weisen der Akt-Kinase eine zentrale Bedeutung im Mechanismus der Insulinresistenz zu und stellen sie in den Mittelpunkt vieler Forschungen

bezüglich T2DM.

1.6 Sphingosin-1-Phosphat

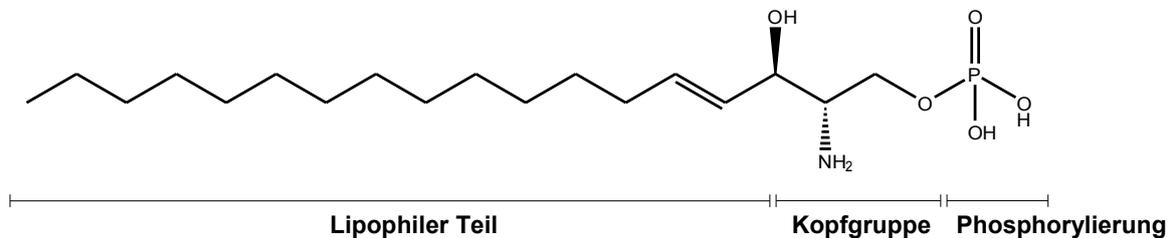


Abbildung 1.6.1: S1P

Sphingosin-1-Phosphat

S1P gehört zur Gruppe der Sphingolipide. Diese stellen eine von 8 Kategorien im LIPID MASS classification System dar und sind Strukturkomponenten eukaryotischer Zellmembranen, in welchen sie sich zusammen mit Glycerolipiden und Sterolen in sogenannten Lipid Rafts oder cholesterolreichen Membranmikrodomänen ansammeln [224–226]. Sphingolipide sind auch aus Bakterien und Pflanzen bekannt, allerdings werden sie dort über andere Biosynthesewege hergestellt [227–229].

Neben ihren strukturgebenden Eigenschaften in Lipiddoppelmembranen stellen Sphingolipide und ihre Metabolite allerdings auch bioaktive Lipide dar, die als Signalmoleküle an zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen in den verschiedensten Zelltypen und Geweben beteiligt sind. Sie regulieren unter anderem sowohl das Zellüberleben als auch die Proliferation, die Zellmigration, den Calciumionen- Haushalt, die Angiogenese, den korrekten Aufbau des Zytoskeletts und der Adherens Junctions und spielen somit eine große Rolle bei immunologischen Erkrankungen wie Multipler Sklerose, Asthma, Krebs, Atherosklerose, Diabetes und diversen Hautkrankheiten [230–235]. Sowohl bei verschiedenen Krebsarten als auch bei Diabetikern und Atherosklerosepatienten konnten unnatürlich erhöhte S1P-Spiegel im Blut gemessen werden.

Die Sphingolipide sind strukturell sehr vielfältig aufgebaute, amphiphile Moleküle, gemein ist ihnen jedoch der Aminoalkohol Sphingosin als zentraler Baustein. Über Variation der Fettsäurebestandteile und der Kopfgruppen entstehen die verschiedenen Vertreter dieser weitläufigen Gruppe von Lipiden, mit Ceramid und Sphingosin,

sowie deren phosphorylierten Vertretern S1P und Ceramid-1-phosphat als wichtigsten Beispielen [236].

Seine höchste Konzentration erreicht S1P im Blut und im Lymphgewebe, wohin es besonders aus Erythrozyten, Thrombozyten, Leukozyten und Endothelzellen sezerniert wird [237, 238]. Thrombozyten galten lange als Hauptquelle des S1P im Blut, da sie keine abbauenden Enzyme des S1P-Stoffwechsels exprimieren und bei Thrombozytenaggregation erhöhte S1P-Spiegel gemessen werden konnten. Da jedoch eine Knockout-Maus, die keine Thrombozyten produzierte, trotzdem normale S1P-Spiegel im Blut aufwies musste diese Theorie überdacht werden. Über Injektion von Wildtyperythrozyten in ein SphK^{-/-}-Mausmodell konnten schließlich in dieser sonst S1P-armen Mauslinie normale S1P-Spiegel erhalten werden und die Erythrozyten somit als neuen Hauptbildungs- und Speicherort für das S1P im Blut identifizieren. Die besonders hohen S1P-Spiegel in Erythrozyten werden durch das Fehlen abbauender Enzyme noch begünstigt [238–240].

S1P liegt im Blut, abgesehen von der Transportmöglichkeit durch Erythrozyten, trotz seines amphiphilen Charakters an Transportproteine wie Albumin oder High Density Lipoprotein (HDL) gebunden vor, wobei die Kopplung an HDL den größeren Teil der Verbindungen ausmacht [241, 242]. Der Transport durch Membranen erfolgt größtenteils durch ATP-verbrauchende Transportproteine wie die ATP-binding cassette transporter (ABC-Transporter)[243]. Diese sind besonders für den Efflux von S1P aus der Zelle in die Blutbahn von Bedeutung [244].

Die bedeutendsten Gegenspieler des S1P stellen Ceramid und Sphingosin dar, welche im Gegensatz zu dem meist antiapoptotisch und mitogen wirkenden S1P proapoptotische und antimitogene Wirkungen aufweisen [245, 246]. Auch der antiapoptotische Effekt des Vitamin D auf Keratinozyten konnte auf einen S1P-vermittelten Mechanismus zurückgeführt werden[247]. Jedoch kann S1P auch negative Auswirkungen auf das Zellüberleben und die Proliferation nehmen; so ist aus Keratinozyten eine Wechselwirkung von S1P mit dem Insulinsignalweg bekannt, in Folge dessen es zu einer Hemmung des proliferativen und antiapoptotischen Effekts des Insulins kommt, wenn die Zellen mit S1P vorbehandelt wurden [248].

Das Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Sphingolipiden, beeinflusst über das komplexe Sphingolipid rheostat entscheidet über das Schicksal einer Zelle [249].

1.6.1 Das Sphingolipidrheostat

Die Konzentration der verschiedenen Sphingolipide in der Zelle wird streng durch die den Auf- und Abbau regulierenden Enzyme gesteuert. Im Zentrum der Sphingolipidsynthese steht hierbei das Ceramid, welches entweder durch Hydrolyse aus Membranlipiden wie Sphingomyelin über die Sphingomyelinase oder Neusynthese aus Fettsäuren und Serin gewonnen werden kann [250–253].

Die Neusynthese wird an der zytosolischen Seite des ERs durch die Kondensation von Serin und Palmitoyl-CoA zu 3-Ketodihydrosphingosin mittels der Serin-Palmitoyltransferase (SPT) gestartet [254]. Die SPT arbeitet in einem membrangebundenen Enzymkomplex aus den zwei heterodimeren Untereinheiten LCB1 und LCB2 und benötigt Pyridoxal-5-phosphat als Cofaktor [255].

Die Neusynthese stellt den größten Teil der Sphingolipide zur Verfügung und durch Mutationen in den Untereinheiten der SPT kann es durch Verlust der Substratspezifität zu schwerwiegenden Störungen im Sphingolipidgleichgewicht kommen, bis hin zu der Erbkrankheit HSAN1, einer hereditären Neuropathie [256, 257]. Auch bei Apoptoseprozessen wird eine starke Induktion der Sphingolipidneusynthese, besonders des Ceramids, beobachtet.

Das Kondensationsprodukt der SPT wird in einem weiteren Schritt durch 3-Ketosphinganinreductase zu Sphinganin/Dihydrosphingosin reduziert, und nach Einführung einer weiteren Fettsäure durch die Ceramidsynthase wird es durch Acetylierung und Einführung einer trans-4,5-Doppelbindung durch die Desaturase zu Ceramid umgewandelt. Ceramid stellt den Ausgangspunkt für die Synthese einer großen Reihe weiterer Sphingolipide wie Glykosphingolipide, Ceramid-1-phosphat, Sphingosin, S1P und Sphingomyelin dar [258]. Die Herstellung des Sphingosins aus Ceramid erfolgt dabei durch die Ceramidase, eine Rückumwandlung des Sphingosins in Ceramid ist aber über die Ceramidsynthase ebenfalls möglich [259].

Die Sphingosinkinase (SphK) mit ihren beiden Isoenzymen SphK1 und SphK2 stellt aus dem Substrat Sphingosin durch Phosphorylierung den Second Messenger S1P her [260]. Unterschiede zwischen den beiden Isoformen bestehen sowohl in der Lokalisation als auch in der Kinetik, der Regulation und dem Expressionsmuster, womit sich auch ihre unterschiedlichen Effekte auf die Zelle erklären lassen [261]. So ist die SphK1 im Cytosol lokalisiert, während sich die SphK2 im Zellkern befindet. Die SphK können durch Stimuli wie beispielsweise Wachstumsfaktoren, Zyto-

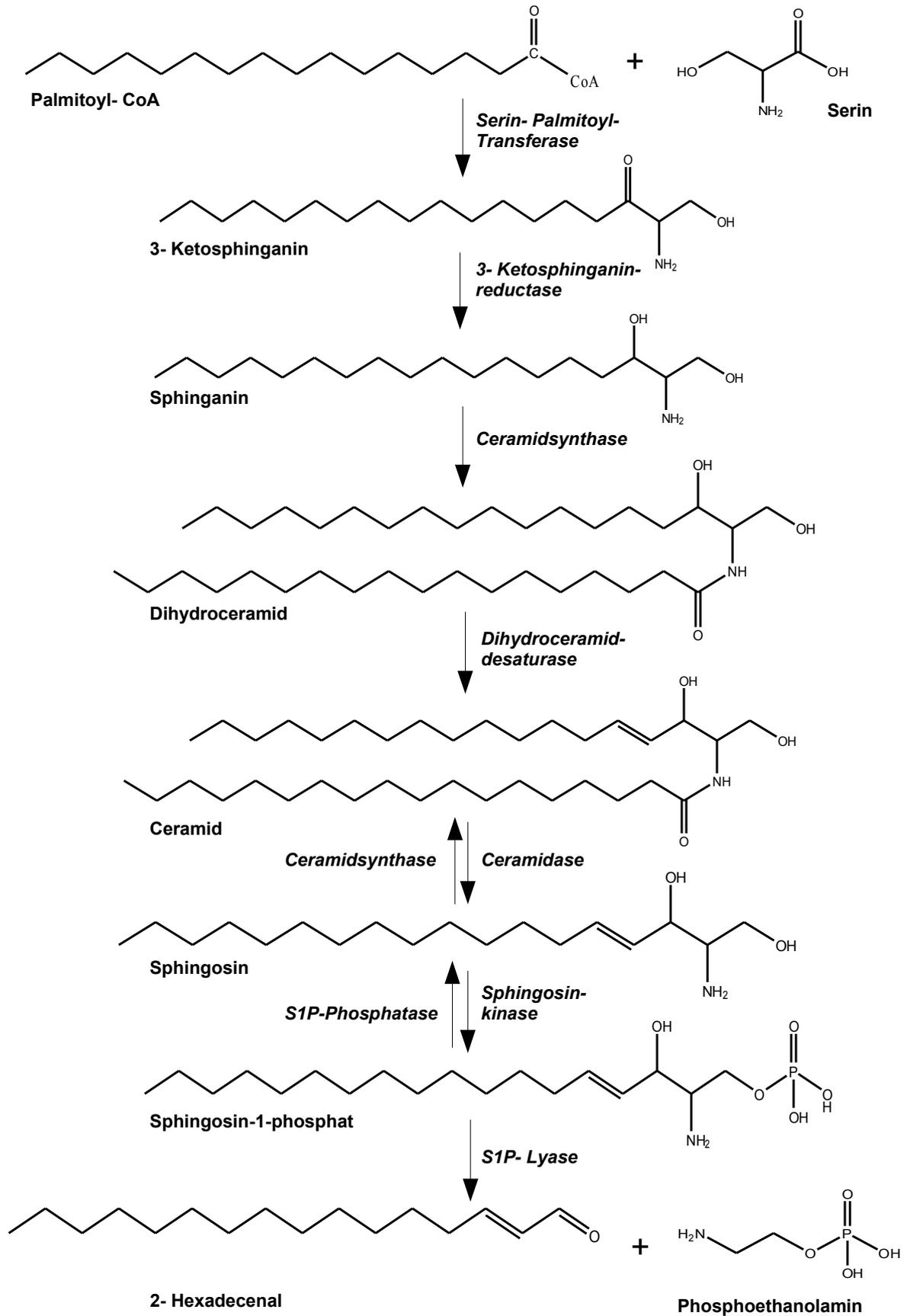


Abbildung 1.6.2: Der S1P- Metabolismus

kine und Hormone induziert werden [262]. Die Ausschaltung beider Kinasen führt zum Tod im Embryonalstadium, bei der Ausschaltung nur einer der beiden Kinasen kann interessanterweise die andere Kinase deren Funktion teilweise übernehmen, jedoch führte die Ausschaltung der SphK1 in Knockoutmäusen zu stark erniedrigten S1P-Spiegeln, während SphK2-Knockoutmäuse weiterhin annähernd normale S1P-Spiegel erreichten, was auf eine besondere Rolle der SphK1 in der Aufrechterhaltung der S1P-Spiegel hinweist [263, 264].

Besonders der SphK1 wird eine große Rolle in inflammatorischen Krankheitsbildern wie der rheumatoiden Arthritis zugeschrieben [265]. Auch bei vielen Krebsarten ist die SphK1 anormal erhöht, und eine Erhöhung geht mit einer schlechten Prognose einher [266–268]. Auch die Migration der Krebszellen und somit die Metastasierung ist bei erhöhter SphK1-Expression erhöht [269].

Der Abbau des S1P kann entweder durch eine reversible Dephosphorylierung zu Sphingosin durch die S1P-Phosphatase oder einen irreversiblen Abbau zu Hexadecenal und Phosphoethanolamin durch die S1P- Lyase (SPL) erfolgen. Die SPL stellt hierbei zusammen mit der SphK die wichtigsten Regulatoren des Sphingolipidreostats dar, wobei die SPL als kritischer Regulator der S1P-Konzentration gilt. Sie wird besonders stark im Lymphgewebe exprimiert, wo sie für die Aufrechterhaltung des S1P-Gradienten verantwortlich ist, welcher die Egression von immunkompetenten Zellen aus den Lymphknoten ins Blut steuert. Wie auch die SPT benötigt die SPL Pyridoxalphosphat als Cofaktor [270]. Die SPL-Expression ist in vielen Krebsarten gestört, und durch die Ausschaltung der SPL können die S1P-Spiegel in vielen Zelllinien stark erhöht werden [271–274].

1.6.2 Sphingolipidrezeptoren

S1P vermittelt seine vielfältigen Wirkungen hauptsächlich über 5 membranständige, G- Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR), welche über 7 transmembranäre Domänen in der Zellmembran verankert sind. Jedoch sind für S1P auch intrazelluläre Wirkungen, beispielsweise auf die Histondeacetylasen HDAC1 und HDAC2, TRAF2, einen Cofaktor der TNF-Rezeptorfamilie und auch Prohibitin 2 bekannt [275–280]. Diese Wirkungen werden im Besonderen mit intrazellulär durch die SphK2 gebildetem S1P in Verbindung gebracht. Allerdings sind auch Wirkungen von intrazellulär

gebildetem S1P auf extrazelluläre Rezeptoren aus Endothelzellen und Fibroblasten bekannt [243, 281].

Die S1P-Rezeptoren wurden anfangs zusammen mit den Rezeptoren für Lysophosphatidsäure (LPA) als Endothelial Differentiation Gen, kurz EDG-Rezeptoren bezeichnet, da der erste, im Jahr 1990 identifizierte Rezeptor dieser Familie, EDG1 (heute S1P₁), den Differenzierungsprozess von Endothelzellen steuert [282]. Da die S1P-Rezeptoren etwa 30 % Strukturhomologie zu LPA-Rezeptoren aufweisen, zählten sie ursprünglich zu einer Familie. Diese Klassifizierung wurde allerdings 1998 geändert, als S1P und LPA als unterschiedliche Liganden identifiziert wurden [283]. Infolge dessen wurden die S1P-Rezeptoren, wie in der International Union of Pharmacology (IUPHAR) üblich, nach dem Liganden mit der höchsten Affinität als S1P₁₋₅ bezeichnet [284]. Der S1P₂-Rezeptor wurde 1993 erstmals im Rattenhirn nachgewiesen, 1996 folgte der S1P₃-Rezeptor und 1998 der S1P₄-Rezeptor, der erstmals in dendritischen Zellen nachgewiesen werden konnte. Erst im Jahr 2000 fand man schließlich den S1P₅-Rezeptor [285–288].

<i>IUPHAR- Bezeichnung</i>	<i>alte Bezeichnung</i>
S1P ₁	Edg 1
S1P ₂	Edg 5
S1P ₃	Edg 3
S1P ₄	Edg 6
S1P ₅	Edg 8

Tabelle 1.6.1: S1P-Rezeptoren: alte und neue Bezeichnungen

S1P₁₋₃ sind meist ubiquitär in vielen Geweben vorhanden. Der S1P₄-Rezeptor wird hauptsächlich im Immunsystem und im blutbildenden System exprimiert, während der S1P₅-Rezeptor vorwiegend im Gehirn vorkommt [289]. Wichtig für die Bindung des S1P an die S1P-Rezeptoren ist die Ausrichtung und strukturelle Umgebung der C3- Hydroxylgruppe im S1P- Molekül [290].

Zusätzlich zu den klassischen S1P-Rezeptoren S1P₁₋₅ gibt es noch eine Reihe weiterer, zu 40 % strukturhomologer GPCRs, die Pertussistoxin (PTX)- sensitiv durch S1P aktiviert werden können. Sie werden als GPR3, 6 und 12 bezeichnet [291].

Entscheidend für die unterschiedlichen Wirkungen des S1P ist, dass durch die verschiedenen S1P-Rezeptoren eine Aktivierung unterschiedlicher Signalkaskaden und Effektorsysteme möglich ist. Auch können sich die S1P-Rezeptoren in ihrer Wirkung gegenseitig beeinflussen. Beispielsweise ist ein funktioneller Antagonismus zwischen dem S1P₁ und dem S1P₂ Rezeptor bezüglich der Regulation der Gefäßper-

meabilität bekannt [292].

S1P₁-Rezeptor Der S1P₁-Rezeptor ist als einziger Rezeptor ausschließlich an Gi-Proteine gekoppelt. Er vermittelt über Aktivierung der Extracellular-signal Regulated Kinase (ERK) und der PI3Kbeta, sowie über eine Hemmung der Adenylatzyklase Proliferationssignale und hemmt die Apoptose. Er wird besonders stark in Lymphozyten exprimiert, wo er für die Wanderung der Lymphozyten vom Lymphknoten ins Blut von entscheidender Bedeutung ist [293].

S1P₂-Rezeptor Der S1P₂-Rezeptor ist sowohl an Gi als auch an Gq und G12/13 gekoppelt, wobei die Kopplung an G12/13 besonders im Vordergrund steht. Durch Gi kann eine Aktivierung der Erk erfolgen, Gq- vermittelt kann es zu einer Aktivierung der PLC kommen und durch G12/13 werden die GTPasen Rho und Rac aktiviert. Der S1P₂-Rezeptor führt zu einer Hemmung der Zellmigration beispielsweise in Lymphknoten, kann über Wachstumshemmung die Proliferation von B-Zellen kontrollieren und kann die Akt-Aktivierung hemmen [294].

S1P₃-Rezeptor Der S1P₃-Rezeptor ist, wie auch der S1P₂-Rezeptor an Gi, Gq und G12/13 gekoppelt, hier tritt allerdings die Kopplung an Gq in den Vordergrund. Beim S1P₃-Rezeptor steht die antiapoptotische Wirkung im Vordergrund, allerdings ist er auch für die Migration dendritischer Zellen von entscheidender Bedeutung [295].

S1P₄-Rezeptor Beim S1P₄-Rezeptor wird eine Kopplung an Gi und Cdc42, eine Rho-GTPase, vermutet. Es kommt im weiteren Verlauf der Signalkaskade zu einer Aktivierung der Erk und der PLC. Interessanterweise hat das PhytoS1P eine höhere Affinität zum S1P₄-Rezeptor, als das S1P selbst [296–298].

S1P₅-Rezeptor Der S1P₅-Rezeptor hemmt die Aktivierung der Erk und steigert die JNK- Aktivierung. Es wird eine Kopplung an Gi/o und G12 diskutiert [299, 300].

1.6.3 Modulatoren des S1P-Stoffwechsels

Modulatoren der S1P-Rezeptoren, oder auch Modulatoren der im S1P- Rheostat beteiligten Enzyme erlauben durch spezifische Ausschaltung oder Aktivierung bestimmter Proteine ein detaillierteres Bild der zu untersuchenden Signalwege. Inzwischen stehen für den Sphingolipidmetabolismus eine Reihe potenter Substanzen zur Verfügung, die im Folgenden vorgestellt werden sollen.

FTY-720 Der als Fingolimod zur immunsuppressiven Therapie der Multiplen Sklerose auf dem Markt befindliche S1P-Rezeptoragonist wurde 1992 erstmals als Derivat des Myriocins aus dem Pilz *Isaria Sinclairii* gewonnen. FTY-720 wird, wenn es nicht, wie in der Zellkultur üblich, schon als Phosphat eingesetzt wird, durch die SphK2 zu seiner Wirkform FTY-720- Phosphat aktiviert und wirkt daraufhin als Agonist an allen S1P-Rezeptoren, bis auf den S1P₂-Rezeptor. Auch kann es die SphK1 hemmen [301]. Des weiteren beruht seine Wirkung als Immunsuppressivum maßgeblich auf einer Internalisierung und Ubiquitinierung des für die Auswanderung der Lymphozyten aus dem Lymphknoten entscheidenden S1P₁-Rezeptors, und somit einer Hemmung der Auswanderung der Lymphozyten ins Blut. Für FTY720-P wurden folgende EC₅₀ Werte an den S1P-Rezeptoren ermittelt: S1P₁ 8,2 nM, S1P₂ >10.000 nM, S1P₃ 151 nM, S1P₄ 33 nM, S1P₅ 178 nM [302–306].

Fumonisin B1 Fumonisin B1 (FB1) ist ein Gift aus *Fusarium*-Pilzarten, welche auf Mais, Weizen und anderen Getreidearten vorkommen. Beim Verzehr wirkt es leber- und nierentoxisch und es steht im Verdacht, beim Menschen Speiseröhrenkrebs auszulösen. Bei verschiedenen domestizierten Tierarten konnte FB1 als Auslöser für diverse tödliche Krankheiten mit gestörtem Sphingolipidstoffwechsel identifiziert werden. FB1 ist ein sehr potenter Hemmstoff der Ceramidsynthese. Durch die Hemmung der Ceramidsynthese wird ein wichtiges Enzym des Sphingolipidrheostats ausgeschaltet und es kommt zu massivem Anstieg der Sphingoidbasen, vorrangig von Sphinganin und S1P, da diese durch die fehlende Umwandlung in Ceramid angehäuft werden [307, 308].

JTE-013 JTE-013, ein ursprünglich in der Therapie der zystischen Fibrose eingesetzter, selektiver Hemmstoff des S1P₂-Rezeptors hat einen IC₅₀ Wert von 17,6 nM

[309]. Seine Selektivität für den S1P₂-Rezeptor wird von einer Studie mit S1P₂^{-/-}-Mäusen aus dem Jahr 2011 allerdings teilweise in Frage gestellt [310].

Myriocin Myriocin, oder auch ISP-1 oder Thermocymocidin, ist ein Metabolit aus dem Stoffwechsel des thermophilen Pilzes *Isaria sinclairii* aus der Familie der Ascomyceten. Es handelt sich um eine atypische Aminosäure, die strukturell dem Sphingosin ähnlich ist. Myriocin ist ein äußerst potenter Inhibitor der SPT und wirkt sowohl antibiotisch als auch antiproliferativ und immunsuppressiv. Sein immunsuppressives Potential ist etwa 10 bis 100 mal größer als das von Ciclosporin. für Myriocin wurde ein IC₅₀ Wert von 0,28 nM an der SPT ermittelt [311].

SKI-II SKI-II ist ein Inhibitor der SphK1, der allerdings in der Kritik steht, die SphK1 für den lysosomalen Abbau zu markieren, statt diese nur zu inhibieren [312, 313]. Es ist ein potenterer Inhibitor als das bis dato weitestgehend genutzte N,N-dimethylsphingosine und weist einen IC₅₀-Wert von < 1 µM auf [314].

VPC 23019 VPC23019 ist ein Antagonist am S1P₁ und S1P₃-Rezeptor. Seine Selektivität für den S1P₃-Rezeptor wird von einer Studie aus dem Jahr 2011 allerdings teilweise in Frage gestellt [310]. Der IC₅₀ Wert liegt etwa bei 0,1 µM [315, 316].

VPC 24191 VPC 24191 ist ein kompetitiver Agonist mit Aktivität am S1P₁- und S1P₃-Rezeptor. Der EC₅₀ Wert liegt ebenfalls etwa bei 0,1 µM [317].

1.7 Fragestellung und Zielsetzung

Sphingolipide stellen neben ihrer strukturgebenden Funktion in der Zellmembran auch wichtige Second Messenger dar, die einerseits über membranständige Rezeptoren, aber auch direkt innerhalb der Zelle unterschiedliche Signalwege zu steuern vermögen. Unter den maßgeblich durch diese Stoffklasse gesteuerten Vorgängen finden sich besonders überlebenswichtige Signalwege der Zell- und Gewebshomöostase wie Apoptose, Proliferation und Migration. Auch das überlebenswichtige Bauchspeicheldrüsenhormon Insulin nimmt in seiner zentralen Funktion als Regulator des Energiemetabolismus entscheidenden Einfluß auf diese Vorgänge. Es ist hinlänglich

bekannt, dass es im fortgeschrittenen Stadium des T2DM zu erheblichen Störungen in der Insulinsignalkaskade kommt, was in Form von Insulinresistenz und Funktionsstörungen sowie Untergang von pankreatischen β -Zellen im fortschreitenden Krankheitsverlauf fatale Folgen hat und letztendlich im kompletten funktionellen Defekt der β -Zellen enden kann.

Die Störungen im Insulinsignalweg werden in Studien mit dem massiven Anstieg freier Fettsäuren und deren Metabolite im Blut besonders adipöser T2DM Patienten in Zusammenhang gebracht. Besonderes Augenmerk wurde hierbei in letzter Zeit auf das Sphingolipid Ceramid gelegt, welches als Metabolit aus der am häufigsten vorkommenden Fettsäure Palmitat gebildet werden kann. Doch kann Ceramid im Körper in Sphingolipidmetabolismus auch weiter in S1P umgewandelt werden, dessen Wirkungen auf das Fortschreiten des T2DM überraschenderweise weitaus weniger gut erforscht sind. Und das, obwohl bekannt ist, dass S1P beispielweise in Keratinozyten maßgeblichen Einfluß auf den Insulinsignalweg nehmen kann.

Deshalb sollen, besonders seitdem mit der Einführung des S1P-Rezeptoragonisten Fingolimod (FTY720) in die Therapie der multiplen Sklerose ein potenter Aktivator von S1P- Signalwegen im Körper in der Medizin zum Einsatz kommt, die potentiellen Auswirkungen dieses hochpotenten kleinen Lipids im Rahmen dieser Arbeit in den Vordergrund gerückt werden.

Die Arbeit gliedert sich daher zu Beginn in folgende Teile:

- Untersuchung der Interaktion von S1P und Fingolimod mit dem Insulinsignalweg hinsichtlich
 - der Auswirkungen auf die Weiterleitung des Insulinsignals über die Proteinkinase Akt
 - der Auswirkungen auf die Proliferation der β -Zellen
 - der Auswirkungen auf die Apoptose der β -Zellen
 - der beteiligten S1P-Rezeptoren
- Untersuchung der Möglichkeit einer Metabolisierung von Palmitat zu S1P und deren Auswirkungen auf
 - die Aktivierung des Insulinsignalwegs über die Akt-Kinase

- das Sphingolipidrheostat

S1P ist oft in der Lage, abhängig von Rezeptorexpressionsmuster und anderen, parallel aktiven Signalwegen sehr unterschiedliche Wirkungen auf Zellen auszuüben. So ist aus Keratinozyten sowohl eine Hemmung des durch Insulin induzierten antiapoptotischen Effektes bekannt, andererseits kann S1P in diesen Zellen, unabhängig von einer Insulinstimulation, aber auch selbst antiapoptotisch wirken.

So ist beispielweise eine positive Wirkung von S1P bei diabetesassoziierten Wundheilungsstörungen bekannt. Dieser antiapoptotische Mechanismus des S1P in Keratinozyten soll im Zuge dieser Arbeit weiter aufgeklärt werden.

- Nähere Charakterisierung des antiapoptotischen Effekts von S1P in Keratinozyten bei alleiniger Stimulation mit S1P, besonders in Bezug auf
 - den beteiligten S1P-Rezeptor
 - weitere, an der antiapoptotischen Wirkung beteiligte Enzyme

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.1.1: Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Acetonitril(LC-MS Grade)	VWR, Darmstadt, Deutschland
Acrylamid Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Actinomycin D	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Agarose (Elektrophorese-Grad)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Agarosegelmarker	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Ameisensäure (98 - 100%)	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Annexin V- APC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
panAKT Antikörper Hase	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Phospho AKT (Ser473) XP	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Antikörper Hase	
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Borsäure	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA, Cölbe, Deutschland
Bradford Reagenz RotiQuant	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Chloroform (LC-MS-Grade)	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
Coomassieblau	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland

Desoxycholinsäure	<i>Sigma-Aldrich</i> , Schnelldorf, Deutschland
Diaminofluorescein-2 diacetate (DAF2-DA)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Schnelldorf, Deutschland
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Schnelldorf, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	VWR, Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Schnelldorf, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) low glucose 1 g/L	<i>Biochrom</i> , Berlin, Deutschland
Phospho eNOS (Ser1177) Antikörper Maus	<i>BD Biosciences</i> , Heidelberg, Deutschland
eNOS Antikörper Hase	<i>BD Biosciences</i> , Heidelberg, Deutschland
Ethanol 96%	VWR, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	<i>Sigma-Aldrich</i> , Schnelldorf, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Schnelldorf, Deutschland
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Schnelldorf, Deutschland
FACS Clean	<i>BD Biosciences</i> , Heidelberg, Deutschland
FACS Flow	<i>BD Biosciences</i> , Heidelberg, Deutschland
FACS Shutdown Solution	<i>BD Biosciences</i> , Heidelberg, Deutschland
Fluoromount®	<i>Sigma-Aldrich</i> , Schnelldorf, Deutschland
Fötales Kälberserum Superior (FKS)	<i>Biochrom</i> , Berlin, Deutschland
FTY720-Phosphat	<i>Cayman Chemical</i> , Ann Arbor, USA
Glycerol	<i>Sigma-Aldrich</i> , Schnelldorf, Deutschland
Glycin	<i>Sigma-Aldrich</i> , Schnelldorf, Deutschland
High Pure RNA Isolation Kit®	<i>Roche Applied Sciences</i> , Mannheim, Deutschland
HRP	<i>Abcam</i> , Cambridge, Großbritannien
Anti-βa-Actin-IgG-Antikörper	
HRP Anti-Hase-IgG-Antikörper	<i>New England Biolabs</i> , Frankfurt, Deutschland
HRP Anti-Maus-IgG-Antikörper	<i>New England Biolabs</i> , Frankfurt, Deutschland
Insulin, human, recombinant, from yeast	<i>Sigma-Aldrich</i> , Schnelldorf, Deutschland
Isopropanol (LC-MS Grade)	<i>Carl Roth GmbH</i> , Karlsruhe, Deutschland

JTE-013	<i>Tocris Bioscience, Bristol, Großbritannien</i>
Kaliumchlorid (KCl)	<i>Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland</i>
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	<i>VWR, Darmstadt, Deutschland</i>
Kaliummonohydrogenphosphat (K_2HPO_4)	<i>VWR, Darmstadt, Deutschland</i>
Keratinocytenmedien KBM und KGM	<i>Lonza, Amboise, Frankreich</i>
Kohlendioxid	<i>Air Liquide, Berlin, Deutschland</i>
Leupeptin	<i>Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland</i>
L-Glutamin	<i>Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland</i>
LightCycler 480® Multiwell Platte 96	<i>Roche Applied Sciences, Mannheim, Deutschland</i>
LightCycler 480® Sealing Foil LumiGlo®	<i>Roche Applied Sciences, Mannheim, Deutschland</i> <i>New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland</i>
Chemilumineszenzreagenz 2-Mercaptoethanol	<i>Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland</i>
Methanol (LC-MS Grade)	<i>VWR, Darmstadt, Deutschland</i>
Natriumchlorid (NaCl)	<i>Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland</i>
Natriumdodecylsulfat (SDS)	<i>Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland</i>
Natriumfluorid (NaF)	<i>Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland</i>
Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	<i>Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland</i>
Natriumhydroxid (NaOH)	<i>Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland</i>
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	<i>Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland</i>
Nonidet P-40	<i>Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland</i>
N-TER Nanoparticle siRNA Transfection System ®	<i>Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland</i>
Penicillin	<i>Biochrom, Berlin, Deutschland</i>
Pepstatin	<i>Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland</i>
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	<i>Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland</i>
Polyvinyliden-difluorid (PVDF)-Membran	<i>Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland</i>
Ponceau S	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland</i>

Primer	<i>Eurofins MWG GmbH, Ebersberg, Deutschland</i>
Propidiumiodid (PI)	<i>Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland</i>
Proteingrößenmarker für SDS-Page	<i>Fermentas GmbH, St. Leon-Roth, Deutschland</i>
RPMI-1640-Medium	<i>Biochrom, Berlin, Deutschland</i>
Silikonlösung in Isopropanol	<i>Serva, Heidelberg, Deutschland</i>
SiRNA	<i>Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland</i>
SKI-II	<i>Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland</i>
S1P	<i>York Pharma, Homberg, Deutschland</i>
Stickstoff, flüssig	<i>Air Liquide, Berlin, Deutschland</i>
Streptomycin	<i>Biochrom, Berlin, Deutschland</i>
SYBR Green II PCR Master Mix	<i>Roche Applied Sciences, Mannheim, Deutschland</i>
Szintillator Rotiszint eco plus	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland</i>
Tetramethylenethyldiamin (TEMED)	<i>Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland</i>
Tumornekrosfaktor (TNF)- α	<i>Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland</i>
Trichloressigsäure	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland</i>
Tris (Base)	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland</i>
Tris-HCl	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland</i>
Trypsin	<i>Biochrom, Berlin, Deutschland</i>
TUNEL TMR Red Cell Death Detection Kit	<i>Roche Applied Sciences, Mannheim, Deutschland</i>
Tween 20	<i>Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland</i>
VPC23019 und VPC24191	<i>AvantiPolarLipids, Alabaster, USA</i>
Wasser (LC-MS-Grade)	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland</i>
Zellkulturplastik TPP	<i>Biochrom, Berlin, Deutschland</i>

2.1.2 Zellkultur

2.1.2.1 Zellen

<i>Zellart</i>	<i>Details</i>	<i>Bezugsort</i>
Keratinocyten	primär	Dr. Jung, Berlin Dr. Schildknecht, Potsdam OP-Zentrum Birkenwerder St. Joseph- Krankenhaus Berlin
MIN-6	murine Insulinom-Zelllinie	Prof. Dr. Schürmann, Potsdam
INS-1e	SV40-Insulinom-Zelllinie, Ratte	Prof. Dr. Maechler, Genf

2.1.2.2 Lösungen für die Zellkultur

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	0,2 g/l KCl 8,0 g/l NaCl 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ 1,44 g/l NaHPO ₄ gelöst in Aqua bidest.
Trypsinlösung	1,67 mg/ml Trypsin 0,67 mg/ml EDTA gelöst in PBS
Dispaselösung	2 Einheiten (U)/ml in Calcium- und Magnesiumfreiem PBS
Stoppmedium	10% FKS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin gelöst in DMEM
Einfriermedium	10 % DMSO

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

2.1.2.3 Zellkulturmedien

Keratinocyten: Wachstumsmedium	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 Gentamycin gelöst in KBM mit Calcium
Ins-1e-Zellen: Wachstumsmedium	10% FKS 1 mM Pyruvat 50 µM 2-Mercaptoethanol 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin gelöst in RPMI-1640
MIN-6-Zellen: Wachstumsmedium	10% FKS 4 mM Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin gelöst in DMEM (low glucose 1g/l)

Die Basalmedien wurden für β -Zellen jeweils ohne FKS, Glucose und Glutamin angefertigt, da Glutamin über eine Stimulation der Insulinsekretion direkt den Akt-Signalweg beeinflussen kann [318]. Als Keratinocytenbasalmedium wurde das un-sup-

plementierte KBM benutzt.

2.1.2.4 Testsubstanzen zur Stimulation in der Zellkultur

Actinomycin D Der DNA- Interkalator Actinomycin D wird zu 2 mg/ml in DMSO gelöst und aliquotiert bei -20 °C gelagert.

FTY720-Phosphat Der S1P_{1,3,4,5}- Agonist wird zu 1 mM in DMSO gelöst und aliquotiert bei -20 °C gelagert.

Fumonisin B1 Der Sphingosin- N-Acyltransferaseinhibitor wird zu 2 mM in Methanol gelöst, welches vor Verwendung abgedampft wird. Zur Stimulation wird der Inhibitor in 0,5% BSA / PBS aufgenommen. Die Lagerung erfolgt als Stammlösung in Methanol bei -20 °C.

Insulin Das Protein wird zu einer 100 mM Stammlösung in Aqua dest. gelöst, das zuvor mit HCl auf pH 3,5 eingestellt und sterilfiltriert wurde. Die Lagerung erfolgt bei +4 °C im Kühlschrank.

JTE-013 Der S1P₂-Rezeptor-Inhibitor JTE013 wird zu 100 mM in DMSO gelöst und aliquotiert bei -20 °C aufbewahrt.

Myriocin Der Serinpalmitoyltransferaseinhibitor wird zu 2,5 mM in Methanol gelöst und bei bei -20 °C gelagert.

Palmitat Die gesättigte Fettsäure Palmitinsäure wird zu 8 mM gelöst, wobei eine Vorlösung in 70 °C warmer 0,1 M NaOH zu 1/10 des Endvolumens hergestellt wird und diese dann unter Rühren heiß in 50 °C warme 10%ige, fettsäurefreie BSA-lösung eingetropt wird. Die Lagerung erfolgt in Aliquots bei -20 °C.

S1P Eine unter leichtem Erwärmen im Ultraschallbad hergestellte Stammlösung (5×10^{-4} M) des Lipidmediators D-erythro-sphingosine-1-phosphat in Methanol wird in silikonisierte Glasröhrchen aliquotiert und unter Stickstoff abgedampft. Zur Einstellung der gewünschten Konzentration erfolgt die Zugabe einer entsprechenden Menge von 0,5 %iger BSA/PBS-lösung, welche zuvor sterilfiltriert

wurde. Zur verbesserten Lösung des S1P wird das Gemisch für ca. 5 min im Ultraschallbad inkubiert und daraufhin zur Stimulation der jeweiligen Zellkultur verwendet.

Es ist darauf zu achten, den wahren Gehalt an S1P in den Stimulationsflüssigkeiten zu überprüfen, da S1P sehr stark an Kunststoff adsorbiert und deshalb nicht davon ausgegangen werden kann, dass die eingesetzte Konzentration auch der Stimulationskonzentration entspricht. In der vorliegenden Arbeit wurde in den meisten Experimenten eine Konzentration von 10 μM S1P eingesetzt, die tatsächliche Konzentration in der Zellkulturplastik lag nach Bestimmung über HPLC-MS-MS allerdings nur bei 5 μM .

SKI-II Der SphK 1- Inhibitor SKI-II wird zu 1 mM in DMSO gelöst, aliquotiert und unter Lichtausschluss bei -20 °C gelagert.

TNF α Das Zytokin TNF α wird zu 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 1 % BSA/PBS-Lösung aufgenommen, aliquotiert und unter Lichtausschluss bei -20 °C gelagert.

VPC23019 Der S1P_{1,3}-Rezeptorantagonist wird zu 1 mM in DMSO gelöst und aliquotiert bei -20 °C gelagert.

VPC24191 VPC24191, ein kompetitiver Agonist am S1P₁- und S1P₃-Rezeptor wird zu 20 mM in DMSO/ 1 M HCl (95:5 v/v) gelöst, und sofort 1:20 in 3 % fett-säurefreiem BSA in Wasser verdünnt. Diese Stammlösung mit 1 mM VPC24191 wird aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.1.3 Versuchstiere

NZO Es wurden Mäuse aus der Zuchtlinie NZO/H1Bom (R. Kluge, DIfE, Nuthetal) verwendet.

C57BL/6 Die C57BL/6- Mäuse wurden bei Charles River, Sulzfeld, Deutschland erworben.

Die Mäuse wurden bei 22 °C und einem 12-stündigen Tag / Nacht- Zyklus gehalten.

Allen Mäusen standen zusätzlich zur Nahrung hölzerne Kaustangen zur Zahnlangenregulation und Wasser zur Verfügung.

2.1.3.1 Versuchstiernahrung

Standarddiät (SD) Standard- Basisfutter für Langzeitstudien (Art. Nr. V153x R/M-H) von der Firma *ssniff*, Soest, Germany. 19 % Protein, 54,1 % Kohlenhydrate, 3,3 % Fett

Hochfettdiät (HFD) individuell gemischte Hochfett- Nahrung mit erhöhtem Anteil an gesättigten Fettsäuren. 20 % Protein, 40 % Kohlenhydrate, 28 % Fett

Tabelle 2.1.3: HFD

<u>Inhaltsstoff</u>	<u>Anteil im Futter (%)</u>	<u>Hersteller</u>
Casein	20	<i>Bayerische Milchindustrie eG</i> , Landshut, Germany
Kokosfett	13,5	<i>Ostthüringer Nahrungsmittelwerk</i> , Gera, Germany
Margarine	13,5	<i>Ostthüringer Nahrungsmittelwerk</i> , Gera, Germany
Distelöl	0,5	<i>Kunella Feinkost</i> , Cottbus, Germany
Leinöl	0,5	<i>Kunella Feinkost</i> , Cottbus, Germany
Mikrocellulose	5	<i>J. Rettenmaier + Söhne</i> , Ellwangen, Germany
Mineralstoffmix	5	<i>Altromin</i> , Lage, Germany
Vitaminmix	2	<i>Altromin</i> , Lage, Germany
Saccharose	10	<i>Pfeifer + Langen KG</i> , Köln, Germany
Stärke	30	<i>Kröner Stärke</i> , Ibbenbüren, Germany

2.1.4 Proteinanalytik

RIPA-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 8,0
	150 mM NaCl
	1% Triton X-100
	0,5% Natrium-desoxycholinsäure
	0,1% SDS
	10 mM Natriumfluorid
	1 mM Natriumorthovanadat
	2 µg/ml Aprotinin
	10 µg/ml Leupeptin

	1 µg/ml Pepstatin 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid 5 mM EDTA 1 mM EGTA In Aqua dest.
Bjerrum-Schafer-Nielsen-Puffer (BSN-Puffer)	48 mM Tris 39 mM Glycin 0,0375 % SDS
Blockpuffer	5 % BSA in TBST
Laufpuffer nach Laemmli (pH 8,3)	0,025 M Tris 0,192 M Glycin 0,1 % SDS in Aqua dest.
Ponceau-Färbelösung	0,2 % Ponceau S 3 % Trichloressigsäure in Aqua dest.
Probenpuffer (denaturierend) (pH 6,8)	0,0625M Tris-HCl 2% SDS 6,41 g/L Dithiothreitol 10% Glycerol 0,001 % Bromphenolblau
Sammelgelpuffer (pH 6,8) Trenngelpuffer (pH 8,8)	0,125 M Tris-HCl in Aqua dest. 0,375 M Tris-HCl in Aqua dest.
Strip-Puffer (pH 2,2)	15 g/L Glycin 1 g/L SDS 10 ml Tween 20 in Aqua dest.

TBST-Puffer (pH 7,4)	2 mM Tris HCl 15 mM NaCl 0,05% Tween 20 in Aqua dest.
----------------------	--

2.1.5 Durchflusszytometrie

Annexin- Bindungspuffer pH (7,4)	2,5 mM CaCl ₂ 10 mM HEPES 140 mM NaCl In Aqua dest.
----------------------------------	---

2.1.6 RNA-Analytik

DEPC- Wasser	0,1% DEPC über Nacht in Aqua dest., autoklaviert
Agarosegel	2% Agarose (Elektrophoresegrad) in TBE Puffer, aufgekocht

Tabelle 2.1.7: Primer

Zielgen	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
S1P ₁ mur	ttctcatctgctgcttcatcatcc	gggccgagagggctaggttg
S1P ₂ mur	ttactggctatcgtggctctg	atggtgaccgtcttgagcag
S1P ₃ mur	gcgtgttccttctgattgg	gcaagatggttagagcagtc
S1P ₄ mur	ctgtcagggactcgtacc	cgtgaagagcagactgaag
S1P ₅ mur	ccaacagcttgacgcatcccc	ggttgctactccaggactgccg
SphK1 mur	tgggtacgagcaggtgactaatgaag	aaggtgccactgtgaaacgaatc
SphK2 mur	gctgggctgtccttcaacctca	gagcccattcagcacctcgtaaag
S1PL mur	aggacttcgagccttatttgaga	accctgagcaggcagagttttc
HPRT1 mur	tggatacaggccagactttgtt	cagattcaacttgcgctcatc
GAPDH mur	cctcgtcccgtagacaaaatg	tgaaggggtcgttgatggc
eNOS hum	caaccaacgtctgcagaccgtgc	ggcggacctgagtcgggcagccgc
S1P ₃ hum	cgcttcagtgtaaacaacg	gagggtcacacagcatt
Cyclophilin A hum	ttgcttaattctacacagtacttagat	ctaccctcaggtggtctt

Die Primer für die RT-PCR (Synthesemaßstab: 0,01 µmol, Reinheitsgrad: High Purity Salt Free) wurden in DEPC-Wasser zu 100 µM gelöst. Aus diesen Stammlösungen wurden mit DEPC-Wasser Gebrauchslösungen zu 5 µM hergestellt.

2.2 Geräte

Tabelle 2.2.1: Geräte

Autoklav <i>Varioklav</i>	<i>H+P Medizintechnik</i> , Oberschleißheim, Deutschland
Brutschrank <i>CB-150</i>	<i>Binder</i> , Tuttlingen, Deutschland
Chromatographie 6530	<i>Agilent Technologies</i> , Böblingen, Deutschland
Accurate-Mass Q-TOF LC/MS System 1200 Series	
Elektrophoresesystem <i>Mini-PROTEAN 3</i>	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH</i> , München, Deutschland
Eismaschine <i>ZBE 350</i>	<i>Ziegra Eismaschinen</i> , Isenhagen, Deutschland
Flow Cytometer <i>FACS Calibur</i>	<i>BD Biosciences</i> , Heidelberg, Deutschland
Flow Cytometer <i>FACS Canto II</i>	<i>BD Biosciences</i> , Heidelberg, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop <i>BZ8000</i>	<i>Keyence</i> , Neu-Isenburg, Deutschland
Flüssigszintillationsspektrometer <i>LS6000 LL</i>	<i>Beckman Coulter</i> , Krefeld, Deutschland
Magnetrührer <i>MR3001</i>	<i>Heidolph Instruments GmbH</i> , Schwabach, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	<i>Carl Roth</i> , Karlsruhe, Deutschland
PCR-Maschine <i>LightCycler 480 II</i>	<i>Roche Applied Sciences</i> , Mannheim, Deutschland
Phasenkontrast-Mikroskop <i>Eclipse TS100</i>	<i>Nikon Instruments</i> , Düsseldorf, Deutschland
pH-Meter <i>ProfiLab pH 597</i>	<i>WTW</i> , Weilheim, Deutschland
Pipetten <i>Eppendorf Research</i>	<i>Eppendorf AG</i> , Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe <i>Pipetboy</i>	<i>Integra Biosciences GmbH</i> , Fernwald, Deutschland
Photometer <i>Ultrospec 2010</i>	<i>Amersham Biosciences</i> , Freiburg, Deutschland
Reinstwasseranlage <i>Elix 10</i>	<i>Millipore</i> , Schwalbach, Deutschland
Semi-Dry Blotter <i>Trans-Blot SD</i>	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH</i> , München, Deutschland
Sterilarbeitsbank <i>Hera-Safe</i>	<i>Heraeus</i> , Hanau, Deutschland
Stromversorgung <i>Power Pac 1000</i>	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH</i> , München, Deutschland

Thermomixer <i>Thermomixer comfort</i>	<i>Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland</i>
Trockenschrank <i>WTB</i>	<i>Binder, Tuttlingen, Deutschland</i>
Ultraschallbad <i>Sonorex RK100H</i>	<i>Bandelin, Berlin, Deutschland</i>
Vakuumpumpe <i>Laboport</i>	<i>KNF Neuberger AG, Balterswil, Schweiz</i>
Vakuumzentrifuge <i>Centrivic II</i>	<i>Heraeus, Hanau, Deutschland</i>
Vakuumzentrifuge <i>Speed Vac SC 210 ARC</i>	<i>Thermo Fisher, Dreieich, Deutschland</i>
Vortexmixer <i>Vortex Genie 2</i>	<i>Scientific Industries, New York, USA</i>
Waage <i>BP211D</i>	<i>Sartorius AG, Göttingen, Deutschland</i>
Wasserbad <i>SUB Universal Water Bath</i>	<i>Grant, Cambridge, England</i>
Wippschüttler <i>RT 45°</i>	<i>Fröbel Labortechnik, Schachen, Deutschland</i>
Wippschüttler <i>PMR-30</i>	<i>Grant, Cambridge, England</i>
Zellgefrierbehälter <i>Mr. Frosty</i>	<i>Thermo Fisher, Dreieich, Deutschland</i>
Zentrifuge <i>Biofuge fresco</i> mit Festwinkelrotor 7500 3325	<i>Heraeus, Hanau, Deutschland</i>
Zentrifuge <i>5810R</i> mit Ausschwingrotor A-4-62	<i>Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland</i>

2.3 Methoden

2.3.1 Kultivierung der Zellen

2.3.1.1 Gewinnung primärer humaner Keratinozyten

Die Gewinnung primärer epidermaler Keratinozyten erfolgte aus juvenilen, humanen Spendervorhäuten, die bei Zirkumzisionen in den kinderchirurgischen Ambulanzen der Ärzte Dr. Jung und Dr. Schildknecht, sowie dem St. Joseph- Krankenhaus und dem Operationszentrum Birkenwerder anfielen. Sie wurden dem Arbeitskreis nach Genehmigung durch die Ärztekammer Berlin zur Verfügung gestellt. Die Hautstücke wurden in gekühltem Transportmedium geliefert. Nach Entfernung des Transportmediums und Reinigung mit eiskaltem PBS wurden die Hautstücke in etwa 8 mm² große Stücke geschnitten und 1 h bei 37 °C oder alternativ 12 h über Nacht

bei 4°C in Dispase-Lösung inkubiert, um durch die Fibronectin und Collagen spaltende Protease die epidermalen Zellen möglichst schonend aus dem Zellverband zu lösen. Die Calciumionenfreiheit der verwendeten Lösungen war hierbei besonders wichtig, da Keratinozyten bei zu hohen Calciumionenkonzentrationen zur Ausdifferenzierung neigen. Die Reaktion wurde durch Waschen mit PBS beendet und anschließend mit Pinzetten vorsichtig die Epidermis von der Dermis getrennt. Die Zellen der Epidermis wurden im weiteren Verlauf durch 10-minütige Inkubation der Epidermisstückchen mit Trypsinlösung herausgelöst und nach Zugabe von Stoppmedium bei 1200 rpm 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in PBS gewaschen, um Serumreste loszuwerden, welche die unerwünschte Ausdifferenzierung der primären Keratinozyten fördern würden. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspension des Zellpellets in KGM wurden die Zellen in Zellkulturflaschen eingesät und bei 37 °C, 5% CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die so erhaltenen Zellen wurden als Passage 0 bezeichnet. Nach 24 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um nicht anhaftende Zellen und Erythrozyten zu entfernen.

2.3.1.2 Passagierung der primären Zellen und Zelllinien

Bei einem Konfluenzgrad von etwa 80 % wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS-Lösung gespült und durch Zusatz von 1,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung bis zum Ablösen im Brutschrank inkubiert. Das Ablösen der adhären Zellen wurde durch intermittierendes Klopfen beschleunigt, um eine Schädigung der Zellen durch die Protease zu verhindern. Das Ablösen wurde unter dem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 4,5 ml FKS-haltigem Stoppmedium beendet, wobei FKS hier als Substrat im Überschuss die Proteasereaktion an der Zellmembran zum Erliegen bringt. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, die Flasche nochmals mit PBS-Lösung gespült und die vereinigten Zellsuspensionen schonend zentrifugiert (Keratinozyten: 1200 rpm, 5 min, 4 °C; β -Zellen: 900 rpm, 5min, 4 °C). Das Stoppmedium wurde nun abgenommen, die Zellen in ihrem jeweiligen Wachstumsmedium resuspendiert und in Zellkulturflaschen ausgesät. Diese Zellen wurden nun als eine Passage höher bezeichnet als vor der Trypsinbehandlung.

Die Verbreiterung der Passagen erfolgte jeweils im Verhältnis 1:3 bis 1:6, je nach Zell-

zahl. Bei β -Zellen war es äußerst wichtig, nicht zu dünn einzusäen und so wenig Medium wie nötig zu benutzen, da die Zellen zur Proliferation auf Zellkontakte angewiesen sind und des Weiteren zu den Zelllinien gehören, die ihr Medium durch Eigenproduktion von Insulin selbst konditionieren müssen. Bei Keratinozyten ist auf eher dünnere Einsaat zu achten, da die Zellen bei starker Konfluenz ausdifferenzieren können.

Keratinozyten wurden in den Passagen 1 - 3 für Experimente eingesetzt.

MIN-6-Zellen wurden in den Passagen 16-20 verwendet, da die glucoseinduzierte Insulinantwort dieser Zelllinie ab Passage 22 signifikant abnimmt [319].

INS-1e-Zellen wurden bisher bis Passage 100 mit unveränderten Eigenschaften in der Zellkultur getestet und wurden deshalb in allen vorhandenen Passagen (80-100) für Experimente eingesetzt [73].

2.3.1.3 Quantifizierung zur Einsaat der Zellen

Für eine optimale Entwicklung der Zellen spielt neben der Wahl eines geeigneten Wachstumsmediums auch die gewählte Zellzahl bei der Einsaat eine Rolle. Während eine zu niedrige Zelldichte aufgrund fehlender Zell-Zell-Kontakte zu einer verminderten Wachstumsrate der Zellen führt, vermindert auch eine zu hohe Zelldichte durch vermehrtes Übertreten von Zellen in die Ruhephase die Proliferation. Um reproduzierbare Bedingungen für die Experimente zu gewährleisten, ist deshalb 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 positioniert wurde, wurden 10 μ l der gut homogenisierten Zellsuspension in den Zwischenraum zwischen Deckglas und Zählkammer gefüllt und die einzelnen, großen Quadranten mittels eines Phasenkontrastmikroskops ausgezählt. Aus den erhaltenen Einzelwerten wurde nun der Mittelwert gebildet, dieser mit 10^4 (zusammengesetzt aus dem räumlichen Inhalt eines Quaders der Länge 10 mm und dem Kammerfaktor 10) multipliziert und so die Anzahl der Zellen in 1 ml der Zellsuspension bestimmt.

2.3.1.4 Lagerung und Reaktivierung der Zellen

Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -196 °C in flüssigem Stickstoff. Dazu wurde eine Zellsuspension durch Behandlung mit Trypsinlösung, Stoppmedium und nachfolgenden Waschschritten aus der Kulturflasche gewonnen und nach der Zentrifugation mit einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen pro ml in Einfriermedium resuspendiert. 1,5 ml dieser Zellsuspension wurde in gekühlte Cryoröhrchen überführt und mittels der Einfrierhilfe Mr. Frosty bei konstanter Abkühlung von $1\text{ °C}/\text{min}$ für einige Tage 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.

Um das zelltoxische DMSO zu entfernen, wurde die Zellsuspension zunächst in das jeweilige vorgewärmte (37 °C) Wachstumsmedium (10ml) aufgenommen und abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in eine 75 cm^2 Kulturflasche mit 10 ml vorgelegtem Wachstumsmedium überführt und im Brutschrank inkubiert. Die Anzucht der Zellen bis zum gewünschten Konfluenzgrad erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO_2 .

Keratinocyten wurden nur bis Passage 1, MIN-6-Zellen nur bis Passage 18 cryokonserviert.

Es wurden Mykoplasmentests bei der erstmaligen Reaktivierung von Cryokulturen durchgeführt und die Zellen bei Bedarf vor der Verwendung für Versuche mit Antibiotika therapiert.

2.3.2 Tierversuche

Ab einem Alter von 18 Wochen erhielten die Versuchstiere jeweils über 16 Tage eine HFD, die sehr reich an gesättigten Fettsäuren ist, oder eine SD. Zur Gewinnung der murinen Blutproben wurde den Mäusen 50 μl Blut aus der Schwanzvene entnommen.

2.3.3 Proteinanalytik

Die Western Blot-Analyse ermöglicht eine Identifizierung und/oder Quantifizierung spezifischer Proteine innerhalb eines Proteingemisches unter Verwendung spezifischer Antikörper. Hierbei kommt es zur Auftrennung eines Proteingemisches mittels Gelelektrophorese, Transfer der Proteine auf eine Membran („blotting“) und der Proteindetektion durch Antikörper, die spezifisch an antigene Epitope des auf der Membran fixierten Zielproteins binden.

2.3.3.1 Zellyse und Proteinaufreinigung

Für die Proteingewinnung wurden die Zellen für Kurzzeitstimulationen in einer Zelldichte von 3×10^5 Zellen pro Zellkultureinheit einer 6 Loch Platte eingesät, für Langzeitstimulationen über mehr als 24 h wurde eine Einsaat von $1,2 \times 10^5$ Zellen verwendet. Den Zellen wurde vor der Stimulation 24 bis 48 h Zeit zum Anwachsen gegeben.

Nach der jeweiligen Stimulation wurde auf Eis gearbeitet: das Stimulationsmedium wurde abgesaugt und die Zellen zweimal mit 2 ml eiskaltem PBS gewaschen. Nach Einleitung der Zellyse durch die Zugabe von 50 μ l des RIPA Puffers wurde die Zellkulturplatte bei 4 °C für 10 min horizontal auf Eis inkubiert. Nach optischer Überprüfung der vollständigen Zellyse mittels eines Phasenkontrastmikroskops wurden die Zellysate mit einem Zellschaber von der Platte gelöst und in Eppendorfgefäße überführt. Die festen Zellbestandteile der gewonnenen Zellysate wurden bei 4 °C und 16000G für 30 min abzentrifugiert und die Überstände direkt der Proteinbestimmung bzw. der Western Blot Analyse unterworfen. Eventuell nötige Lagerung der Proben erfolgte bei -80 °C.

2.3.3.2 Proteinquantifizierung

Die grobe Quantifizierung der Zellysate erfolgte mittels einer modifizierten Methode nach Bradford [320].

Der im Bradford Reagenz (RotiQuant) zweifach protoniert enthaltene rote Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 erfährt bei der Anlagerung an kationische und unpolare Seitenketten der Proteine eine Stabilisierung der deprotonierten blauen Form und es resultiert eine Verschiebung des Extinktionsmaximums von 465 nm (rotbraun) zu 595 nm (blau). Der blaue Komplex kann bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch vermessen werden.

Es wurde eine Standardkurve mit BSA erstellt. Für die Proteinbestimmung wurden 5 µl Zellysat, 95 µl Aqua bidest. und 1 ml Bradfordlösung gemischt. Die Berechnung des Proteingehalts aus den Extinktionswerten erfolgte durch Interpolation mit Hilfe der Standardkurve. Für die weitere Durchführung der Proteinanalyse wurden zwischen 15 µg und 50 µg Protein verwendet.

2.3.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um ein biochemisches Verfahren zur Auftrennung von Molekülen nach ihrer Größe im elektrischen Feld.

Vor der Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE wurden eine 15 - 50 µg Protein äquivalente Menge Zellysat mit der entsprechenden Menge an DTT-haltigem Probenauftragspuffer nach Laemmli versetzt und 5 min bei 95 °C bis zur vollständigen Denaturierung erhitzt.

Hierbei werden durch die Hitze Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine aufgebrochen und durch das DTT die Disulfidbindungen gespalten.

Zur Fokussierung der Proben vor dem Lauf wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli mit einem der eigentlichen PAGE vorgeschalteten, geringer konzentrierten Sammelgel (4% Polyacrylamid) eingesetzt [321]. Als Trennmatrix diente ein Gel auf Polyacrylamidbasis, das je nach der gewählten Konzentration des Polymers unterschiedliche Porengröße aufwies. In dieser Arbeit wurden meist 10%ige Trenngelle eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte bei konstant 200 V mit max. 60 mA / Gel in einem mit Laufpuffer gefüllten, vertikalen Elektrophoresesystem ohne Kühlung. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Bromphenolblaubanden den unteren Bereich des Gels erreicht hatten.

2.3.3.4 Western Blot und Immundetektion

Das Blotten erfolgte nach Äquilibrierung des Gels in Bjerrum-Schafer-Nielsen-Puffer und mit Hilfe einer zuvor in Methanol aktivierten PVDF-Membran, die ebenfalls in Puffer aquilibriert wurde über einen Semi-Dry-Blotter 30 min bei konstant 25 V. Der erfolgreiche Proteintransfer wurde mit Hilfe einer Ponceaufärbung auf der Blotmembran überprüft.

Der Farbstoff Ponceau S bindet reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine und färbt diese rötlich.

Nach der Überprüfung und, wenn nötig, Teilung der Membran zur Detektion von Zielproteinen unterschiedlicher Größe, wurde der Blot bis zur Entfärbung mit TBST-Lösung gewaschen. Anschließend wurden die Membranen durch Inkubation in 5 %igem BSA in TBST bei 37 °C geblockt, um unspezifische Bindungen von Antikörpern an der Membran zu verhindern.

Nach drei Waschschritten mit TBST für jeweils 5 min bei Raumtemperatur wurden die Membranen bei 4°C über Nacht oder bei Raumtemperatur für 2 hn auf einem Wippschüttler mit dem in Blocklösung verdünnten primären Antikörper behandelt, um die Zielproteine spezifisch zu markieren. Die Verdünnung des Antikörpers richtete sich hierbei nach der Herstellerangabe.

Die Inkubation mit einem Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten sekundären Antikörper, der spezifisch an den Primärantikörper bindet, erfolgte nach erneutem Waschen der Membranen mit TBST bei Raumtemperatur für 1 h auf dem Wippschüttler. Der Sekundärantikörper wurde vor der Verwendung 1:2000 in Blocklösung verdünnt.

Anschließend wurde nach dreimaligem Waschen mit TBST die Detektion der an die Proteine gebundenen Antikörper mit Hilfe des LumiGlo® Chemilumineszenz Reagenzes durchgeführt. Hierbei wird der in dem Detektionsreagenz enthaltene inaktive Lumineszenzfarbstoff durch die an den Sekundärantikörper gebundene HRP mit Hilfe des ebenfalls in dem Reagenz enthaltenen H₂O₂ oxidiert und so in die aktive, lumineszierende Form überführt. Die Intensität des so entstehenden Lichtsignals ist abhängig von der Konzentration der HRP und somit auch von der Konzentration des

initial vorhandenen Proteins auf der Blotmembran, das als Ziel für den Primärantikörper diente, und kann durch Belichtung (Schwarzfärbung) eines Films oder über ein geeignetes Kamerasystem detektiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl mit Hilfe eines Films und Entwicklungsreagenzien in der Dunkelkammer als auch mittels eines Kamerasystems detektiert. Die quantitative Auswertung erfolgte densitometrisch mit Hilfe des Programms ImageJ.

Für die Detektion von weiteren Proteinen auf der gleichen Membran wurden die Antikörper durch zwei mal 10-minütige Inkubation der Membran in Strip-Puffer bei Raumtemperatur entfernt und nach mehrfachem Waschen mit TBST und Behandlung mit Blocklösung die Membran einer erneuten Inkubation mit Antikörpern unterzogen.

2.3.4 Fluoreszenzmikroskopie

Genau wie das Western Blotting kann auch die Fluoreszenzmikroskopie zur Detektion, und in gewissen Grenzen auch zur Quantifizierung, von Proteinen herangezogen werden. Das Grundprinzip basiert auf der Visualisierung von Proteinen durch Bindung an spezifische, fluoreszenzmarkierte Antikörper, welche bei Anregung durch eine Lichtquelle mit geeigneter Wellenlänge Fluoreszenzlicht emittieren, das von dem Mikroskop über Filter dargestellt werden kann.

Aber auch kleinere Moleküle wie beispielsweise NO können durch Umsetzung mit einem Fluoreszenzfarbstoff im Fluoreszenzmikroskop dargestellt werden. Bei der Bildgewinnung mit dem Fluoreszenzmikroskop wurden in den jeweils zusammengehörigen Versuchsreihen gleiche Objektive, Belichtungszeiten und Hintergrundabgleichswerte verwendet. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit der von der Herstellerfirma des Mikroskopes gelieferten Software BZ Viewer und BZ Analyzer.

Für die Durchführung der Fluoreszenzmikroskopieversuche wurden $2,5 \times 10^4$ Keratinozyten auf runden, zuvor sterilisierten Deckgläschen in 12-Loch Platten ausgesät, bzw. mit siRNA transfizierte Keratinozyten direkt nach der Transfektion auf Deckgläschen eingesät.

2.3.4.1 Proteinfärbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern

Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurden die Keratinozyten mit 4 %iger Formaldehydlösung bei Raumtemperatur auf den Deckgläschen fixiert, mittels Inkubation mit BSA unspezifische Bindungsstellen blockiert und die Deckgläschen anschließend für 60 min mit einem spezifischen Primärantikörper in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung inkubiert. Als farbgebende Komponente wurde ein gegen das Immunglobulin des Primärantikörpers gerichteter, mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelter Sekundärantikörper eingesetzt, ebenfalls mit 60 min Inkubationszeit unter Lichtausschluß. Im Folgenden wurde, weiterhin unter Lichtausschluß, der Zellkern mittels DAPI gefärbt (Endkonzentration 1 µg/ml) und die Deckgläschen kopfüber mittels eines Tropfens Fluoromount®-Lösung auf Glasobjektträgern befestigt. Die Fluoromount®-Lösung dient einerseits zur Befestigung der Deckgläschen unter Luftausschluß, andererseits vermindert die Lösung das Ausbleichen der Proben. Zwischen allen Behandlungsschritten wurde 3 mal 5 min mit PBS gewaschen.

2.3.4.2 Bestimmung von Stickstoffmonoxid durch DAF-2DA

Zur Detektion intrazellulär gebildeten NOs wurden 5×10^4 Zellen je Vertiefung in einer 6-Lochplatte mit Wachstumsmedium eingesäht. 24 h nach der Einsaat erfolgte die Stimulation mit den Testsubstanzen. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden die Zellen nur mit PBS gewaschen und anschließend sofort mit dem zellwandpermeablen Farbstoff DAF-2DA (Endkonzentration 10µM) 30 min bei 37 °C gefärbt. Hierbei wird der Farbstoff nach dem Durchtritt durch die Zellwand durch intrazelluläre Esterasen zu der für den Nachweis benötigten, jedoch noch ungefärbten Form Diaminofluorescein umgewandelt. Die Spaltung der Estergruppen hat den Verbleib des negativ geladenen Restmoleküls in der Zelle zur Folge, da es nicht mehr die Zellwand passieren kann. Das intrazellulär vorhandene NO kann nun das Diaminofluorescein zu einem fluoreszierenden Triazol oxidieren.

Wird das entstandene Chromophor bei einer Wellenlänge von 495 nm von der Lichtquelle des Mikroskops angeregt, so kann in den Vertiefungen der 6-Lochplatte eine grüne Fluoreszenz mit einem Emissionsmaximum bei 515 nm innerhalb der Zellen

beobachtet werden.

2.3.5 Zellproliferationsmessungen

Die Proliferation der Zellen wurde über den Einbau von radioaktiv markiertem [³H]-Thymidin in die neu gebildete DNA sich teilender Zellen gemessen. Dazu wurden 1×10^5 MIN-6-Zellen je Vertiefung einer 6-Loch-Platte im Wachstumsmedium eingesetzt. Einen Tag nach der Einsaat erfolgte, nach einem Wechsel auf Basalmedium, die Inkubation der Testsubstanzen. 4 h vor Stimulationsende wurde den Zellmedien 2 μ Ci Methyl-³H-Thymidin pro Vertiefung der Zellkulturplatte zugesetzt. Nach dem Ende der Stimulation wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und mittels Inkubation mit 10 %iger Trichloressigsäure für 30 min eine Denaturierung und Anhaftung der Zellen an die Kulturschale forciert. Nach zwei weiteren 10-minütigen Inkubationsschritten mit 5 %iger Trichloressigsäure wurden, ohne zu waschen, bei Raumtemperatur 300 μ L Lysepuffer zugegeben und die Zellreste mit der präzipitierten DNA mit einem Zellschaber abgekratzt. Diese wurden anschließend in einem Szintillationsröhrchen mit 5 ml Szintillatorlösung vermischt und nach einer Wartezeit von etwa 4h in einem Flüssigszintillationsspektrometer vermessen. Der Einbau des [³H]Thymidin in die DNA ist proportional zur Proliferationsrate der Zellen.

2.3.6 Bestimmung der Apoptoserate

2.3.6.1 Durchflusszytometrie

Zur Sortierung und Charakterisierung von Zellen und Zellbestandteilen zählen durchflusszytometrische Verfahren wie das Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) inzwischen zu den Verfahren der ersten Wahl, da sie sowohl Zelleigenschaften wie Größe und Granularität als auch, bei entsprechender Markierung mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern bzw. fluoreszierenden Farbstoffen, Proteinexpressionsmuster darstellen können. 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.

Zur Detektion apoptotischer Zellen wurden die Zellen mit zwei Markern gefärbt: Einerseits mit Allophycocyanin (APC)-gekoppeltem Annexin V, das spezifisch an in frühapoptotischen Zellen an der Außenseite der Plasmamembran exponiertem Phosphatidylserin bindet; andererseits wurde gleichzeitig eine Färbung mit Propidiumjodid (PI) durchgeführt, welches nur die Plasmamembran spätapoptotischer oder nekrotischer Zellen überwinden kann, um im Zellkern mit der DNA zu interkalieren. Durch diese Parallelfärbung ist eine Diskriminierung zwischen gesunden, früh- und spätapoptotischen Zellen möglich. Durch die überschneidungsfreien Extinktions- und Emissionsspektren der Farbstoffe und die Verwendung zweier Laser und entsprechend getrennter Photomultiplier zur Detektion konnte auf eine Kompensation verzichtet werden. Nach der Messung wurde auf die Hauptzellpopulation ein Gate angelegt und die prozentualen Anteile der Zellen in den unterschiedlichen Apoptosestadien über ein weiteres kreuzförmiges Gate ermittelt.

Zur Bestimmung der Apoptoserate wurden 10^5 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. Deshalb wurden die Zellen schon nach einem Tag Wachstum auf ein Basalmedium umgestellt und, nach Vorstimulation mit Testsubstanzen, für den angegebenen Zeitraum mit 40 ng/ml TNF α und 100 ng/ml Actinomycin D die Apoptose induziert.

Danach erfolgte die Aufbereitung der Zellen für die FACS-Analyse. Dazu wurde das Medium mit den darin enthaltenen apoptotischen oder nekrotischen Zellen abgenommen und in ein Rundboden-Röhrchen überführt. Die anhaftenden Zellen wurden mit Trypsinlösung und Stoppmedium geerntet, ebenfalls in das Röhrchen überführt und die Wells mit PBS gewaschen. Die vereinigten Zellsuspensionen wurden bei $300 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 5 min zentrifugiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit Annexin-Bindungspuffer inkl. Zentrifugation wurden die Zellen in 100 μl Bindungspuffer dispergiert und nach Angabe des Herstellers mit Annexin V-APC-Konjugat gefärbt. Nach zusätzlicher Färbung mit PI 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ für eine min wurden die Proben möglichst schnell durchflusszytometrisch vermessen.

Alle Arbeitsschritte nach dem Ernten der Zellen erfolgten auf Eiskühlung.

Zur Vermessung wurde zunächst eine vitale Zellpopulation in einem Dot Plot nach ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) gegeneinander aufgetrennt. Die zu untersuchende Hauptzellpopulation wurde durch Legen eines sogenannten „Gates“ ausgewählt, welches danach für alle Proben weiterverwendet wurde. Die Auswertung der Apoptoserate erfolgte je nach der fluoreszenzintensitätsabhängigen Verschiebung der gemessenen Zellen in einem Dotplot, in welchem der APC-Kanal (FL1) und der PI-Kanal (FL2) gegeneinander aufgetragen wurden. Zur Datenakquise wurde die jeweilige Software des Flowcytometers (Facs Diva für das FACS Canto II und FACStation für das FACS Calibur) benutzt. Die Datenauswertung erfolgte mit FlowJo (Tree Star Inc, United States) und Flowing Software 2.4.1 (Perttu Terho, Turku Zentrum für Biotechnologie, Universität Turku, Finnland). Die gemessenen Werte wurden als relative Apoptoserate auf den Mittelwert der jeweils nur mit TNF α und Actinomycin behandelten Probe (apoptotische Positivprobe) bezogen.

2.3.6.2 TUNEL- Färbung

Die sogenannte TUNEL- Färbung, oder auch „TdT-mediated dUTP-X nick end labeling“ stellt eine Möglichkeit zur in situ Visualisierung der Apoptose dar. Man bedient sich des Enzyms TdT (Terminale desoxynucleotidyltransferase), welches fluoreszenzmarkierte Nukleotide an während der Apoptose durch Strangbrüche freigelegte 3'-OH- Enden doppel- und einzelsträngiger DNA anknüpft. In dem verwendeten Kit wurde TMR (Tetramethylrhodamin)- markiertes dUTP (Uridintriphosphat) für die Markierung verwendet. Für die Färbung apoptotischer Zellen mittels des TUNEL-Assays wurden $2,5 \times 10^4$ Keratinozyten auf runden, zuvor sterilisierten Deckgläschen in 12-Loch Platten ausgesät. Die Apoptoseinduktion erfolgte nach Vorstimulation mit entsprechenden Untersuchungssubstanzen 16 h lang über Nacht. Nach Fixierung der Zellen mit 4 % Formaldehydlösung wurden die Zellen 2 min mit einem Permeabilisierungsreagenz durchlässig gemacht und anschließend 60 min bei 37 °C mit dem TUNEL Reaktionsmix, bestehend aus der Enzymlösung und der Markierungslösung, inkubiert. Nach Fixierung der Deckgläschen auf Objektträgern mittels Fluoromount wurden die Proben im Fluoreszenzmikroskop mit einer für den Markierungsfarbstoff

geeigneten Filtereinstellung betrachtet.

2.3.7 Untersuchung der mRNA-Transkription

2.3.7.1 Isolation der mRNA

Die Isolierung der Gesamt-mRNA aus Keratinozyten und MIN-6-Zellen erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen RNA-Isolierungskit über Säulenelution nach Vogelstein und Gillespie inklusive eines DNA-Verdaus durch DNase nach Angaben des Herstellers [322].

Vor der Extraktion wurden 1×10^6 Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und in Lysepuffer (4,5 M Guanidin-HCl, 50 mM Tris-HCl, 30 % Triton-X, pH 6,6) abgekratzt, was zur Zellyse und Inhibition von endogenen RNAsen führte. Die so gewonnenen Proben wurden in eine Glasfaser-Präparationssäule gegeben, in welcher Nukleinsäuren an das Filtermaterial gebunden werden. Das flüssige Filtrat wurde nach Zentrifugation der Proben durch die Säulen verworfen. Die an die Säule gebundene RNA wurde durch einen Verdau mit DNase von DNA-Resten gereinigt. Anschließende Waschschriffe mit verschiedenen zusammengesetzten Waschpuffern ließen eine weitere Aufreinigung der RNA durch Entfernung störender Salz-, Protein- und Zellreste zu. Die durch die Aufreinigung mit dem Kit gewonnene und in Aqua dest. gelöste RNA wurde bei Bedarf bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Quantifiziert wurde die RNA-Menge anschließend bei 260 nm in 10 mM Tris-HCl mittels eines UV-Spektrometers.

Über die Formel

$$[\text{Gesamt m-RNA}] = A_{260\text{nm}} \times 40 \times F$$

[Gesamt m-RNA] = Konzentration der RNA in $\mu\text{g/ml}$; $A_{260\text{nm}}$ = Absorption bei 260 nm; F = Verdünnungsfaktor

konnte die RNA-Konzentration berechnet werden.

Zur Überprüfung der Reinheit der isolierten Gesamt-RNA wurde der Quotient der Absorption bei 260 nm (Nucleinsäuren) und 280 nm (Proteine) gebildet. Um grö-

ßere Verunreinigungen ausschließen zu können, wurden nur Gesamt-RNA-Proben verwendet, bei welchen die Berechnung dieses Quotienten einen Wert von $> 1,6$ ergab.

2.3.7.2 cDNA-Synthese

Da für die Quantifizierung mit Real Time PCR DNA benötigt wird, wurde die aufgereinigte mRNA mittels einer Reversen Transkriptase und Oligo(dT)-Primern als Bestandteil eines cDNA-Synthese-Kits nach Angaben des Hersteller in einzelsträngige copy-DNA (cDNA) umgeschrieben. Es wurde jeweils 1 µg mRNA pro Ansatz umgeschrieben. Die Negativkontrollen enthielten an Stelle der Reversen Transkriptase DEPC-Wasser.

2.3.7.3 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR Technologie beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen Endpunkt-PCR, bietet aber zusätzlich die Möglichkeit der exakteren Quantifizierung. Die quantitative Echtzeitanalyse erfolgt über die Anregung und Messung eines in doppelsträngige DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes während eines jeden PCR-Zyklus'. Daher korreliert die Zunahme der Fluoreszenz mit der Zunahme an doppelsträngigen PCR-Amplifikaten. In dieser Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I in Form eines Master Mix' für den LightCycler 480 verwendet. Für die Amplifikation selbst wurde ein LightCycler480 der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) verwendet. Amplifiziert wurde die cDNA jeweils in Triplikaten in einer 96-Loch-Platte. Die Reaktionsansätze enthielten ein Endvolumen von 20 µl mit 2 µl Primerlösung (0,5 µM), 10 µl des zweifach konzentrierten SYBR Green I Master-Mix, 2 µl cDNA und RNase-freiem Wasser. Die Primer-Sequenzen wurden mit Hilfe der Software LaserGene (DNASar, Madison, USA) erstellt. Die RT-PCR der S1P-Rezeptoren wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt: 1. Initiale Denaturierung für GC-reiche Sequenzen: 10 min bei 95 °C 2. 45 Amplifikationszyklen: 10 sek. bei 95 °C, 10 sek. bei 60 °C (Hybridisierung), 10 sek. bei 72 °C (Elongation) im Single-Detect-Modus 3. Schmelzkurvenanalyse: 1 min bei 65 °C, dann mit 0,1 °C / sek. auf 97 °C bei Dauerdetektion. Anschließend wurde eine Schmelzkurvenanalyse

durchgeführt, um die Bildung von unspezifischen Primerdimeren zu kontrollieren. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe zweier Negativkontrollen, eine zur Überprüfung der cDNA-Synthese und eine zur Überprüfung des verwendeten DEPC-Wassers, gegen GAPDH und HPRT1 oder Cyclophilin A als Housekeeping-Gene normalisiert und nach der 2nd Derivative Max-Methode ausgewertet [323].

2.3.8 RNA-Interferenz (RNAi)

Die RNA-Interferenz ist ein Mechanismus zur zielgerichteten Repression von Genexpression in eukaryotischen Zellen durch Wechselwirkung von kurzen, doppelsträngigen Ribonukleinsäureresten, kurz small interfering RNA (siRNA), mit der mRNA der Zelle. Die mRNA kann in Folge dessen unter anderem durch mehrere Enzymkomplexe gespalten und eine Translation der auf der mRNA enthaltenen Information verhindert werden, es werden aber noch weitere Mechanismen diskutiert [324, 325]. Eine gezielte Spaltung von Ziel-mRNA wird durch Aufnahme der zum abzuschaltenden Zielgen komplementären siRNA in den zentral an der Wirkung beteiligten RNA-induced silencing complex (RISC) und die damit verbundene Steuerung der enzymatischen Abbaumechanismen erreicht [326].

2.3.8.1 Verwendung von siRNA

Vor Verwendung der siRNA wurden $2,5 \times 10^5$ (Fluoreszenzmikroskopie) oder $1,2 \times 10^6$ (Western Blotting, PCR) Keratinozyten in 6-Loch Platten ausgesät und nach 24 h Wachstum mit 1 ml Antibiotika-freier Transfektionslösung pro Well behandelt. In der nach Herstellerangaben gemischten Transfektionslösung des N-TER- Nanopartikeltransfektionssystem war die in DEPC-Wasser gelöste siRNA enthalten. Bei der Anwendung des N-TER -Transfektionssystem kommt es zum Einbau der siRNA in Nanopartikel, welche anschließend durch die Plasmamembran in die Zelle aufgenommen werden und dort die siRNA freigeben. Die verwendeten Konzentrationen an siRNA wurden so gewählt, dass als Endkonzentration 40 nM erreicht wurde. Neben zielgerichteter siRNA wurde zum Ausschluss möglicher unspezifischer Effekte der siRNA oder anderer Bestandteile der Transfektionslösung auch mit KontrollsiRNA gearbeitet, welche eine zufällige Kombination von Basen enthält, zu denen keine

komplementäre mRNA in der Zelle existiert. Nach sechsstündiger Inkubation der Zellen mit der siRNA im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ wurde auf Wachstumsmedium gewechselt und 24 h nach der Behandlung wurden die für die Versuche notwendigen Stimulationen durchgeführt.

Die S1P₃ siRNAs, eNOS siRNAs und die Kontroll-siRNAs wurden als vorgefertigte Sequenzen von Sigma-Aldrich erworben.

2.3.9 ESI-RRLC/MS/MS

Die Rapid Resolution Liquid Chromatography (RRLC) erlaubt unter auf den Analyten optimierten Bedingungen eine saubere Trennung der Einzelbestandteile eines Gemisches an Hand ihrer unterschiedlichen Affinitäten zu dem Fließmittel und dem Schichtmaterial der während der Chromatographie durchlaufenen Säule. Durch Kopplung an ein Tandemmassenspektrometer mit Ionenfalle können die mittels der RRLC aufgetrennten Bestandteile im ersten Schritt durch Bildung eines Pseudomoleküls im Electron Spray Ionisator (ESI) nach ihrer Molekülmasse sortiert werden, und es kann mit selektierten Molekülen definierter Masse (Precursor Ionen) weitergearbeitet werden. In unserem Fall wurde durch Einstellung der Ionenfalle auf m/z 380 das Pseudomolekülion des S1P durch das Gerät herausgefiltert. Diese Pseudomolekülionen werden dann im zweiten Schritt erneut durch ein Stoßgas ionisiert und in Fragmentationen zerlegt, welche dann quantitativ über Selected Reaction Monitoring (SRM) erfasst werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das Fragmention m/z 264, das durch Abspaltung der Phosphat- und der Alkoholgruppe entsteht, für die Quantifizierung des S1P herangezogen. Es wurde ein Quadrupol/Time Of Flight (QTOF) Massenspektrometer benutzt, welches mit einer RRLC-Einheit gekoppelt wurde.

Aufgrund der Eigenschaft von Sphingolipiden, an Glasoberflächen anzuhafte, war es erforderlich, während des gesamten Versuchs silikonisierte Glasgefäße zu verwenden.

Es wurden etwa 2×10^6 abtrypsinierte und mit PBS gewaschene Zellen zur Gehaltsbestimmung herangezogen. Die genaue Zellzahl wurde direkt nach dem Abstoppen des Trypsins durch Auszählung in einer Neubauer-Zählkammer be-

stimmt.

2.3.9.1 Bestimmung von S1P

Die Isolierung von S1P zur Bestimmung des Sphingolipidgehalts erfolgte nach einer Methode, welche auf einem modifizierten zweiphasigen Extraktionsverfahren unter Anwendung verschiedener pH-Bedingungen basiert[327, 328].

Säule	XBridge C18 RP, 3,5 µm, 4,6 x 150 mm mit Vorsäule von <i>Waters</i> , Eschborn, Deutschland
Mobile Phase A	Wasser mit 0,1% Ameisensäure
Mobile Phase B	Acetonitril : Tetrahydrofuran 1:1 (v/v) mit 0,1 % Ameisensäure
Injektionsvolumen	50µl
Gradient	ab Start: 42,5 % Mobile Phase B ab 9. min: 100 % Mobile Phase B ab 16. min: 42,5 % Mobile Phase B
Flußrate	0,5 ml/min
Säulentemperatur	28 °C
Autosamplertemperatur	4 °C
Ionen-Polarität	Positiv
Trocknungsgas Temperatur	300 °C
Trocknungsgas Flussrate	8 l/min
Verneblungsdruck	30 psig
Trägergas Temperatur	300 °C
Trägergas Flussrate	9 l/min
Kapillarspannung	5400 V
Düsenspannung	2000 V
Fragmentorspannung	200 V
Kollisionsenergie	15 V
Precursor- Ionen [M+H] ⁺	¹⁷ C-S1P: m/z 366,2404 S1P: m/z 380,256
Auswertung	¹⁷ C-S1P: m/z 250,2529 S1P: m/z 264,27
Detektionszeit	16 min + 7 min post run

Table 2.3.1: Geräteeinstellungen für die S1P-Bestimmung

Nach dem Aufschluss der Zellen durch Trypsinierung, Zentrifugation, Absaugen des Stopmediums, Aufnahme in Methanol / 0,25 % HCl und ihrer Homogenisierung im

Ultraschallbad während der Probenvorbereitung wurde die Probe zunächst alkaliert. Durch die Deprotonierung des Sphingolipids akkumuliert dieses aufgrund seiner nun hohen Polarität in der wässrigen Methanolphase, welche im nächsten Schritt durch Ansäuern und Protonierung das Sphingolipid in seine ungeladene Form zurückholt und so eine Extraktion in die Chloroformphase erlaubt. Jeder Extraktionsschritt wurde zweifach durchgeführt.

Nach dem Abdampfen des Chloroforms in einem Vakuumverdampfer wurden die Proben in Methanol aufgenommen und mittels ESI-RRLC/MS/MS analysiert.

Zur Bestimmung der Mengen an enthaltenem S1P und zur Bestimmung der Wiederfindungsrate des Extraktionsverfahrens wurde ein interner Standard aus natürlich nicht vorkommendem ^{17}C -S1P verwendet, sowie für jeden Lauf eine Standardgerade mit verschiedenen S1P- Konzentrationen erstellt.

2.3.10 Software

2.3.10.1 Statistik

Die vorgelegten Daten repräsentieren die Mittelwerte von in Wiederholung durchgeführten Versuchen unter Verwendung einer für die jeweilige Untersuchung charakteristischen Variablen. Die Standardabweichung diente als Maß für die Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert. Damit zusätzlich auch eine Aussage über eventuell vorhandene signifikante Unterschiede der verglichenen Mittelwerte getroffen werden konnte, erfolgte eine Auswertung der Ergebnisse mittels des nicht- parametrischen Mann-Whitney U-Rangsummentests für ordinalskalierte Messwerte, welcher auch Aussagen über sehr kleine Stichprobenzahlen mit nicht normalverteilten Messwerten erlaubt. Als Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % festgelegt. Ein Ergebnis war somit signifikant (markiert mit einem *), wenn ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ angenommen werden konnte.

2.3.10.2 Textverarbeitung und graphische Darstellung

Die vorliegende Arbeit wurde mit TEXlive 0.4.4 (*GPL*) geschrieben und gesetzt. Die deskriptive Statistik und die graphischen Abbildungen wurden mit OpenOffice Calc und Impress 3.4 (*Apache Software Foundation, Delaware, USA*) erstellt. Strukturformeln wurden mit ChemBio Draw Ultra 12.0.2 (*PerkinElmer Informatics, Cambridge, USA*) mit einer Lizenz der Freien Universität Berlin erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Interaktion von S1P mit dem Insulinsignalweg in den β -Zellen der Bauchspeicheldrüse

3.1.1 Geeignete Zelllinien

S1P vermittelt den größten Teil seiner Wirkungen über extrazelluläre GPCRs beispielsweise auch den antiapoptotischen Effekt in Keratinozyten und Fibroblasten [243, 329]. Im Hinblick auf die spezifischen zellulären Wirkungen der einzelnen Rezeptorsubtypen, die sich zum Teil stark unterscheiden oder sogar gegensätzliche Signalwege vermitteln, war es von Interesse, ob und in welchem Ausmaß S1P-Rezeptoren in den in der Arbeitsgruppe zur Verfügung stehenden β -Zelllinien exprimiert werden. Aus diesem Grund wurde eine spezifische Untersuchung von MIN-6 und INS-1e mRNA-Transkripten mit der Realtime-PCR durchgeführt. Die Daten wurden gegen die Referenzgene GAPDH und HPRT1 normalisiert. Abbildung 3.1.1 zeigt, dass alle fünf untersuchten S1P-Rezeptoren in MIN-6 Zellen exprimiert werden; allerdings ist bemerkenswert, dass der S1P₂-Rezeptor vergleichsweise stark exprimiert wird. Diese starke Expression des S1P₂-Rezeptors im Vergleich zu den restlichen S1P-Rezeptoren ist ebenfalls aus primären β -Zellen der Maus bekannt [330].

In Abbildung 3.1.2 wird deutlich, dass INS-1e Zellen ein stark verändertes S1P-Rezeptor-Expressionsmuster im Vergleich zu MIN-6 Zellen und primären β -Zellen zeigen. Im Gegensatz zu MIN-6 Zellen und primären Zellen wird in INS-1e Zellen der S1P₂-Rezeptor nur vergleichsweise gering exprimiert, der S1P₁-Rezeptor hingegen sehr stark.

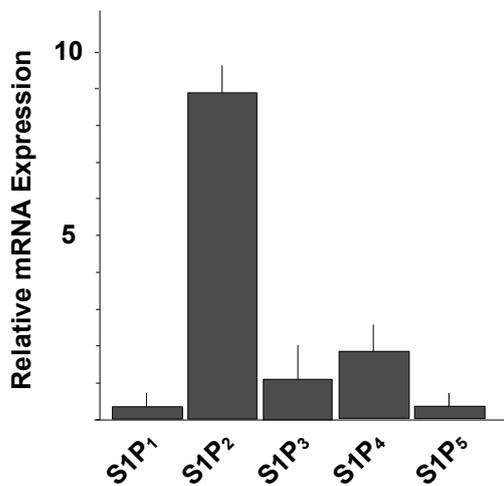


Abbildung 3.1.1: S1P-Rezeptorexpression in murinen β -Zellen (MIN-6). Murine β -Zellen (MIN-6) wurden für 24 h in Wachstumsmedium kultiviert, anschließend geerntet und mittels Realtime-PCR die mRNA-Expression der S1P-Rezeptoren bestimmt. Die Grafik zeigt die Mittelwerte einer Zweifachbestimmung mit Standardabweichung. Die Ergebnisse konnten jeweils in zwei weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert werden.

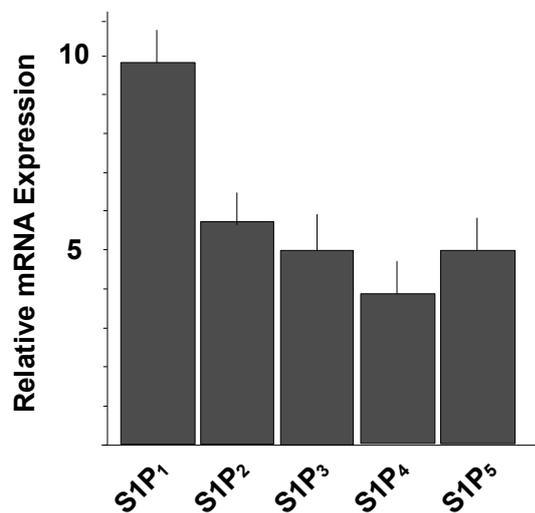


Abbildung 3.1.2: S1P-Rezeptorexpression in Ratten- β -Zellen (INS-1e). Ratten β -Zellen (INS-1e) wurden für 24 h in Wachstumsmedium kultiviert, anschließend geerntet und mittels Realtime-PCR die mRNA-Expression der S1P-Rezeptoren bestimmt. Die Grafik zeigt die Mittelwerte einer Zweifachbestimmung mit Standardabweichung. Die Ergebnisse konnten jeweils in zwei weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert werden.

Die folgende Arbeit wurde deshalb auf Untersuchungen an den Primären β -Zellen bezüglich des S1P-Rezeptorexpressionsmusters nächstehenden MIN-6 Zellen aufgebaut.

3.1.2 Bedeutung der Akt-Aktivierung im Insulinsignalweg

Von zentraler Bedeutung für die zuverlässige Bereitstellung des Insulins durch die Langerhans'schen Inseln im Pankreas ist das Gleichgewicht zwischen Wachstum und Apoptose innerhalb der Inseln, sodass durch eine ausreichende Anzahl funktionaler β -Zellen genug Insulin zur Glucoseverwertung ausgeschüttet werden kann. Bei krankhaften Veränderungen in der Regulation des Blutglucosespiegels wie Diabetes Typ 2, oder auch schon der Vorstufe, dem Metabolischen Syndrom, wird eine Fehlregulation des Gleichgewichts zwischen Apoptose und Proliferation der insulinproduzierenden β -Zellen diskutiert [331]. Hierbei spielen zahlreiche Wachstumsfaktoren eine Rolle; einen entscheidenden Einfluss hat unter anderem die Autostimulation der Zellen durch das zelleigene Insulin. Insulin vermittelt seine Wirkung hauptsächlich über die dem Insulinrezeptor nachgeschaltete Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase Akt [332]. Die Akt-Kinase spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulation der zellulären Proliferation und zytoprotektiven Vorgängen [172].

Eine Modulation der Funktion, Apoptose und Proliferation pankreatischer β -Zellen ist beispielsweise durch HDL und LDL bekannt [333]. HDL und LDL sind als Speicherorte großer Mengen S1P bekannt [334].

Von besonderem Interesse war nun, eine eventuelle direkte Interaktion des in HDL und LDL gespeicherten S1P mit dem überlebenswichtigen Insulinsignalweg zu charakterisieren. Bekannt ist eine solche Wechselwirkung zwischen S1P und dem Insulinsignalweg beispielsweise aus Keratinozyten der Haut [248].

Die Aktivierung der Akt-Kinase wurde durch Detektion der speziell an Serin473 phosphorylierten Anteile mittels Western Blotting gemessen. Abbildung 3.1.3 zeigt die konzentrationsabhängige Induktion der Akt-Phosphorylierung durch Insulin nach 10 min Stimulationszeit in serum- und glucosefreiem Wachstumsmedium. Diese Phosphorylierung konnte allerdings beginnend 5 min nach der Stimulation in einem Zeitrahmen von etwa 30 min detektiert werden.

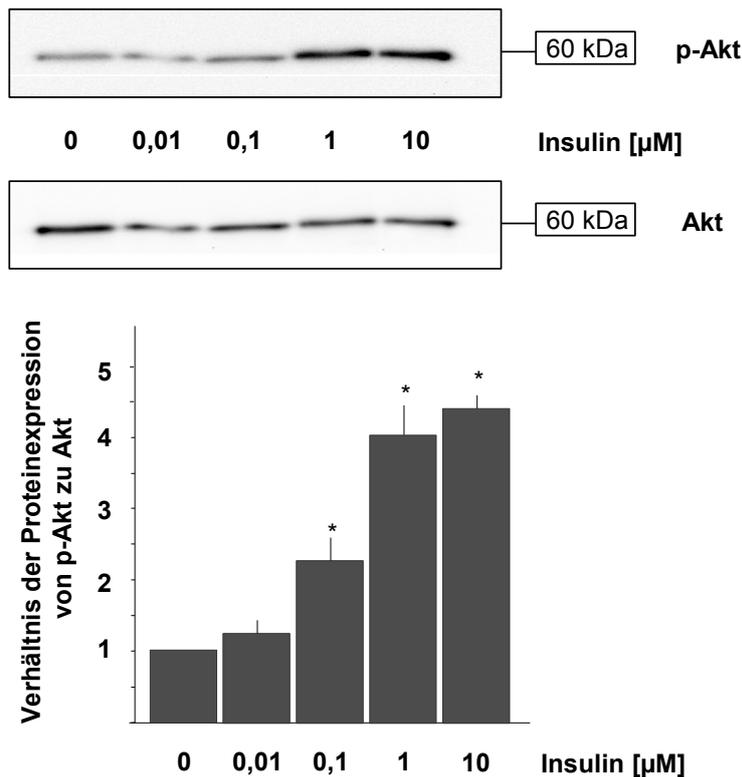


Abbildung 3.1.3: Aktivierung der Akt-Kinase durch Insulin. Murine β -Zellen (MIN-6) wurden nach Stimulation mit Insulin (10 min) durch Western Blotting unter Verwendung spezifischer Antikörper auf phospho-Akt (Ser473) untersucht. Die Abbildung zeigt exemplarisch einen Blot aus der Versuchsreihe. Die Quantifizierung erfolgte densitometrisch. Die Grafik zeigt die Mittelwerte einer Zweifachbestimmung mit Standardabweichung. Die Ergebnisse konnten jeweils in drei weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert werden. * $p \leq 0,05$ bezogen auf die unstimulierte Kontrolle.

3.1.3 Einfluss von S1P auf die insulinvermittelte Akt-Aktivierung

In vielen Zelllinien können sowohl Insulin als auch S1P bei alleiniger Administration eine Aktivierung der Akt-Kinase auslösen. In Keratinozyten wurde allerdings eine Wechselwirkung der beiden Signalwege beschrieben, die überraschenderweise zu einer verminderten Aktivierung des Akt-Signalweges durch Insulin nach Vorstimulation mit S1P, und demzufolge auch reduzierter Proliferation führte [329]. Um eine etwaige Wechselwirkung auch in β -Zellen zu untersuchen wurden MIN-6-Zellen in serum- und glucosefreiem Wachstumsmedium konditioniert und vor der Stimulation mit Insulin unterschiedlich lange mit verschiedenen S1P-Konzentrationen vorbehandelt.

Hierbei konnte bewiesen werden, dass S1P auch in pankreatischen β -Zellen die insulininduzierte Akt-Aktivierung vermindert (Abbildung 3.1.4).

Ein Wirkmaximum konnte nach 30 min Vorstimulation mit S1P beobachtet werden (Abbildung 3.1.5).

Abbildung 3.1.4: Hemmung der insulininduzierten Akt-Aktivierung durch S1P. Murine β -Zellen (MIN-6) wurden 30 min mit S1P vorbehandelt, nachfolgend 10 min mit unterschiedlichen Insulinkonzentrationen stimuliert und durch Western Blotting unter Verwendung spezifischer AntiKörper auf phospho-Akt (Ser473) untersucht. Die Abbildung zeigt exemplarisch einen Blot aus der Versuchsreihe. Die Quantifizierung erfolgte densitometrisch. Die Grafik zeigt die Mittelwerte einer Zweifachbestimmung mit Standardabweichung. Die Ergebnisse konnten jeweils in zwei weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert werden.

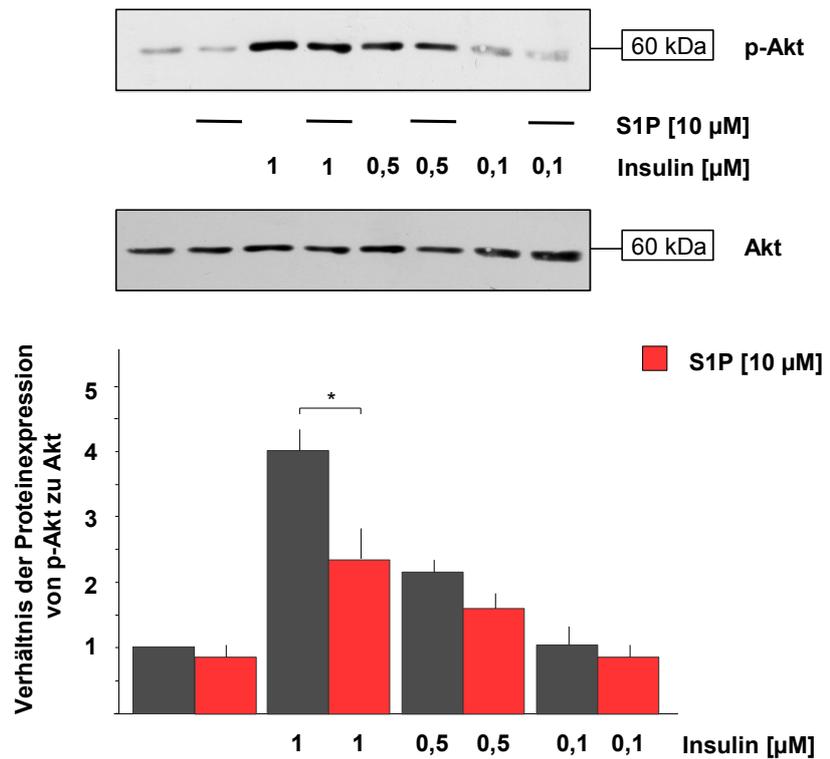
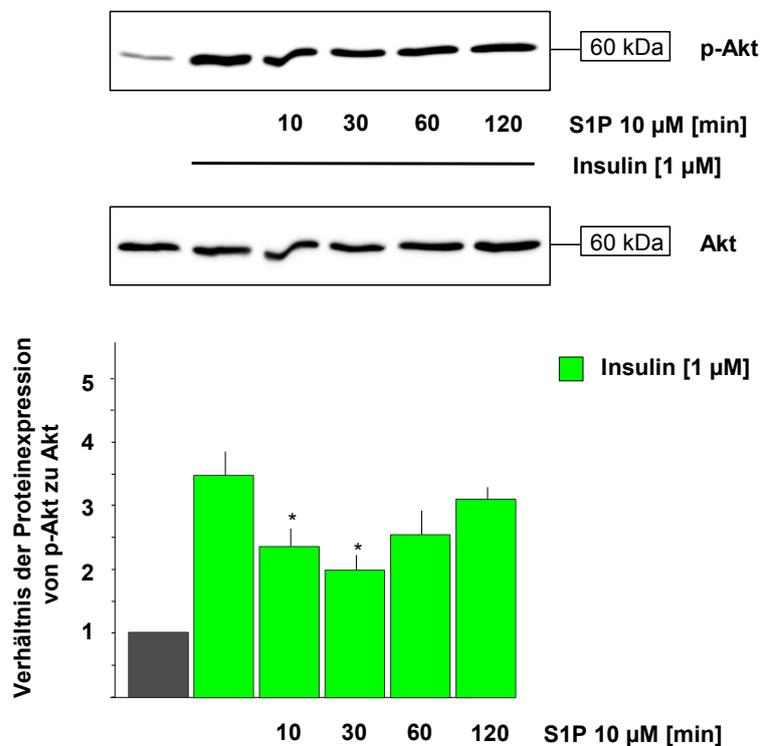


Abbildung 3.1.5: Maximale Hemmung der insulininduzierten Akt-Aktivierung bei 30 min Vorstimulation mit S1P. Murine β -Zellen (MIN-6) wurden mit 10 μ M S1P vorbehandelt, nachfolgend 10 min mit Insulin stimuliert und durch Western Blotting unter Verwendung spezifischer AntiKörper auf phospho-Akt (Ser473) untersucht. Die Abbildung zeigt exemplarisch einen Blot aus der Versuchsreihe. Die Quantifizierung erfolgte densitometrisch. Die Grafik zeigt die Mittelwerte einer Zweifachbestimmung mit Standardabweichung. Die Ergebnisse konnten jeweils in drei weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert werden. * $p \leq 0,05$ bezogen auf die Insulinstimulation.



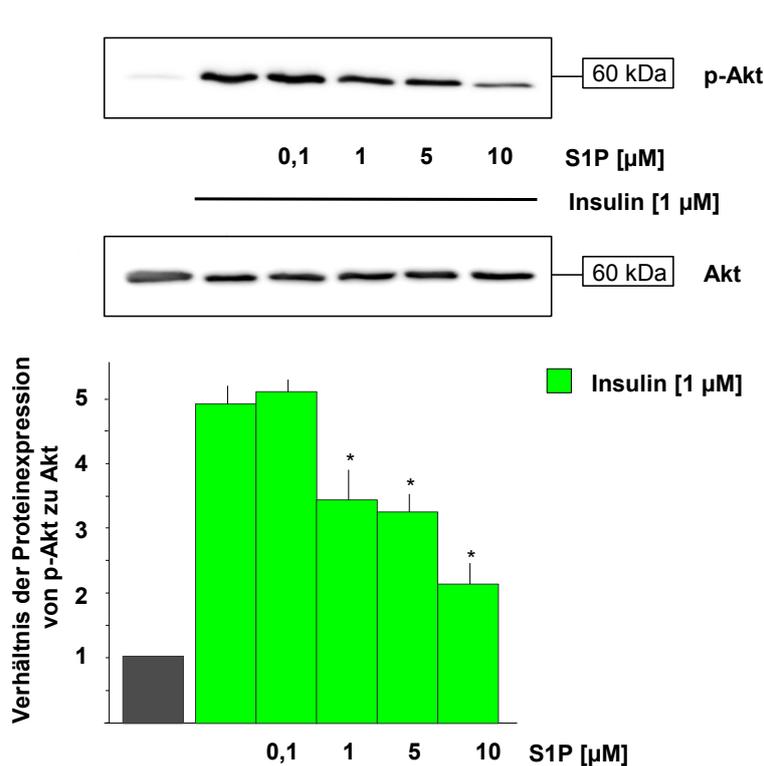


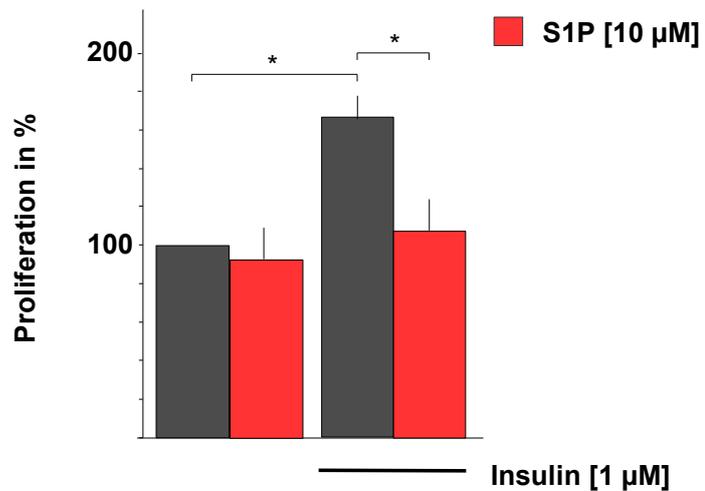
Abbildung 3.1.6: Maximale Hemmung der Akt-Aktivierung durch 10 μM S1P. Murine β-Zellen (MIN-6) wurden 30 min mit unterschiedlichen Mengen an S1P vorbehandelt, nachfolgend 10 min mit Insulin stimuliert und durch Western Blotting unter Verwendung spezifischer AntiKörper auf phospho-Akt (Ser473) untersucht. Die Abbildung zeigt exemplarisch einen Blot aus der Versuchsreihe. Die Quantifizierung erfolgte densitometrisch. Die Grafik zeigt die Mittelwerte einer Zweifachbestimmung mit Standardabweichung. Die Ergebnisse konnten jeweils in drei weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert werden. * $p \leq 0,05$ bezogen auf die Insulinstimulation.

In Übereinstimmung mit den Resultaten in Keratinozyten konnte auch in β-Zellen eine maximale Hemmung durch eine 10 μM S1P-Lösung erzielt werden (Abbildung 3.1.6). Eine Hemmung der insulininduzierten Akt-Aktivierung trat ab 1 μM S1P auf. Eine Stimulation mit höher als 20 μM konzentrierten S1P-Lösungen führte zur Ablösung der Zellen und wurde deshalb nicht weiter verfolgt.

3.1.4 Einfluss von S1P auf die insulinvermittelte Zellproliferation

Durch eine Hemmung der insulinvermittelten Akt-Aktivierung könnte S1P maßgeblich in die durch Insulin regulierten Regenerationsmechanismen wie beispielsweise die Zellproliferation eingreifen. Die Zellproliferation wird in starkem Maße über die Aktivierung des Akt- Signalweges gesteuert. Sie spielt eine wichtige Rolle bei der Regeneration von β-Zellen im Pankreas, besonders bei der Neubildung des Pankreas' im Entwicklungsstadium. Eine verminderte Regenerationsfähigkeit der β-Zellen des Pankreas' wird mit dem Fortschreiten von Typ-2- Diabetes in Verbindung gebracht. Um die Proliferation der MIN-6- Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen 30 min lang mit S1P vorbehandelt und schließlich für 6 h mit Insulin stimuliert. Es konnte ge-

Abbildung 3.1.7: Hemmung der insulininduzierten Proliferation durch S1P. Murine β -Zellen (MIN-6) wurden 30 min mit S1P vorbehandelt, nachfolgend 6 h mit Insulin stimuliert und die Proliferation durch Quantifizierung des über 4 h inkorporierten ^3H -Thymidins bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte über Flüssigscintillation. Jeder Einzelwert wurde auf die ausschließlich mit Vehikel behandelte Kontrolle bezogen. Die Grafik zeigt die Mittelwerte einer Zweifachbestimmung mit Standardabweichung. Die Ergebnisse konnten jeweils in fünf weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert werden.



zeigt werden, dass eine Vorbehandlung der Zellen mit 10 μM S1P die insulininduzierte Proliferation der Zellen signifikant senkte (Abbildung 3.1.7).

3.1.5 Einfluss von S1P auf die antiapoptotische Wirkung des Insulins

Insulin kann über die Akt-Kinase auch maßgeblichen Einfluss auf das Zellüberleben nehmen, namentlich wird in β -Zellen durch Insulin die Apoptoserate vermindert [335]. Hierbei werden zum Beispiel die Funktionen proapoptotischer Proteine aus der Bcl2-Familie reguliert [208]. Besonders hinsichtlich der erhöhten Apoptoseraten in den Langerhans'schen Inseln von Typ 2-Diabetikern könnte eine Störung des insulingesteuerten Zellüberlebens durch S1P eine kritische Rolle im Fortschreiten der Krankheit darstellen.

Zur Bestimmung der Apoptoserate wurden MIN-6-Zellen nach dem Anwachsen in serum- und glucosefreiem Wachstumsmedium konditioniert, 30 min lang mit S1P vorbehandelt und danach für 10 min mit Insulin stimuliert. Die Apoptose wurde 4 h lang mit einer Mischung aus $\text{TNF-}\alpha$ und dem Transkriptioninhibitor Aktinomycin D ausgelöst. Die quantitative Vermessung apoptotischer Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie im Anschluß an eine Färbung der Zellen mit fluoreszenzmarkiertem Annexin V als Apoptosemarker und PI als Nekrosemarker.

Die Bilder A und B in Abbildung 3.1.8 auf Seite 83 zeigen, dass die Stimulation der β -Zellen mit $\text{TNF}\alpha$ und Actinomycin D zu einer starken Zunahme der mit Annexin V anfärbbaren, apoptotischen, sowie der mit Annexin V und PI gleichzeitig gefärbten, spätapoptotischen Zellen führte. Eine Vorinkubation mit Insulin für 10 min führte zu einer Abnahme der doppelt gefärbten, spätapoptotischen Zellen (Bild C). Die durch $\text{TNF}\alpha$ und Actinomycin induzierte Apoptose wurde also durch Insulin auf 72 % der apoptotischen Kontrolle gehemmt. Eine leichte Hemmung der Apoptoserate konnte ebenfalls durch Vorinkubation mit S1P für 30 min erreicht werden. Eine solche Hemmung der Apoptose durch alleinige Vorinkubation mit S1P ist bereits in mehreren Zelltypen bekannt. Wurden die Zellen allerdings mit einer Kombination aus S1P und Insulin stimuliert bevor die Apoptose ausgelöst wurde, so wurde die antiapoptotische Wirkung des Insulins stark vermindert und die Apoptoserate stieg im Vergleich zu alleiniger Stimulation mit Insulin signifikant auf 95 % der apoptotischen Kontrolle an. Das bedeutet, nur durch Vorstimulation mit S1P wurde die Apoptoserate im Vergleich zu alleiniger Vorstimulation mit Insulin um 23 % erhöht.

3.1.6 Charakterisierung der an der Hemmung der Akt-Aktivierung durch S1P beteiligten S1P-Rezeptoren

3.1.6.1 Beeinflussung der S1P-Wirkung auf die Akt-Aktivierung durch PTX

Da für die Wirkungen des S1P allgemein sowohl intrazelluläre Ziele als auch die membranständigen, G-Proteingekoppelten S1P-Rezeptoren in Frage kämen, sollte durch den Einsatz des G_i -Proteinhemmstoffes PTX überprüft werden, ob die hemmende Wirkung des S1P auf die insulinvermittelte Akt-Aktivierung über GPCR ausgelöst wird.

PTX vermittelt eine Ribosylierung des ADP an den $G_{\alpha i}$ - Untereinheiten der G- Proteine und bewirkt dadurch, dass keine intrazellulären Signalkaskaden durch das an der α - Untereinheit gebunden bleibende GDP aktiviert werden können.

Durch Vorbehandlung der MIN-6 Zellen mit PTX konnte die Wirkung des S1P auf die insulinvermittelte Akt-Aktivierung aufgehoben werden (Abbildung 3.1.9).

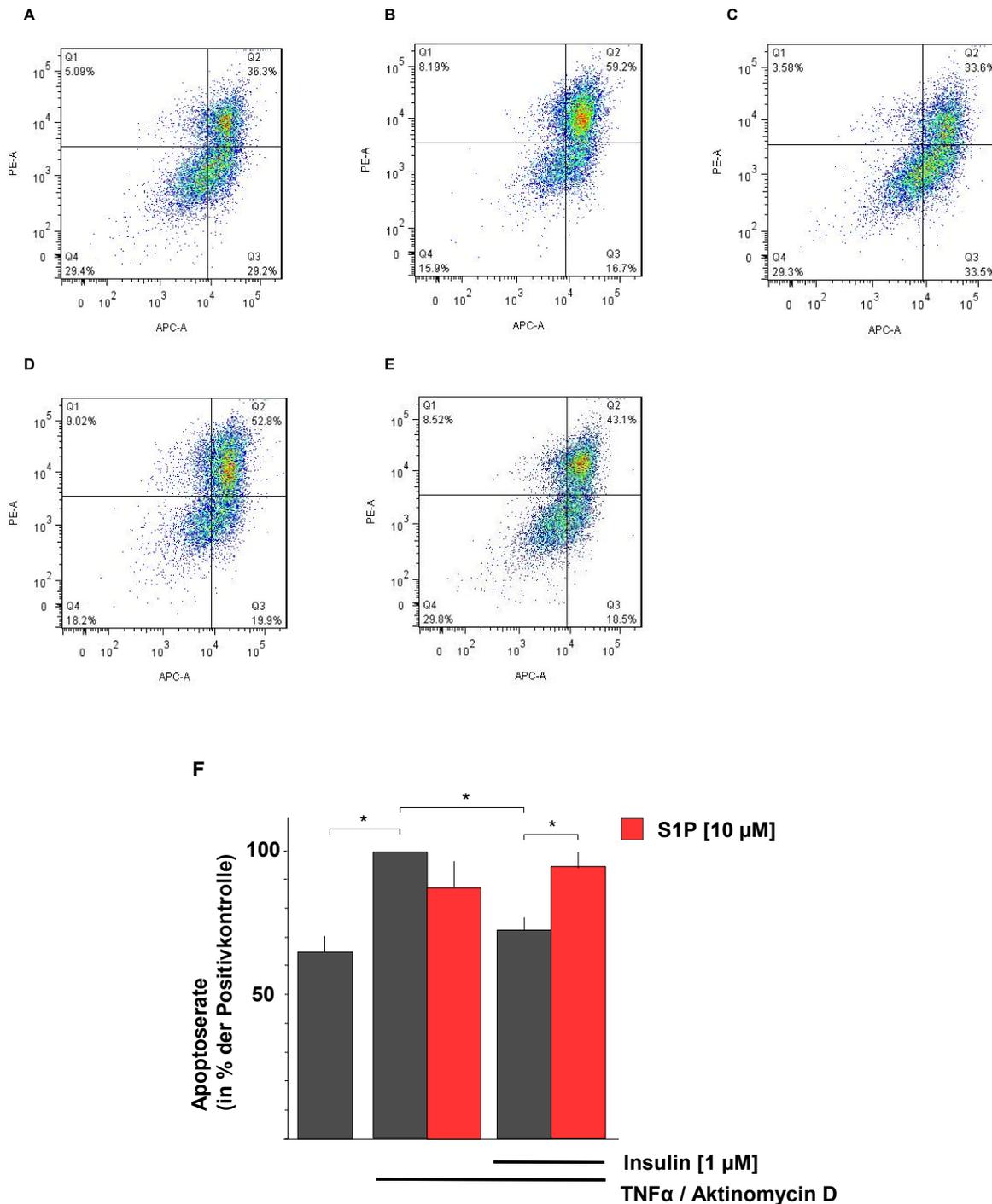


Abbildung 3.1.8: S1P hemmt die antiapoptotische Wirkung des Insulins. Murine β -Zellen (MIN-6) wurden für 4 h mit Kontrollvehikeln (A), mit $\text{TNF}\alpha$ und Actinomycin D (B), 10 min mit 1 μM Insulin, danach für 4 h mit $\text{TNF}\alpha$ und Actinomycin D (C), 30 min mit S1P, danach für 4 h mit $\text{TNF}\alpha$ und Actinomycin D (D) oder für 30 min mit S1P, danach für 10 min mit 1 μM Insulin und 4 h mit $\text{TNF}\alpha$ und Actinomycin D (E) behandelt. Die Apoptoseraten wurden durchflusszytometrisch bestimmt. A-E stellen DotPlots eines exemplarischen Experiments dar (PE: Fluoreszenzintensität Propidiumjodid; APC: Fluoreszenzintensität Annexin V- APC- Konjugat). Jeder Einzelwert wurde auf die ausschließlich mit $\text{TNF}\alpha$ und Actinomycin D behandelte Kontrolle bezogen. Die Grafik zeigt die Mittelwerte einer Zweifachbestimmung mit Standardabweichung. Die Ergebnisse konnten jeweils in drei weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert werden.

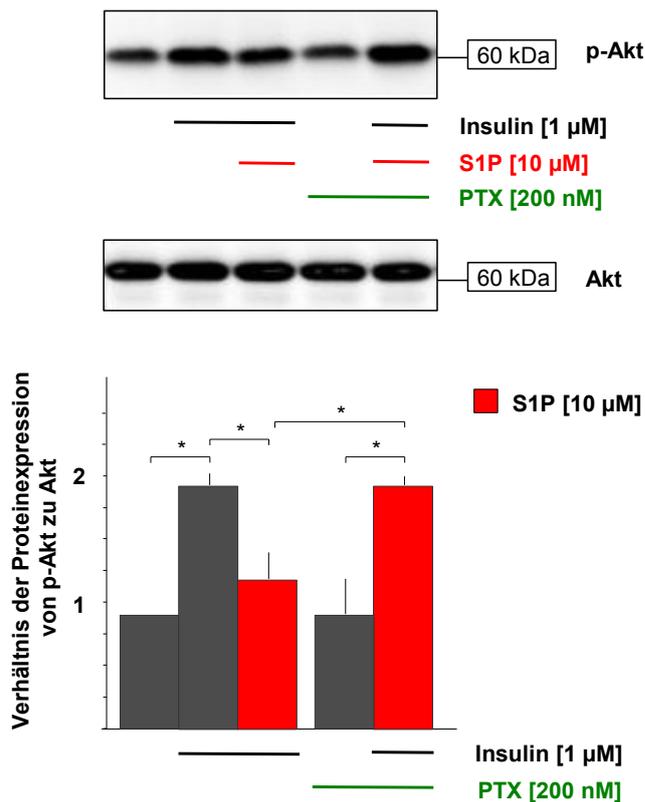


Abbildung 3.1.9: Einfluss von PTX auf die Hemmung der Akt-Aktivierung durch S1P. Murine β -Zellen (MIN-6) wurden 60 min mit PTX vorbehandelt, nachfolgend 30 min mit S1P inkubiert und 10 min mit Insulin stimuliert. Die Auswertung erfolgte über Western Blotting unter Verwendung spezifischer AntiKörper auf phospho-Akt (Ser473). Die Abbildung zeigt exemplarisch einen Blot aus der Versuchsreihe. Die Quantifizierung erfolgte densitometrisch. Die Grafik zeigt die Mittelwerte einer Zweifachbestimmung mit Standardabweichung. Die Ergebnisse konnten jeweils in zwei weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert werden.

3.1.6.2 Einfluss von S1P-Rezeptor-Modulatoren auf die Hemmung der Akt-Aktivierung durch S1P

Der an der Hemmwirkung des S1P auf die Akt-Aktivierung beteiligte S1P-Rezeptor sollte nun durch den Einsatz verschiedener spezifischer Agonisten und Antagonisten untersucht werden.

Aus Keratinozyten ist eine Wechselwirkung von S1P mit dem Insulinsignalweg und der Akt-Kinase über den S1P₂-Rezeptor bekannt, deshalb wurde bei den Experimenten besonderes Augenmerk auf eine eventuelle Wechselwirkung mit dem S1P₂-Rezeptor gelegt.

Es wurde JTE013, ein Antagonist des S1P₂-Rezeptors, und FTY720-P, die phosphorylierte Wirkform des FTY720 eingesetzt. FTY720-P wirkt an allen S1P-Rezeptoren mit Ausnahme des S1P₂ Rezeptors agonistisch. Des Weiteren wurden VPC23019, ein Antagonist am S1P₁- und S1P₃-Rezeptor, sowie VPC24191, ein Agonist am S1P₁- und S1P₃-Rezeptor, zur weiteren Überprüfung eingesetzt.

Die Hemmung der Insulin-vermittelten Akt Aktivierung durch S1P wurde in Gegenwart von JTE013 aufgehoben (Abbildung 3.1.10 A). Ein vergleichbares Ergebnis

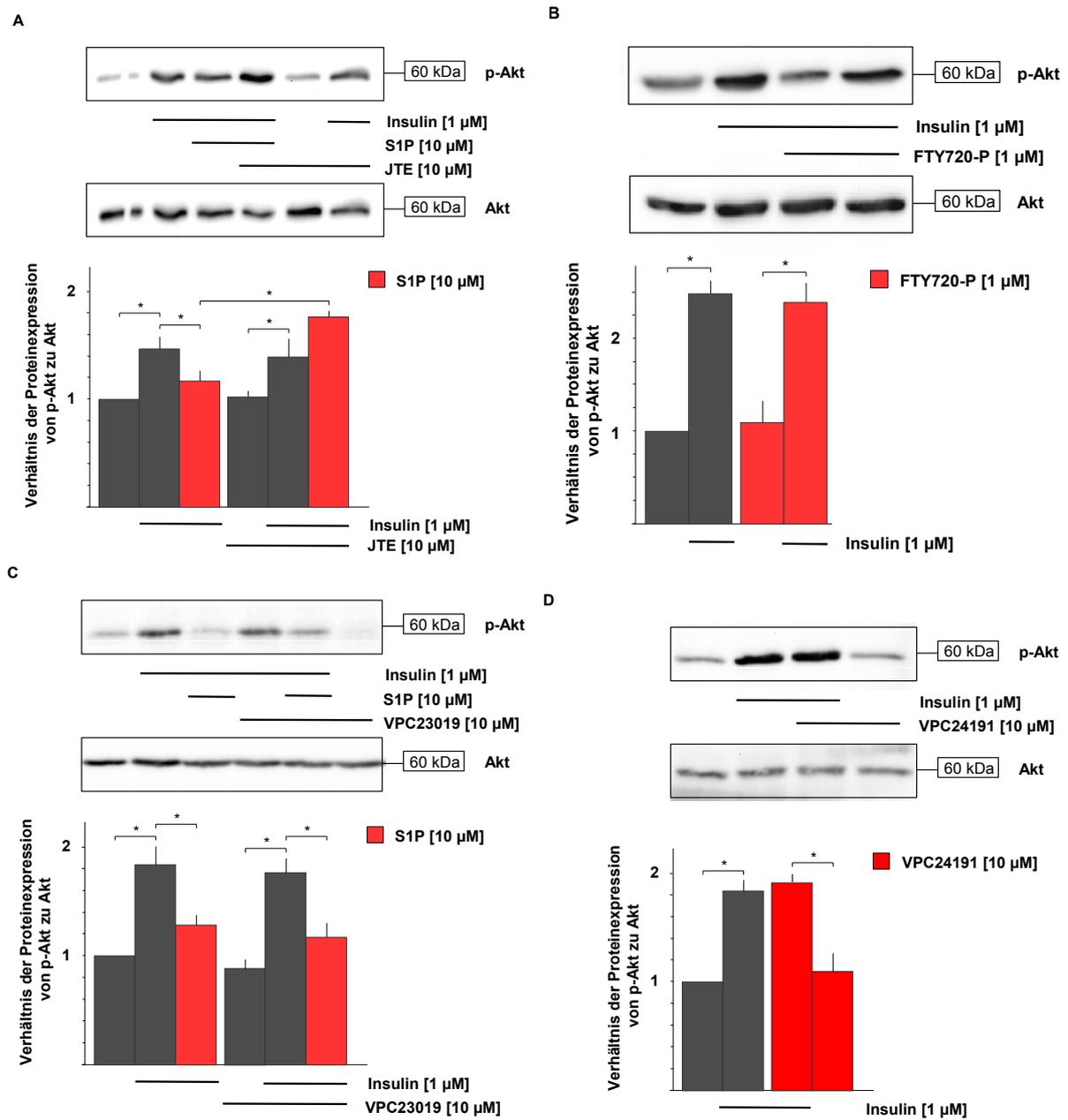


Abbildung 3.1.10: Einfluss von JTE013, FTY720-P, VPC23019 und VPC24191 auf die Hemmung der Akt-Aktivierung durch S1P. Murine β -Zellen (MIN-6) wurden mit JTE013 und S1P (A), FTY720-P (B), VPC23019 und S1P (C) oder VPC24191 (D) 30 min vorinkubiert und anschließend 10 min mit Insulin stimuliert. Die Auswertung erfolgte über Western Blotting unter Verwendung spezifischer AntiKörper auf phospho-Akt (Ser473). Die Abbildung zeigt exemplarisch einen Blot aus der Versuchsreihe. Die Quantifizierung erfolgte densitometrisch. Die Grafik zeigt die Mittelwerte einer Zweifachbestimmung mit Standardabweichung. Die Ergebnisse konnten jeweils in zwei weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert werden.

lieferte die Vorinkubation der Zellen mit FTY720-P anstelle von S1P. So wurde die Insulin-induzierte Phosphorylierung der Akt-Kinase durch die Vorbehandlung mit FTY720-P nicht beeinflusst (Abbildung 3.1.10 B).

VPC23019 zeigte keine Beeinflussung der hemmenden Wirkung des S1P auf die insulinvermittelte Akt-Phosphorylierung (Abbildung 3.1.10 C). VPC24191 konnte als Agonist am S1P₁- und S1P₃-Rezeptor keine Hemmung der insulininduzierten Akt-Aktivierung bewirken (Abbildung 3.1.10 D).

3.1.6.3 Einfluss von S1P-Rezeptormodulatoren auf die insulininduzierte Proliferation

Die Ergebnisse zur Beeinflussung der insulininduzierten Akt-Aktivierung durch S1P-Modulatoren weisen auf eine Beteiligung des S1P₂-Rezeptors hin. Die Verwendung der Modulatoren in der Proliferationsmessung untermauerten die im Western Blotting erhaltenen Ergebnisse und deuteten ebenfalls auf eine Beteiligung des S1P₂-Rezeptors hin (Abbildung 3.1.11). Durch Behandlung der Zellen mit JTE013 konnte der proliferationshemmende Effekt des S1P wieder aufgehoben werden, durch FTY720-P und VPC24191 wurde die insulininduzierte Proliferation nicht gehemmt und durch den S1P₁- und S1P₃-Rezeptorantagonisten VPC23019 wurde die proliferationshemmende Wirkung des S1P nicht aufgehoben.

3.1.6.4 Einfluss von S1P-Rezeptormodulatoren auf die antiapoptotische Wirkung des Insulins

Die Ergebnisse zur Beeinflussung der Akt-Aktivität und der Proliferation lassen den Schluss zu, dass die durch S1P bewirkte Hemmung der Insulinwirkung über den S1P₂-Rezeptor vermittelt wird. Zur Bestätigung wurde FTY720-P in Kombination mit Insulin in einem Apoptoseexperiment eingesetzt. Die gleichzeitige Stimulation der MIN-6- Zellen mit FTY720-P und Insulin führte zu keiner Aufhebung des durch Insulin vermittelten antiapoptotischen Effekts durch FTY720-P. Dies war nicht verwunderlich, da FTY720-P keine Aktivität am S1P₂-Rezeptor besitzt und somit einen eventuell über den S1P₂-Rezeptor vermittelten, hemmenden Effekt auf die Insulinwirkungen nicht zu vermitteln vermag.

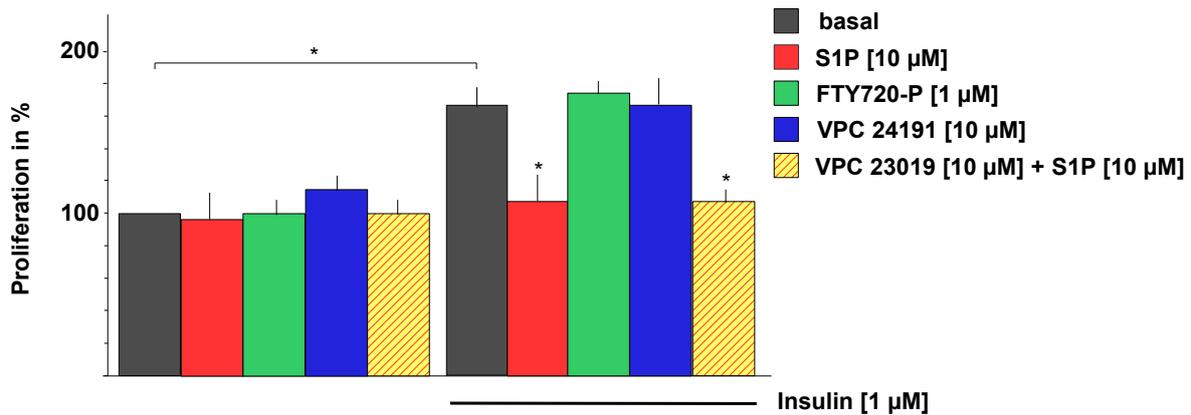


Abbildung 3.1.11: Einfluss von S1P-Rezeptormodulatoren auf die Proliferation muriner β -Zellen.

MIN-6- Zellen wurden 30 min mit S1P, VPC24191, S1P und VPC23019 oder FTY720-P vorbehandelt, nachfolgend 6 h mit Insulin stimuliert und die Proliferation durch Quantifizierung des über 4 h inkorporierten ^3H - Thymidins bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte über Flüssigscintillation. Jeder Einzelwert wurde auf die ausschließlich mit Vehikel behandelte Kontrolle bezogen. Die Grafik zeigt die Mittelwerte einer Zweifachbestimmung mit Standardabweichung. Die Ergebnisse konnten jeweils in zwei weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert werden. * $p \leq 0,05$ bezogen auf die Insulinstimulation.

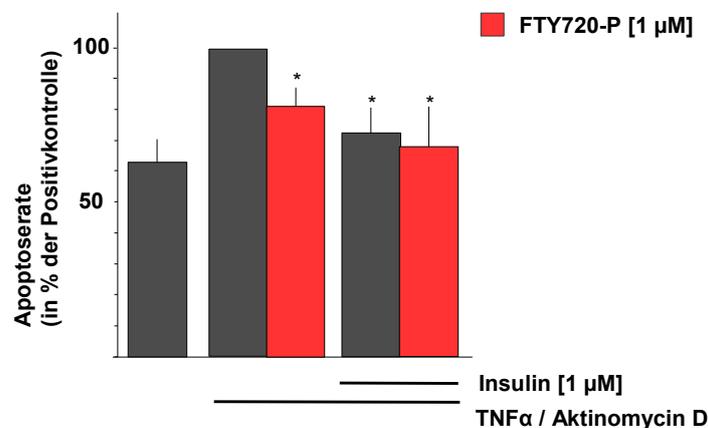


Abbildung 3.1.12: Einfluss von FTY720-P auf den antiapoptotischen Effekt des Insulins.

MIN-6- Zellen wurden 30 min mit FTY720-P vorbehandelt, nachfolgend 10 min mit Insulin und 4h mit TNF- α und Actinomycin D stimuliert. Die Apoptoseraten wurden durchflusszytometrisch bestimmt. Jeder Einzelwert wurde auf die ausschließlich mit TNF- α und Actinomycin D behandelte Kontrolle bezogen. Die Grafik zeigt die Mittelwerte einer Zweifachbestimmung mit Standardabweichung. Die Ergebnisse konnten in zwei weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert werden. * $p \leq 0,05$ bezogen auf die apoptotische Kontrolle.

3.2 Bedeutung von S1P in der Wirkung von Palmitat auf pankreatische β -Zellen

3.2.1 Regulation der Akt-Aktivierung durch Palmitat

Es ist hinlänglich bekannt, dass hohe Konzentrationen an freien gesättigten Fettsäuren wie Palmitinsäure im Blut adipöser Patienten mit T2DM negative Auswirkungen auf das Fortschreiten der Krankheit haben, beziehungsweise hohe Plasmakonzentrationen an FFA im Allgemeinen eine schlechte Prognose für T2DM darstellen. Dieses Zusammenspiel zwischen erhöhten Fett- und Glucosewerten im Blut und die damit verbundenen negativen Auswirkungen werden auch als Gluco- und Lipotoxizität bezeichnet. So konnte in diesem Zusammenhang unter anderem gezeigt werden, dass Palmitinsäure speziell die Apoptose pankreatischer β -Zellen begünstigt, die Neubildung und Proliferation verhindert sowie die Funktion der β -Zellen erheblich stört. Durch längere Behandlung von MIN-6 Zellen mit Palmitat konnte in der vorliegenden Arbeit eine Hemmung der überlebenswichtigen Akt-Aktivierung durch Palmitat nachgewiesen werden.

Hierbei wurden die Zellen ausgehend von 5 mM Glucose als normale Blutglucosekonzentration in gesunden Mäusen mit steigenden Glucosekonzentrationen behandelt. Die Aktivierung der Akt-Kinase erfolgte über das durch die Zellen nach Glucosegabe selbst gebildete und freigesetzte Insulin. Palmitat zeigte eine mit steigenden Glucosekonzentrationen verstärkt auftretende Hemmung der Akt-Kinase (Abbildung 3.2.1). Als optimale Stimulationskonzentration konnte innerhalb einer Konzentrationsreihe 0,3 mM Palmitat ermittelt werden, da auch nach weiterer Konzentrationssteigerung keine verstärkte Akt-Hemmung durch das Palmitat auftrat (Abbildung 3.2.2).

Abbildung 3.2.1: Einfluss von Palmitat auf die Akt-Aktivierung - Konzentrationsreihe Glucose. Murine β -Zellen (MIN-6) wurden für 24 h mit Palmitat und unterschiedlichen Glucosekonzentrationen stimuliert. Die Auswertung erfolgte über Western Blotting unter Verwendung spezifischer AntiKörper auf phospho-Akt (Ser473). Die Abbildung zeigt exemplarisch einen Blot aus der Versuchsreihe. Die Quantifizierung erfolgte densitometrisch. Die Grafik zeigt die Mittelwerte einer Zweifachbestimmung mit Standardabweichung. Die Ergebnisse konnten jeweils in drei weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert werden.

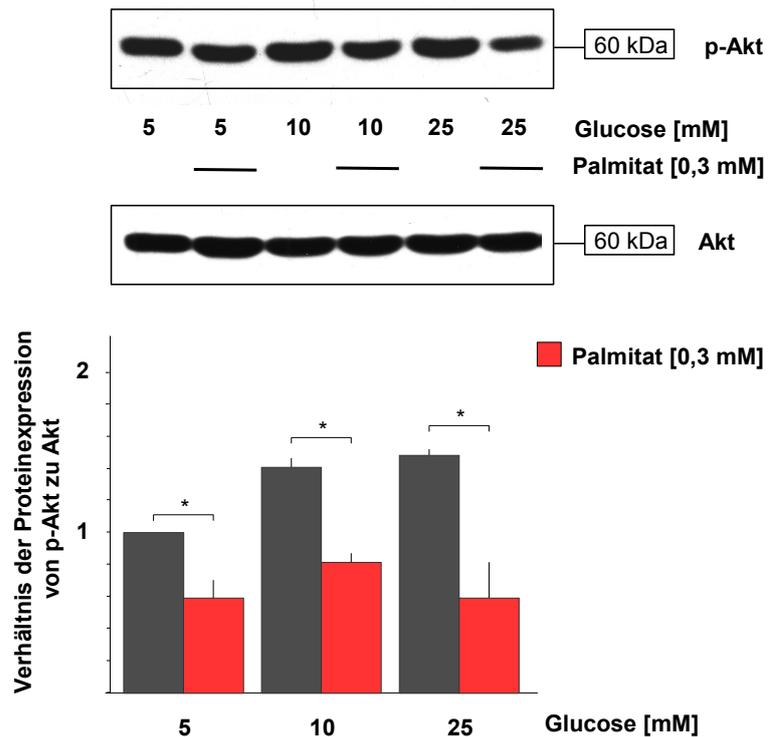
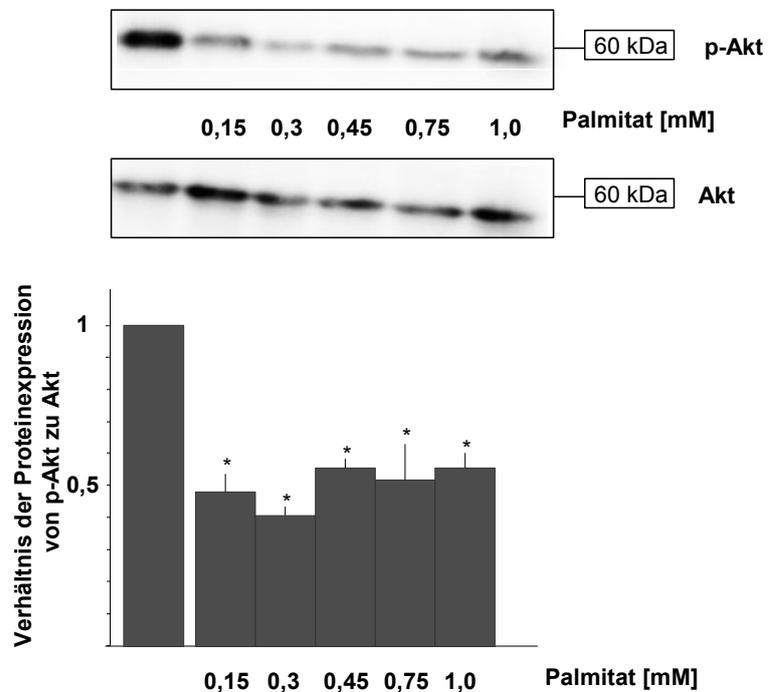


Abbildung 3.2.2: Einfluss von Palmitat auf die Akt-Aktivierung - Konzentrationsreihe Palmitat. Murine β -Zellen (MIN-6) wurden für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an Palmitat und 25 mM Glucose stimuliert. Die Auswertung erfolgte über Western Blotting unter Verwendung spezifischer AntiKörper auf phospho-Akt (Ser473). Die Abbildung zeigt exemplarisch einen Blot aus der Versuchsreihe. Die Quantifizierung erfolgte densitometrisch. Die Grafik zeigt die Mittelwerte einer Zweifachbestimmung mit Standardabweichung. Die Ergebnisse konnten in einem weiteren unabhängigen Experiment reproduziert werden. * $p \leq 0,05$ bezogen auf die unstimulierte Kontrolle.



3.2.1.1 Rolle von S1P in der Hemmung der Akt-Aktivierung durch Palmitat

Interessanterweise wäre über den *de-novo*-Syntheseweg des S1P aus Palmitat durch die Serin-Palmitoyltransferase ein Zusammenhang zwischen Palmitat- und S1P-Wirkungen denkbar, da Palmitat in Form von Palmitoyl-CoA auch als Edukt der Sphingolipidsynthese eine Rolle spielt.

Darauf aufbauend konnte die verminderte Akt-Aktivierung nach Einsatz von Palmitat durch einen Hemmstoff der Sphingolipidsynthese aufgehoben werden. In Abbildung 3.2.3 wird deutlich, dass die Phosphorylierung der Akt-Kinase nach Vorstimulation mit Myriocin, einem Hemmstoff der Serin-Palmitoyltransferase, trotz des Einsatzes von Palmitat nicht gesenkt werden kann.

Durch den Einsatz des S1P-Rezeptormodulators JTE-013 konnte des Weiteren eine mögliche Beteiligung des S1P₂-Rezeptors an der Palmitatwirkung auf die Akt-Aktivierung nachgewiesen werden (Abbildung 3.2.4 A). Durch JTE013 konnte der hemmende Effekt des Palmitats auf die Akt-Aktivierung stark abgeschwächt werden, was den S1P₂-Rezeptor als möglicherweise an der Wirkung des Palmitats beteiligten Rezeptor markiert. Durch Vorstimulation der Zellen mit dem S1P_{1,3}-Rezeptorantagonisten VPC 23019 konnte keine Beeinflussung des hemmenden Effekts durch Palmitat beobachtet werden (Abbildung 3.2.4 B), was eine Beteiligung dieser beiden Rezeptoren unwahrscheinlich macht.

Abbildung 3.2.3: Rolle der SPT in der Hemmung der Akt-Aktivierung durch Palmitat Murine β -Zellen (MIN-6) wurden 30 min mit Myriocin vorstimuliert und danach für 24 h mit Palmitinsäure und 25 mM Glucose inkubiert. Die Auswertung erfolgte über Western Blotting unter Verwendung spezifischer AntiKörper auf phospho-Akt (Ser473). Die Abbildung zeigt exemplarisch einen Blot aus der Versuchsreihe. Die Quantifizierung erfolgte densitometrisch. Die Grafik zeigt die Mittelwerte einer Zweifachbestimmung mit Standardabweichung. Die Ergebnisse konnten jeweils in drei weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert werden. $*p \leq 0,05$ bezogen auf die unstimulierte Kontrolle.

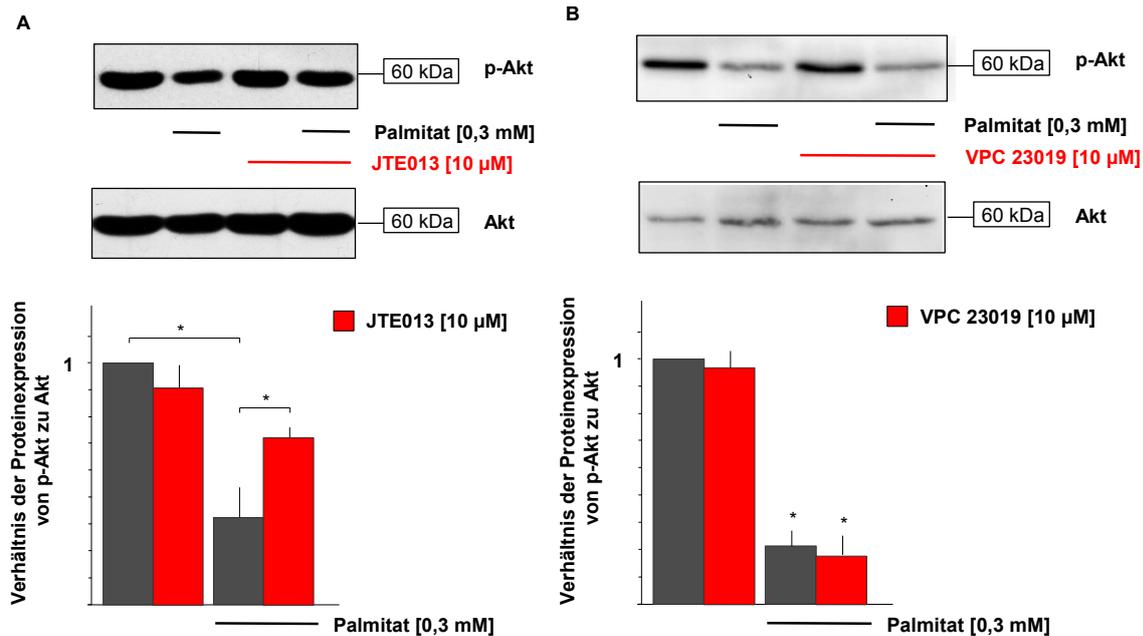
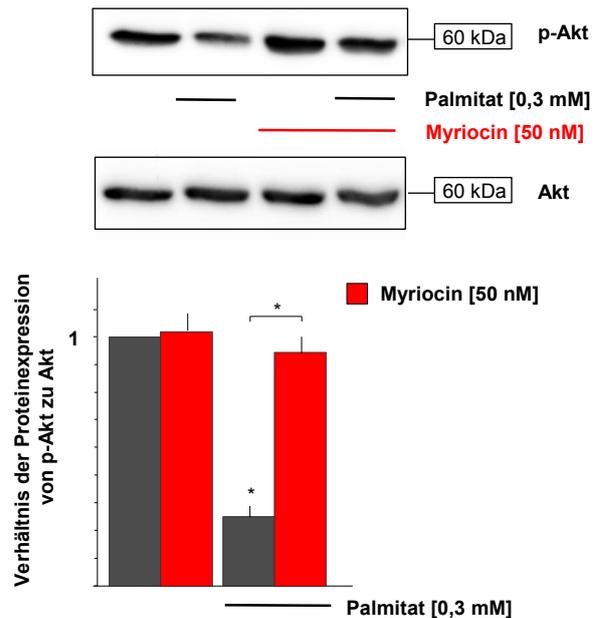


Abbildung 3.2.4: Beteiligte S1P-Rezeptoren in der Hemmung der Akt-Aktivierung durch Palmitat. Murine β -Zellen (MIN-6) wurden 30 min mit (A) JTE013 oder (B) VPC23019 vorstimuliert und danach für 24 h mit Palmitinsäure und 25 mM Glucose inkubiert. Die Auswertung erfolgte über Western Blotting unter Verwendung spezifischer AntiKörper auf phospho-Akt (Ser473). Die Abbildung zeigt exemplarisch einen Blot aus der Versuchsreihe. Die Quantifizierung erfolgte densitometrisch. Die Grafik zeigt die Mittelwerte einer Zweifachbestimmung mit Standardabweichung. Die Ergebnisse konnten jeweils in zwei weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert werden. $*p \leq 0,05$ jeweils bezogen auf die palmitatfreie Kontrolle.

3.2.2 Beeinflussung der S1P-Spiegel im Blut durch den Fettgehalt der Nahrung von Mäusen mit und ohne Prädisposition für T2DM

Die NZO- Maus gilt allgemein als repräsentatives Modell für nahrungsinduzierten T2DM [336]. Durch Fütterung mit hoch fetthaltigem und zuckerhaltigem Futter kann bei dieser Mauslinie innerhalb kürzester Zeit das typische Krankheitsbild des T2DM inklusive markanter β -Zelldysfunktion herbeigeführt werden.

Von besonderem Interesse waren nun eventuelle Unterschiede in der Metabolisierung der durch die Nahrung aufgenommenen Fette zwischen den diabetischen, übergewichtigen NZO- Mäusen und den gesunden C57BL/6- Kontroll- Mäusen im Hinblick auf die Möglichkeit der Metabolisierung von Palmitat zu S1P über die Serin-Palmitoyltransferase.

Es konnte gezeigt werden, dass bei Fütterung der NZO-Mäuse mit HFD die S1P-Werte im Blut auf das über 1,5-fache im Vergleich zu den mit SD gefütterten NZO-Mäusen anstiegen, während in den C57BL/6-Mäusen keine signifikante Veränderung der S1P-Spiegel im Vergleich der beiden Fütterungsarten auftrat.

Die Plasmaproben der Mäuse wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Schürmann (DIfE Nuthetal) zur Verfügung gestellt.

3.2.3 Beeinflussung der S1P-Spiegel in MIN-6 Zellen durch Stimulation mit Palmitat

Interessant war nun, ob sich diese Steigerung der S1P-Spiegel auch in der Zellkultur mit MIN-6 Zellen nachweisen lässt, um so eine direkte Verknüpfung zwischen den Palmitat- und S1P-Spiegeln herstellen zu können. Dazu wurden MIN-6 Zellen unterschiedlich lange mit Palmitat stimuliert und anschließend über eine LC/ESI-MS-Analyse die Menge an gebildetem S1P quantifiziert. Er zeigte sich eine von der Einwirkzeit des Palmitat abhängige Zunahme an S1P in den Zellen (Abbildung 3.2.6).

Die erhöhten S1P- Konzentrationen in MIN-6 Zellen nach Stimulation mit Palmitat konnten durch den Einsatz von Hemmstoffen der S1P-Synthese teilweise verhindert

Abbildung 3.2.5: Ernährungsabhängige S1P-Spiegel im Blut von NZO- und C57BL/6-Mäusen. Die Blutabnahme erfolgte nach mehrwöchiger Fütterung der speziellen Diäten aus der Schwanzvene. Zur Extraktion und Vermessung wurden 50 µl Blutplasma verwendet. Es wurden insgesamt 7 Tiere pro Gruppe vermessen. Die Graphik zeigt die Mittelwerte aller Tiere pro Gruppe mit Standardabweichungen.

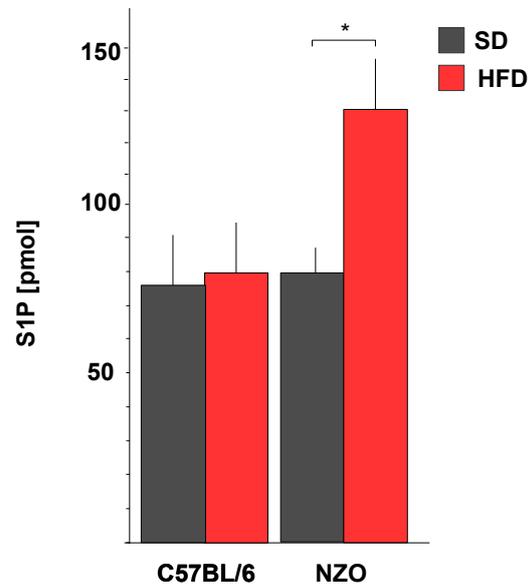
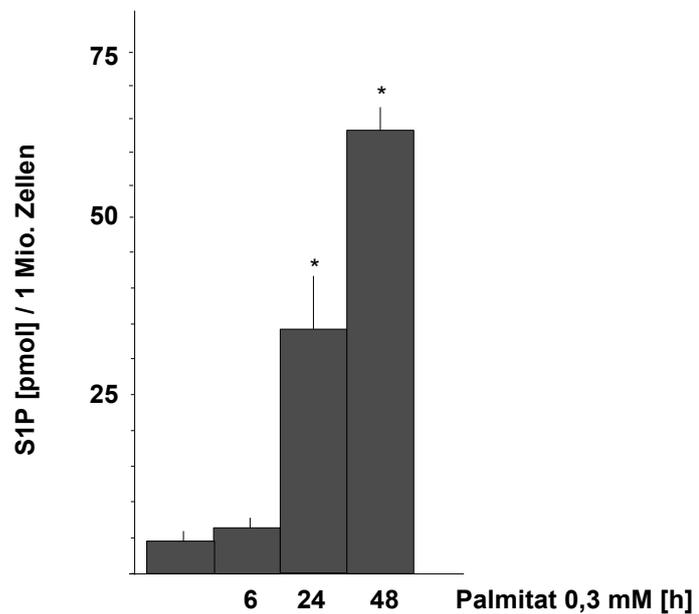


Abbildung 3.2.6: S1P-Spiegel in MIN-6 Zellen nach Stimulation mit Palmitat. MIN-6 Zellen wurden für 6, 24 und 48 h in Hochglucosemedium (25 mM Glucose) mit Palmitat stimuliert. Die S1P-Quantifizierung erfolgte mittels HPLC-MS. Die Grafik zeigt die Mittelwerte einer Zweifachbestimmung mit Standardabweichung. Die Ergebnisse konnten jeweils in drei weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert werden. * $p \leq 0,05$ bezogen auf die unstimulierte Kontrolle.



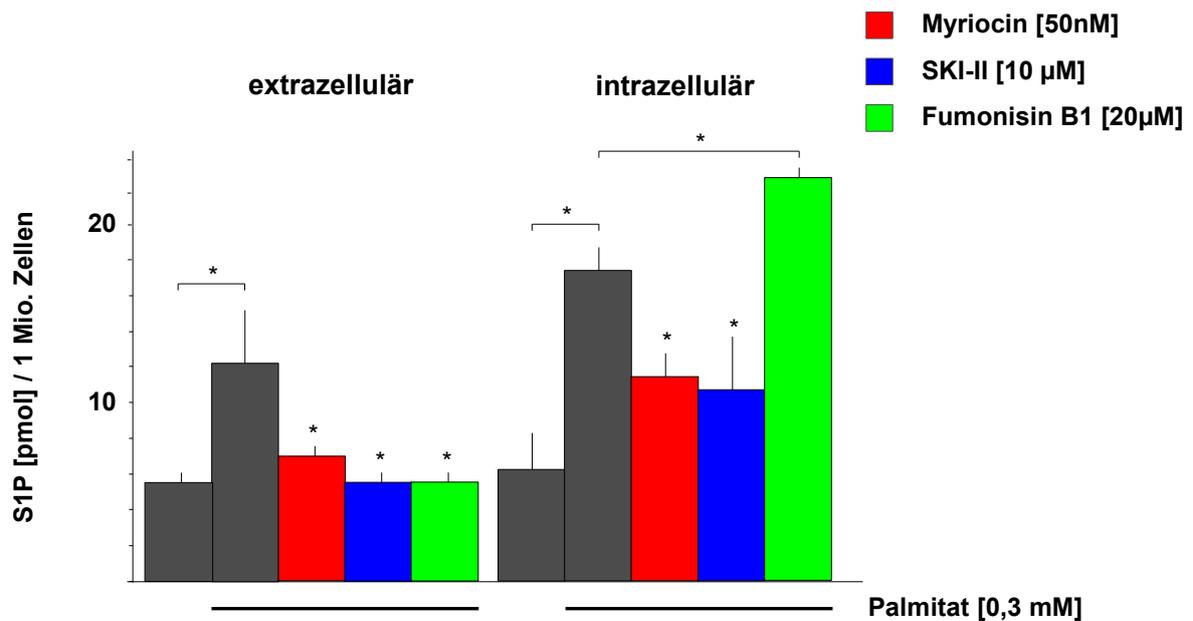


Abbildung 3.2.7: S1P-Spiegel in MIN-6 Zellen nach Stimulation mit Palmitat und Hemmstoffen der S1P- Synthese. MIN-6 Zellen wurden nach etwaiger Vorstimulation mit Hemmstoffen für 24 h in Hochglucosemedium (25 mM Glucose) mit Palmitat stimuliert. Die S1P- Quantifizierung erfolgte mittels HPLC-MS. Die Grafik zeigt die Mittelwerte einer Zweifachbestimmung mit Standardabweichung. Die Ergebnisse konnten jeweils in zwei weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert werden. * $p \leq 0,05$ bezogen auf die Palmitatstimulation.

werden (Abbildung 3.2.7). Dazu wurden die Zellen vor der Stimulation mit Palmitat mit Myriocin, SK1- II oder FB1 vorstimuliert. Diese Ergebnisse weisen stark darauf hin, dass die erhöhten S1P-Spiegel nach Palmitatstimulation sehr wahrscheinlich über eine gesteigerte *de-novo*-S1P- Synthese über die Serin- Palmitoyl- Transferase und die SphK zu Stande kommen. Da die S1P-Spiegel durch den Einsatz von FB1 intrazellulär noch stärker erhöht wurden, als durch alleinige Stimulation mit Palmitat scheinen allerdings auch maßgeblich alternative S1P-Ressourcen und besonders die korrekte Funktion der Ceramidsynthese eine große Rolle im Sphingolipidreostat der β -Zelle zu spielen.

3.2.4 Expression der SphK und SPL in MIN-6 Zellen

Ausser über eine erhöhte Produktion von S1P aus Edukten wie Palmitat, Ceramid oder Sphingosin über die SphK und die SPT könnten erhöhte S1P-Spiegel auch durch einen verminderten Abbau von S1P über die SPL zu Stande kommen.

Es war also von Interesse, den Expressionsstatus der speziell für den S1P-Metabolismus entscheidenden Enzyme SphK1, SphK2 und der SPL in MIN-6 Zellen zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurden auf Hochglucosemedium (25 mM Glucose) gezüchtete MIN-6 Zellen geerntet, und die mRNA- Expression der SphK1, der SphK2 und der SPL über eine RT- PCR untersucht (Abbildung 3.2.8).

3.2.5 Einfluss von Palmitat auf die Expression der SphK und SPL in MIN-6 Zellen

Um zu untersuchen, ob die Expression dieser S1P- auf- und abbauenden Enzyme durch Stimulation mit Palmitat beeinflusst werden kann, wurden anschließend mit Palmitat und Glucose stimulierte MIN-6 Zellen mittels PCR auf die Expressionsmuster der SphK1, der SphK2 und der SPL getestet.

Interessanterweise wurde durch Palmitat nicht nur die maßgeblich für die S1P-Produktion in der Zelle verantwortliche SphK1 in ihrer Expression hochreguliert, sondern gleichzeitig die abbauende SPL in ihrer Expression vermindert (Abbildung 3.2.9).

Dieses Zusammenspiel zwischen der erhöhten Eduktverfügbarkeit und der Regulation der entscheidenden Enzyme im S1P-Gleichgewicht durch Palmitat in Kombination mit Glucose begünstigt die Entstehung extrem erhöhter S1P-Spiegel bei gleichzeitigem Einwirken dieser beiden Komponenten auf die β -Zelle.

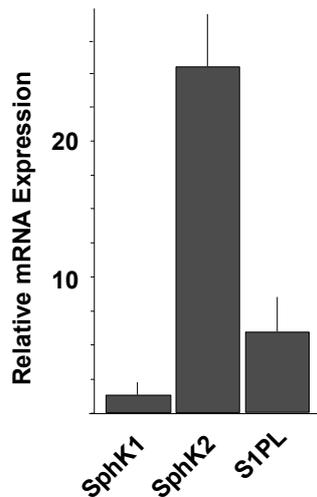


Abbildung 3.2.8: Expression regulatorischer Enzyme des S1P-Spiegels in MIN-6 Zellen Murine β -Zellen (MIN-6) wurden in Hochglucosemedium (25 mM Glucose) gezüchtet, anschließend geerntet und mittels Realtime-PCR die mRNA-Expression der SphK 1, der SphK 2 und der SPL ermittelt. Die Grafik zeigt die Mittelwerte einer Zweifachbestimmung mit Standardabweichung. Die Ergebnisse konnten jeweils in zwei weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert werden.

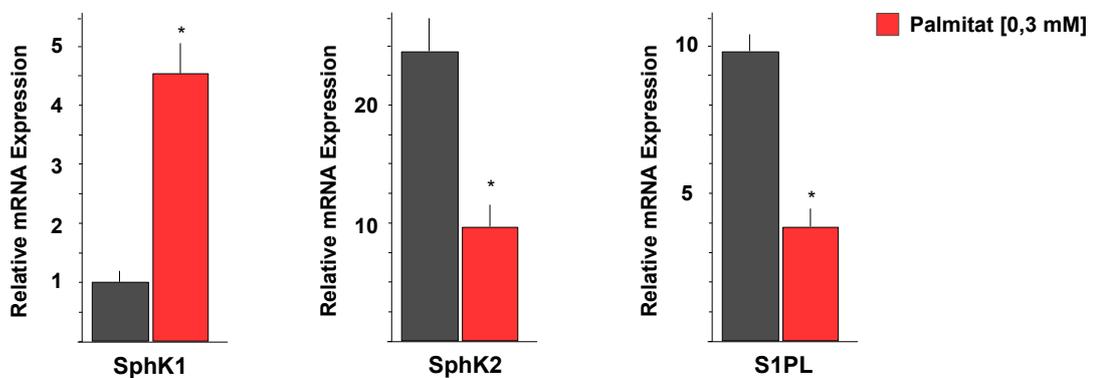


Abbildung 3.2.9: Expression regulatorischer Enzyme des S1P-Spiegels in MIN-6 Zellen nach Stimulation mit Palmitat. Murine β -Zellen (MIN-6) wurden in Hochglucosemedium (25 mM Glucose) für 24 h mit Palmitat stimuliert, anschließend geerntet und mittels Realtime-PCR die mRNA-Expression der SphK1, der SphK2 und der SPL ermittelt. Die Grafik zeigt die Mittelwerte einer Zweifachbestimmung mit Standardabweichung. Die Ergebnisse konnten jeweils in zwei weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert werden. * $p \leq 0,05$ bezogen auf die unstimulierte Kontrolle.

3.3 Signalwege der antiapoptotischen Wirkung von S1P in Keratinozyten

3.3.1 S1P wirkt antiapoptotisch in Keratinozyten

Keratinozyten stellen die größte Zellpopulation in der Epidermis dar. Das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose der Keratinozyten ist ein maßgeblicher Faktor für die Entstehung hyperproliferativer Hauterkrankungen wie Psoriasis [337]. Schon 2008 wurde eine hemmende Wirkung von S1P auf die insulininduzierte Proliferation von Keratinozyten bewiesen. Zusätzlich konnte bewiesen werden, dass, wie für Insulin, auch für S1P ein direkter antiapoptotischer Effekt auf Keratinozyten durch Durchflusszytometrie nachweisbar ist [329]. Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit untermauert und durch ein TUNEL-Assay ergänzt werden (Abbildung 3.3.1).

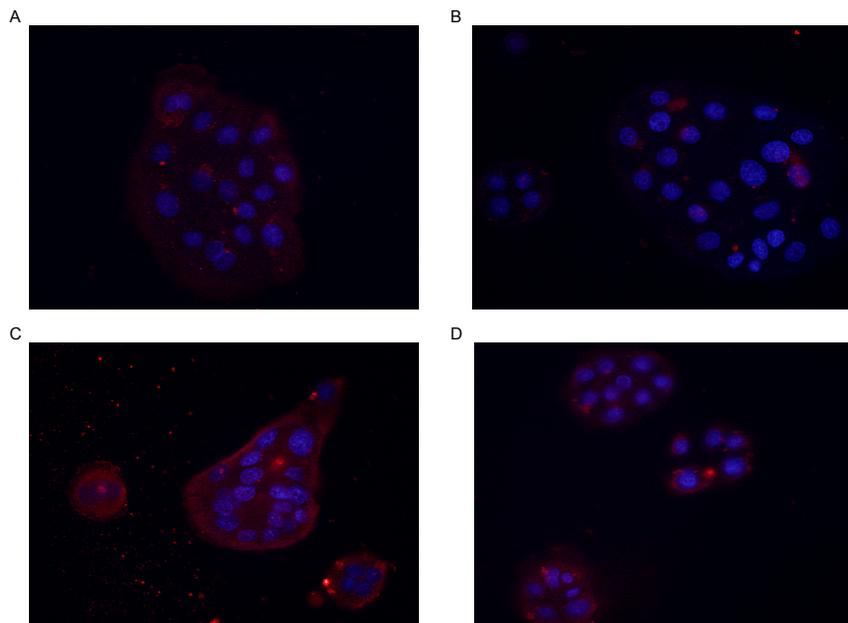


Abbildung 3.3.1: Antiapoptotischer Effekt von S1P in Keratinozyten. Primäre humane Keratinozyten wurden für 16 h mit Kontrollvehikeln (A), 16 h mit 10 µM S1P (B), 16 h mit TNF-α und Actinomycin D (C) oder 30 min mit 10 µM S1P, danach für 16 h mit TNF-α und Actinomycin D (D) behandelt. Die apoptotischen Zellen wurden mittels eines TUNEL-Assays mit TMR und DAPI markiert im Fluoreszenzmikroskop bei 20-facher Vergrößerung fotografiert. Die Ergebnisse konnten jeweils in zwei weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert werden.

In den mit Actinomycin D und $\text{TNF}\alpha$ behandelten Zellen konnte in dem TUNEL-Assay eine stärkere Rotfärbung durch eine verstärkte Markierung der durch Apoptose ausgelösten DNA-Strangbrüche mit TMR detektiert werden. Diese Färbung ging nach Vorstimulation mit S1P stark zurück, was auf den antiapoptotischen Effekt des S1P schließen lässt.

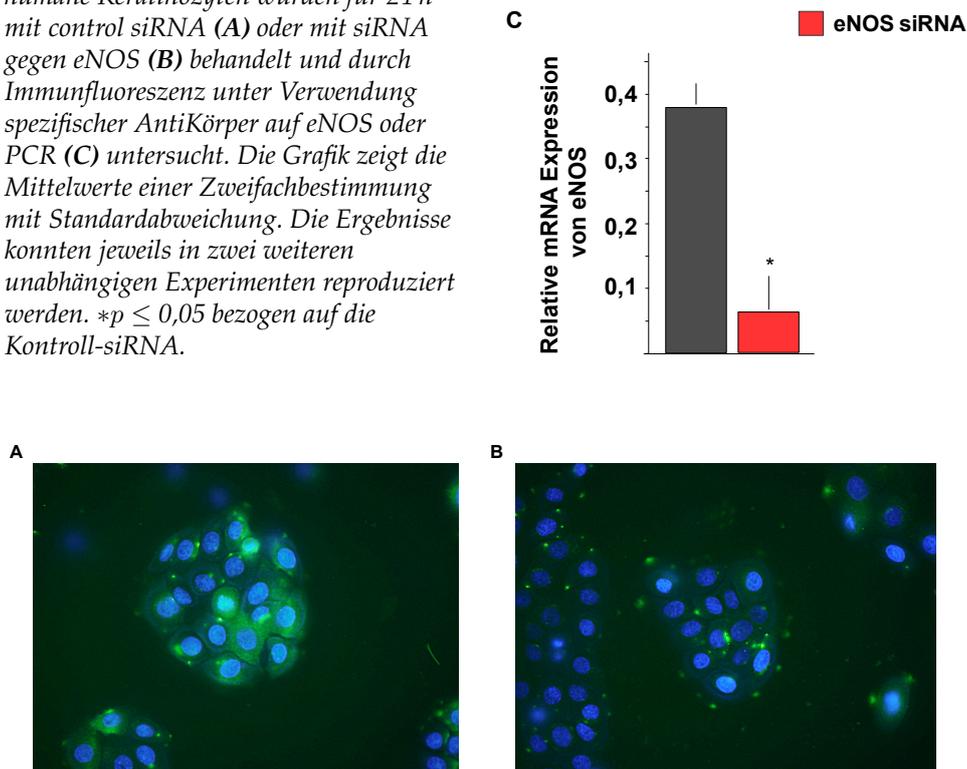
3.3.1.1 S1P wirkt über die Aktivierung der eNOS antiapoptotisch

Da S1P in Keratinozyten nicht nur die insulininduzierte, sondern auch die basale Akt-Phosphorylierung hemmt, wurde dieser Signalweg als unwahrscheinlich ursächlich für die Apoptosehemmung durch S1P eingestuft, weil es für eine Apoptosehemmung über den Akt-Signalweg zu einer vermehrten Aktivierung der Akt-Kinase durch S1P kommen müsste [329].

In der Regulation der zellulären Apoptose kommt auch NO eine entscheidende Rolle zu. Allerdings kann NO konzentrations- und herkunftsabhängig sowohl pro- als auch antiapoptotische Effekte vermitteln [338]. Beim Schutz der Haut vor UV-induzierter Apoptose konnte NO beispielsweise als einer der wichtigsten Faktoren identifiziert werden [339]. Fraglich war nun, ob auch S1P seine antiapoptotische Wirkung über einen NO-abhängigen Signalweg vermitteln könnte.

Die konstitutive Expression der eNOS und der nNOS, und die Aktivierung der eNOS durch S1P in Keratinozyten konnte bereits nachgewiesen werden. Weiterhin wurde bewiesen, dass der antiapoptotische Effekt des S1P durch einen Hemmstoff der endogenen NO-Produktion (L-NAME) vollständig aufgehoben werden konnte und durch Zugabe eines NO-Donors (SNAP) wiederhergestellt werden konnte. Des Weiteren konnte eine Steigerung der NO-Bildung durch S1P nachgewiesen werden [329].

Abbildung 3.3.2: Erfolgreiche RNAi-Transfektion gegen eNOS. Primäre humane Keratinozyten wurden für 24 h mit control siRNA (A) oder mit siRNA gegen eNOS (B) behandelt und durch Immunfluoreszenz unter Verwendung spezifischer AntiKörper auf eNOS oder PCR (C) untersucht. Die Grafik zeigt die Mittelwerte einer Zweifachbestimmung mit Standardabweichung. Die Ergebnisse konnten jeweils in zwei weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert werden. * $p \leq 0,05$ bezogen auf die Kontroll-siRNA.



In einem weiteren Experiment sollte nun im Zuge der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob der antiapoptotische Effekt des S1P tatsächlich wie zu vermuten über verstärkte NO-Produktion durch Aktivierung der eNOS vermittelt wird. Dazu wurden Keratinozyten verwendet, in welchen die Expression der eNOS durch die Verwendung der RNAi-Technik ausgeschaltet war.

Die erfolgreiche Herunterregulation der eNOS wurde über eine verminderte Immunfluoreszenzfärbung des Proteins und über verminderte Expression der mRNA in der PCR nachgewiesen.

Eine Untersuchung der antiapoptotischen Wirkung von S1P unter Verwendung der mit siRNA gegen eNOS behandelten Zellen zeigte, dass die antiapoptotische Wirkung des S1P durch Ausschaltung der eNOS aufgehoben werden konnte (Abbildungen 3.3.3). Somit konnte erstmals bewiesen werden, dass die antiapoptotische Wirkung des S1P in Keratinozyten über die eNOS verläuft.

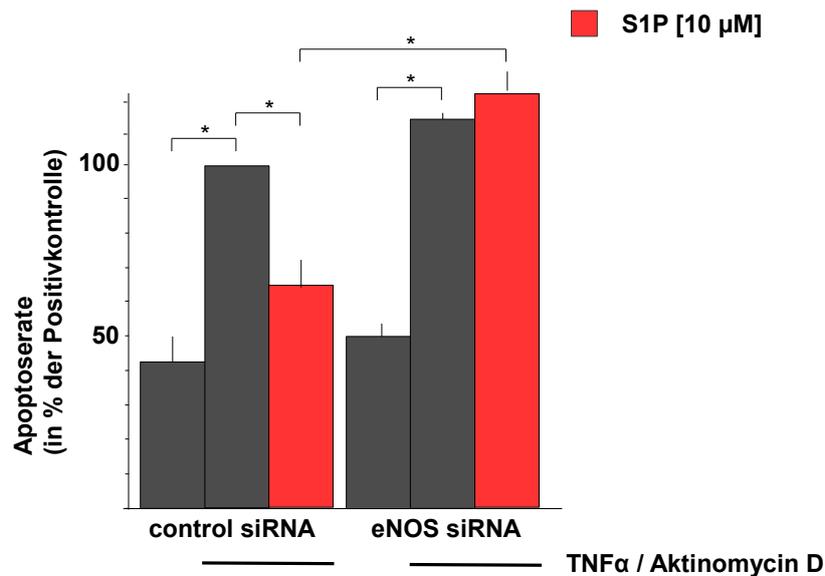


Abbildung 3.3.3: Einfluss von siRNA gegen eNOS auf die antiapoptotische Wirkung des S1P. In Primären humanen Keratinozyten wurde die eNOS mittels RNAi ausgeschaltet, mit S1P vorstimuliert und durch TNF α und Actinomycin D Apoptose ausgelöst. Die Apoptoseraten wurden durchflusszytometrisch bestimmt. Jeder Einzelwert wurde auf die ausschließlich mit TNF- α und Actinomycin D behandelte Kontrolle bezogen. Die Grafik zeigt die Mittelwerte einer Zweifachbestimmung mit Standardabweichung. Die Ergebnisse konnten jeweils in vier weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert werden.

3.3.2 Beteiligung des S1P₃ Rezeptors an der Apoptosehemmung durch S1P

Da S1P einen Großteil seiner Wirkungen über extrazelluläre Rezeptoren vermittelt, war der für den antiapoptotischen Effekt in Keratinozyten verantwortliche S1P- Rezeptor von Interesse.

Zur Orientierung wurden bereits Apoptoseexperimente mit Hemmstoffen verschiedener S1P- Rezeptorsubtypen und auch Versuche mit Antisenseoligonucleotiden durchgeführt; hierbei deuteten die Experimente stark auf den S1P₃- Rezeptor als verantwortlichen Rezeptor hin [329].

Diese Experimente konnten in der vorliegenden Arbeit mittels der siRNA-Technik untermauert werden. Bei Ausschaltung des S1P₃- Rezeptors durch Transfektion der Keratinozyten mit siRNA gegen den S1P₃- Rezeptor (Abbildung 3.3.4) und anschließender Apoptosemessung konnte in Übereinstimmung mit M. Schüppel keine antiapoptotische Wirkung des S1P mehr beobachtet werden, was den S1P₃- Rezeptor als den verantwortlichen Rezeptor bestätigt (Abbildung 3.3.5).

Abbildung 3.3.4: Erfolgreiche RNAi-Transfektion gegen S1P₃. Primäre humane Keratinozyten wurden für 24 h mit control siRNA oder mit siRNA gegen S1P₃ behandelt und durch PCR untersucht. Die Grafik zeigt die Mittelwerte einer Zweifachbestimmung mit Standardabweichung. Die Ergebnisse konnten jeweils in zwei weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert werden. * $p \leq 0,05$ bezogen auf die Kontroll-siRNA.

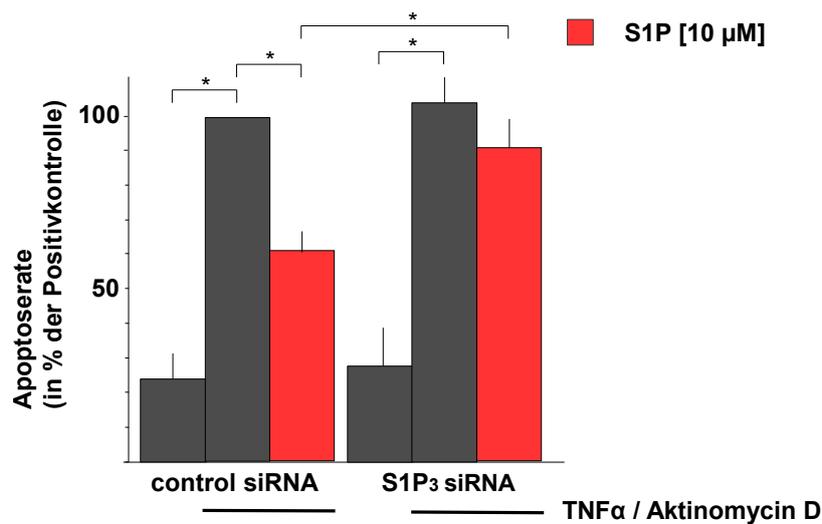
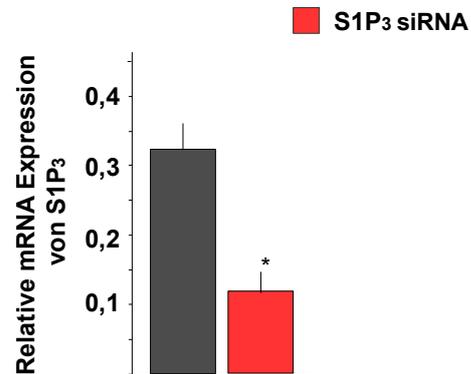


Abbildung 3.3.5: Einfluss von siRNA gegen S1P₃ auf die antiapoptotische Wirkung des S1P. In Primären humanen Keratinozyten wurde der S1P₃-Rezeptor mittels RNAi ausgeschaltet, mit S1P vorstimuliert und durch TNF α und Actinomycin D Apoptose ausgelöst. Die Apoptoseraten wurden durchflusszytometrisch bestimmt. Jeder Einzelwert wurde auf die ausschließlich mit TNF- α und Actinomycin D behandelte Kontrolle bezogen. Die Grafik zeigt die Mittelwerte einer Zweifachbestimmung mit Standardabweichung. Die Ergebnisse konnten jeweils in drei weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert werden.

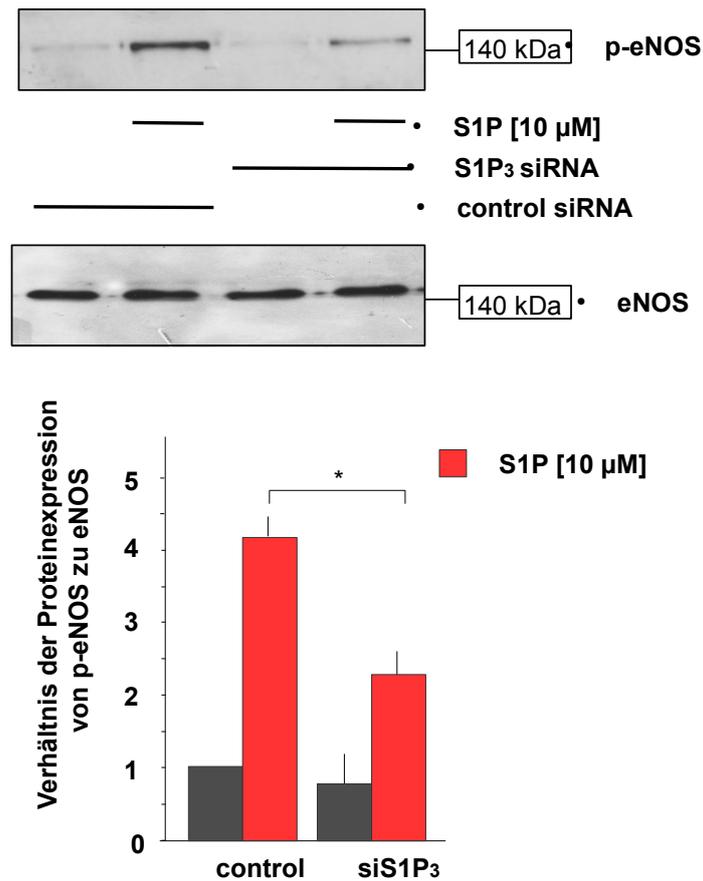


Abbildung 3.3.6: Einfluss von siRNA gegen S1P₃ auf die eNOS- Aktivierung durch S1P. Primäre humane Keratinozyten wurden mit siRNA gegen den S1P₃- Rezeptor transfiziert, für 10 min mit 10 μM S1P behandelt und durch Western Blotting unter Verwendung spezifischer AntiKörper auf phospho-eNOS (Ser1177) untersucht. Die Abbildung zeigt exemplarisch einen Blot aus der Versuchsreihe. Die Quantifizierung erfolgte densitometrisch. Die Auswertung erfolgte gegen die Basalkontrolle. Die Grafik zeigt die Mittelwerte einer Zweifachbestimmung mit Standardabweichung. Die Ergebnisse konnten jeweils in zwei weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert werden.

Auch die Aktivierung der eNOS durch S1P wurde durch Repression der S1P₃-Rezeptorsynthese mittels siRNA drastisch gehemmt (Abbildung 3.3.6) und stellt somit den S1P₃- Rezeptor als den verantwortlichen Rezeptor nochmals heraus.

Bei einer Messung der NO- Produktion in Keratinozyten unter Verwendung des S1P_{1,3}- Rezeptorantagonisten VPC23019 konnte dieses Ergebnis nochmals untermauert werden, da bei Einsatz des Antagonisten S1P nicht mehr in der Lage war, die NO-Produktion in den Keratinozyten zu erhöhen (Abbildung 3.3.7), was auf eine Beteiligung des S1P₃- Rezeptors hindeutet.

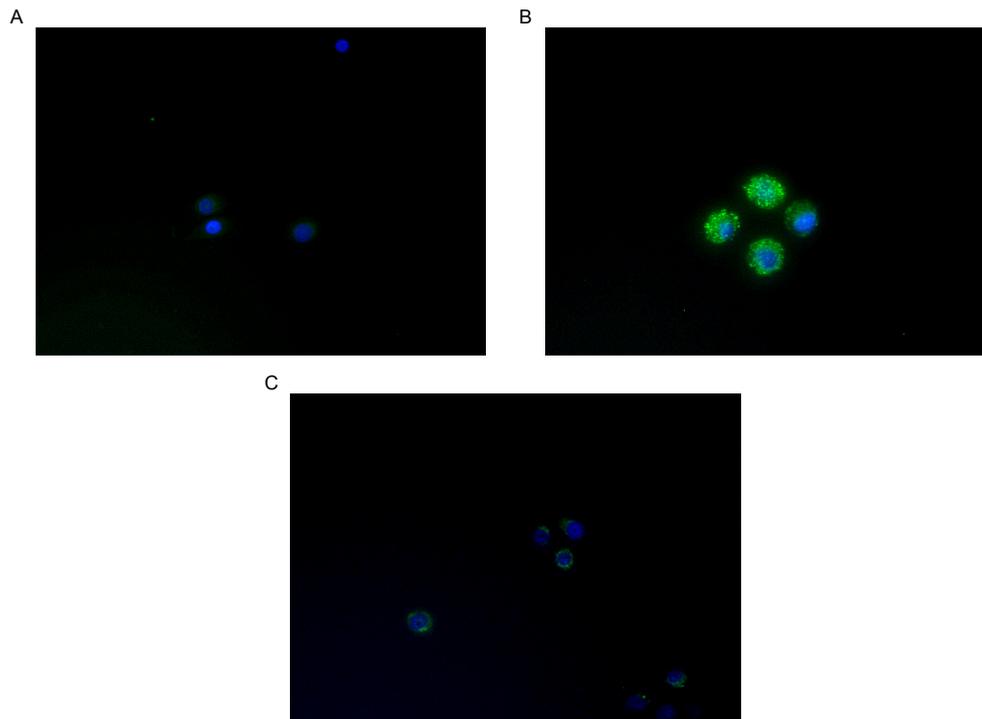


Abbildung 3.3.7: Rolle des $S1P_3$ -Rezeptors in der $S1P$ - stimulierten NO-Produktion in Keratinozyten.
Primäre humane Keratinozyten wurden für 24 h mit Kontrollvehikeln (A), 10 μ M $S1P$ (B) oder 10 μ M VPC23019 und 10 μ M $S1P$ (C) behandelt. Die NO- Produktion wurde mittels des NO- sensitiven, grünen Farbstoffs DAF-2DA visualisiert. Die Bilder zeigen eine 20-fache Vergrößerung. Die Ergebnisse konnten jeweils in zwei weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert werden.

4 Diskussion

4.1 Interaktion von S1P mit insulinvermittelten Signalwegen in β -Zellen

Die Akt-Kinase stellt ein entscheidendes Enzym in einem Komplex von Signalwegen dar, die sowohl Überlebens- als auch Proliferationssignale innerhalb der Zelle vermitteln und so maßgeblich zur Gewebshomöostase beitragen [332]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Folgen einer S1P-vermittelten Hemmung der Akt-Aktivierung und somit auch einer Hemmung aller nachgeschalteten Signalwege untersucht. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Proliferation und das Überleben der Zellen gelegt.

4.1.1 Die Regulation der Akt-Kinase durch S1P

Neben den Signalen zur Einlagerung von Energiereserven in Form von Glykogen oder Fettdepots im Körper zählen Proliferationssignale und antiapoptotische Signale zu den wichtigsten Wirkungen des Insulins auf einzelne Zellen, und genau diese Signalwege spielen wiederum eine große Rolle in der Zellhomöostase der Bauchspeicheldrüse, wo das Insulin von den β -Zellen produziert wird [340]. Auch die stimulierende Wirkung von Glucose auf β -Zellen erfolgt über die Ausschüttung von Insulin und eine Autostimulation über den Insulinsignalweg [341].

Beinahe alle seiner meist anabolen Wirkungen vermittelt das Insulin hierbei über den PI3K / Akt- Signalweg, welcher bei Aktivierung durch eine Phosphorylierung der Akt1 gekennzeichnet ist [332]. Diese Phosphorylierung kann sowohl am Serin473 oder auch an Threonin308 erfolgen, wobei die Phosphorylierung an Thr308 nur eine

vorgeschaltete Phosphorylierung darstellt. Erst durch die Phosphorylierung beider Aminosäuren wird die Akt1 vollständig aktiviert [342]. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit zur Detektion einer Akt-Aktivierung die Phosphorylierung an der zweiten, endgültigen Aktivierungsstelle Ser473 durch Immundetektion gemessen. Es wurde zwar durch Kuo et. al. bewiesen, dass auch eine alleinige Phosphorylierung der Akt an Thr308 zu einer Aktivierung führen kann, jedoch wird die Aussagekraft einer Phosphorylierung an Ser473 immer noch höher eingeschätzt [343]. Sowohl die Akt1, über die Beeinflussung der Apoptose und der Proliferation als auch die Akt2, die eine kritische Rolle in der Entstehung der Insulinresistenz spielt, stellen entscheidende Regulatoren in der Entstehung des T2DM dar [344].

Entsprechend war zu erwarten, dass auch in murinen MIN-6 Zellen eine transiente Phosphorylierung der Akt durch Insulin gemessen werden konnte. Als äußerst interessant erwies sich allerdings die in dieser Arbeit erstmals festgestellte hemmende Wirkung des S1P auf die insulininduzierte Aktivierung der Akt-Kinase in MIN-6 Zellen.

In Bezug auf die Wirkungen von S1P auf die Akt-Kinase gibt es unterschiedliche Forschungsergebnisse. In vielen Zelllinien, wie beispielsweise Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Kardiomyozyten und Granulozyten wird von einer Aktivierung der Akt-Kinase durch S1P berichtet [345–348]. Allerdings gibt es auch Zellen, wie beispielsweise Keratinozyten, Trophoblasten und B-Zellen, in welchen S1P eine Hemmung der Akt-Aktivierung bewirkt [294, 349, 350]. Betrachtet man allerdings hierbei die an der Wirkung auf die Akt beteiligten S1P-Rezeptoren, so ist augenfällig, dass die unterschiedliche Wirkung des S1P auf die unterschiedliche Kopplung der S1P-Rezeptoren an diverse Effektorproteine, beziehungsweise auf der unterschiedlichen Expression selbiger in den verschiedenen Zellen beruhen könnte. Takuwa et. al. weisen in ihrer Forschungsarbeit dementsprechend darauf hin, dass die Wirkungen von S1P in unterschiedlichen Zellen maßgeblich vom stärksten Signal und somit auch vom Expressionsmuster der S1P-Rezeptoren und den damit verknüpften unterschiedlichen Wirkungen abhängen [351].

In der vorliegenden Arbeit konnte eine hemmende Wirkung des S1P auf die akute, insulininduzierte Akt-Phosphorylierung bewiesen werden. Eine Wechselwirkung von S1P und insulinabhängigen Signalwegen, wie sie in der vorliegenden Arbeit in MIN-6 Zellen beobachtet werden konnte, ist beispielsweise auch aus dem weißen Fettgewebe der Ratte bekannt, in welchem S1P über seine extrazellulären Rezeptoren die

insulinvermittelte Leptinsekretion hemmte [352]. Hierbei wurde ein Mechanismus über die Adenylatzyklase vermutet. Auch in C2C12- Myoblasten konnte eine hemmende Wirkung auf das durch IGF-1 ausgelöste Migrationssignal beobachtet werden und aus Keratinozyten ist ebenfalls eine hemmende Wirkung auf die insulininduzierte Akt-Phosphorylierung durch S1P bekannt [248, 353].

Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wird klar, dass S1P durch eine Beeinflussung der Akt-Aktivierung gravierend in den Insulinsignalweg eingreifen kann.

4.1.2 Die Regulation der Proliferation durch S1P

Die Proliferation ist ein essentieller Mechanismus zur Aufrechterhaltung der β -Zellmasse im erwachsenen Organismus, jedoch kann es auch zu Situationen kommen, in welchen die Proliferation der β -Zellen über das normale Maß hinaus erhöht werden muss [159]. Dies ist natürlicherweise in der Schwangerschaft oder im Wachstum der Fall, allerdings kann es zum Beispiel durch Übergewicht oder beginnende Insulinresistenz ebenfalls kompensatorisch zu einer gesteigerten β -Zellproliferation kommen [354–357]. Bisher ist allerdings noch unklar, zu welchen Teilen die neuen β -Zellen in diesem Zusammenhang aus neu differenzierten Stammzellen, durch Epitheliale Mesenchymale Transformation aus anderen Zellen des Pankreas' oder durch Mitose aus vorhandenen β -Zellen entstehen [358–360].

Die Akt greift als Regulator wichtiger Enzyme wie CDKI und Cyclinen entscheidend in die Regulation der Zellproliferation ein und vermittelt damit die proliferationsfördernden Wirkungen des Insulins. Durch die Unterbrechung des PI3K- Signalwegs und der damit verbundenen Blockade beinahe aller Insulinwirkungen wird dieser Signalweg als der wichtigste Signalweg in der Vermittlung von Insulinsignalen unterstrichen [361]. Auch in β -Zellen stellen die Cycline mit ihren CDKI und der Insulinsignalweg inklusive der Akt einen kritischen Regulator der Zellproliferation dar [164, 362]. So wird die Akt beispielsweise in der Schwangerschaft, wenn die β -Zellmasse der Mutter zur Versorgung des Feten um eine vielfache erhöht wird, stark aktiviert und führt über p21 zu einer starken Proliferationssteigerung [363]. Auch führte eine Überexpression der Akt in Mäusen zu einer starken Proliferationssteigerung in den Langerhans'schen Inseln und zu einer starken Zunahme der p21Cip- aktivität [362,

364]. Die β -Zelle kann sich zur Aktivierung dieser Signalwege dabei durch das von ihr sezernierte Insulin selbst stimulieren [365]. Sogar die proliferationsfördernde Wirkung von Glucose auf β -Zellen ist untrennbar mit dem Insulinsignalweg verknüpft [366].

Eine Unterbrechung des Insulinsignalwegs in β -Zellen, zum Beispiel durch Ausschaltung des Insulinrezeptors oder der Insulinrezeptorsubstrate führt dementsprechend zu einer stark verminderten Akt-Phosphorylierung und zu einer starken Abnahme der Proliferation der β -Zellen [341, 367].

In Übereinstimmung mit den genannten Forschungsergebnissen konnte auch in MIN-6 Zellen in der vorliegende Arbeit eine Hemmung der Proliferation beobachtet werden, wenn die insulinstimulierte Phosphorylierung der Akt durch eine Vorstimulation mit S1P vermindert wurde. Über diesen Mechanismus könnte S1P maßgeblich sowohl auf die Proliferation der β -Zellen selbst, als auch auf von der β -Zellmasse abhängigen Krankheitsbildern wie Diabetes Mellitus großen Einfluss nehmen.

Eine Hemmung der Proliferation durch S1P wird ebenfalls aus hepatischen Myofibroblasten, Hepatozyten, murinen Myoblasten und Keratinozyten berichtet [368–370]. Diese Proliferationshemmung wird in Hepatozyten, C2C12- Zellen, wie auch in Keratinozyten über den S1P₂-Rezeptor vermittelt [248, 369, 370]. Dieser Rezeptor konnte auch in der vorliegenden Arbeit durch Versuche mit Hemmstoffen erstmals als der entscheidende Rezeptor in der Beeinflussung der Proliferation von MIN-6 Zellen durch S1P identifiziert werden.

In Keratinozyten erfolgt die Beeinflussung der Proliferation durch S1P ebenfalls über eine Hemmung der Akt-Phosphorylierung, wie auch in den in dieser Arbeit untersuchten MIN-6 Zellen [248]. Auch Thyroidzellen der Schilddrüse können durch S1P in ihrer durch Insulin ausgelösten Proliferation gehemmt werden [371]. Interessanterweise vermag FTY720-P, welches an allen S1P-Rezeptoren bis auf den S1P₂-Rezeptor als Agonist wirkt, eine Proliferationssteigerung in β -Zellen zu vermitteln [372]. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit sind proliferationsfördernde Eigenschaften von S1P aus anderen Zellarten bekannt, allerdings nur im Zusammenhang mit einer gleichzeitig gesteigerten Aktivierung der Akt durch S1P, was die genannten Forschungsergebnisse von den in der vorliegenden Arbeit erbrachten abgrenzt [373–375].

4.1.3 Die Regulation der Apoptose durch S1P

Auch die Apoptose spielt, zusammen mit der Proliferation, eine wichtige Rolle in der gesunden Gewebshomöostase des Pankreas'. Im Idealfall werden genau gleich viele Zellen durch Apoptose aus dem Gewebsverband entfernt, wie durch Proliferation nachgebildet werden, sodass eine annähernd konstante β -Zellmasse erreicht wird. Allerdings ist bekannt, dass es bei T2DM zu verstärkter, durch $\text{TNF}\alpha$ ausgelöster β -Zellapoptose auf Grund der durch Adipositas ausgelösten chronischen Entzündungen im Körper kommt [121]. Auch von Palmitat ist bekannt, dass es in β -Zellen Autophagie bis hin zum apoptotischen Zelltod auszulösen vermag [82].

Der Insulinsignalweg, hier im Speziellen die Akt-Kinase, sind als kritischer Regulator der β -Zellapoptose bekannt und können durch ihre antiapoptotische Wirkung in Mäusen sogar das Entstehen eines übergewichtsinduzierten T2DM verhindern [376]. Als das auslösende, antiapoptotische Signalmolekül greift Insulin regulierend in apoptotische Prozesse in den Langerhans'schen Inseln ein. Diese antiapoptotische Wirkung des Insulins wird über die Akt-Kinase vermittelt und der Signalweg ist als Gegenstand intensiver Forschung schon sehr gut untersucht [342]. Die Akt-Kinase nimmt in der Regulation der Apoptose eine zentrale Stellung ein, da beispielsweise auch andere proapoptotische Signale wie das von Nodal ausgehende über eine Senkung der Akt-Phosphorylierung vermittelt werden und durch Überexpression der Akt-Kinase kann in Mäusen die β -Zellapoptose stark abgesenkt werden [377, 378].

In Bezug auf die Apoptose vermag S1P ebenfalls unterschiedliche Wirkungen auszulösen. Einerseits sind antiapoptotische Wirkungen beispielsweise aus Keratinozyten, Fibroblasten, Melanozyten und Endothelzellen bekannt und auch in β -Zellen kann S1P die cytokininduzierte Apoptose über einen PTX-sensitiven Weg vermindern, allerdings sind beispielsweise aus Keratinozyten auch Wechselwirkungen von S1P mit dem Insulinsignalweg bekannt, welche zu einer Hemmung des antiapoptotischen Insulinsignals führen, und so einen ganz gegenteiligen Effekt bewirken. Erwähnenswert sind in diesem Zusammenhang allerdings die unterschiedlichen S1P-Rezeptoren, über die diese teilweise gegenläufigen Wirkungen vermittelt werden [243, 329, 374, 379, 380].

In MIN-6 Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine antiapoptotischen Wirkung des Insulins beobachtet werden, welche allerdings durch Vorstimulation mit S1P signifikant verringert werden konnte. Interessanterweise konnte gleichzeitig eine leichte antiapoptotische Wirkung des S1P beobachtet werden, wenn dieses ohne

die zusätzliche Stimulation mit Insulin auf die MIN-6 Zellen einwirkte. Durch Vorstimulation mit S1P bei gleichzeitiger Stimulation mit Insulin wurde die Apoptoserate dementsprechend auch nur auf die Höhe der antiapoptotischen Wirkung bei alleiniger Stimulation mit S1P angehoben.

Eine Senkung der Apoptoserate durch die insulinvermittelte Aktivierung des Akt-Signalwegs war in diesem Zusammenhang nicht weiter verwunderlich. Allerdings war es interessant, dass S1P, welches in MIN-6 Zellen die Aktivierung des Akt-Signalwegs durch Insulin zu vermindern vermag, trotzdem selbst eine antiapoptotische Wirkung in β -Zellen besaß. Diese Wirkung muss also offensichtlich unabhängig von der Akt-Kinase vermittelt werden, da S1P ja den insulinvermittelten Akt-Signalweg und auch die insulinvermittelte antiapoptotische Wirkung in MIN-6 Zellen hemmt.

Eine solche Koexistenz zweier unterschiedlicher antiapoptotischer Signalwege in einer Zelle findet sich ebenfalls in Fibroblasten und Keratinozyten, wo die antiapoptotische Wirkung des S1P über eine Aktivierung der eNOS vermittelt wird [329, 381]. Dieser Signalweg erscheint für β -Zellen allerdings eher unwahrscheinlich, da sie hauptsächlich die induzierbare iNOS exprimieren, welche mit einer verstärkten Apoptose in Verbindung gebracht wird. Eine Expressierung der eNOS konnte in β -Zellen nicht nachgewiesen werden [382].

4.1.4 Die Beteiligung des S1P₂-Rezeptors

Da als Wirkmechanismus in der Hemmung der Akt-Aktivierung durch S1P in MIN-6 Zellen sowohl intrazelluläre Wirkungen des S1P als auch Wirkungen über die extrazellulären S1P-Rezeptoren zum Tragen kommen könnten, wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die Hemmung der Akt-Aktivierung unter Einfluss von PTX untersucht, welches die Signalweiterleitung an allen fünf S1P-Rezeptoren über Gi-Proteine zu verhindern vermag. Eine Vorstimulation der Zellen mit PTX führt zu einer Ribosylierung von ADP und damit zu einer andauernden Bindung von GDP an die G α -Untereinheit, welche damit inhibiert wird [383]. Da unter Vorstimulation mit PTX kein hemmender Effekt auf die Akt in MIN-6 Zellen mehr messbar war, konnte davon ausgegangen werden, dass die durch S1P induzierte Hemmung der insulinabhängigen Akt-Aktivierung über einen der fünf extrazellulären S1P-Rezeptoren vermittelt wird.

Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Aktivierung der Akt durch S1P meist mit einer Aktivierung des S1P₁ oder S1P₃-Rezeptors verknüpft ist, weitere Kofaktoren wie beispielsweise die gleichzeitige Aktivierung des Platelet-derived growth factor Rezeptors in embryonalen Fibroblasten der Maus benötigt oder aus Zellen berichtet wird, welche nur einen Teil der S1P-Rezeptoren exprimieren, wie die nur mit S1P_{1,4} und ⁵ ausgestatteten NK- Zellen [384–388]. Auch ist interessanterweise die Wirkung des Insulin-like Growth Factors (IGF) mit einer Aktivierung des S1P₁- und S1P₃-Rezeptors verbunden [389].

Eine S1P- vermittelte Hemmung der Akt wird überwiegend mit einer Aktivierung des S1P₂-Rezeptors in Verbindung gebracht, so zum Beispiel in der durch S1P hemmbaren, Akt- abhängigen Proliferation von B- Zellen, und der Hemmung der insulinvermittelten Akt-Aktivierung und Proliferation in humanen Keratinozyten [248, 294]. Es sind allerdings auch Zellen bekannt, in welchen S1P über den S1P₂-Rezeptor zur Zellproliferation führt, dies ist beispielsweise in isolierten Muskeln von Mäusen der Fall [390].

Im Allgemeinen scheint die unterschiedliche Wirkung von S1P über S1P₂ und S1P₃ durch die unterschiedliche Regulation der nachgeschalteten GTPasen der Rho- Familie begründet zu sein [391].

Da sich bei einer Expressionsanalyse der S1P-Rezeptoren in MIN-6 Zellen der S1P₂-Rezeptor als der am stärksten exprimierte Rezeptor herausstellte lag die Vermutung nahe, dass in β -Zellen besonders S1P- Wirkungen, die über den S1P₂-Rezeptor vermittelt werden im Vordergrund stehen könnten.

Die Ergebnisse zur Expression von S1P-Rezeptoren in MIN-6 Zellen deckten sich mit Untersuchungen zur S1P-Rezeptorexpression in primären β -Zellen aus Ratten und der Ratteninselzelllinie INS-1, wo ebenfalls der S1P₂-Rezeptor um ein vielfaches stärker exprimiert wird als die restlichen S1P-Rezeptoren [392]. Die vorliegenden Ergebnisse zu MIN-6 Zellen konnten weiterhin durch Daten zur Expression der S1P-Rezeptoren in MIN-6 Zellen aus der Genexpressionsdatenbank BioGPS bestätigt werden [330]. Erstaunlicherweise wiesen die INS-1- β -Zellen ein verändertes S1P-Rezeptorexpressionsmuster im Vergleich zu der in der vorliegenden Arbeit charakterisierten INS-1e- Zelllinie auf. INS-1e- Zellen stellen eine subklonierte Zelllinie der sehr heterogenen INS-1- Zellen dar, und sind im Vergleich zu INS-1 Zellen den primären Ratten β -Zellen in Bezug auf den Glucose- und Insulinmetabolismus ähnlicher, trotzdem weisen offenbar die INS-1- Zellen ein den Primären Ratten β -Zellen

ähnlicheres Rezeptorexpressionmuster auf als die INS-1e- Zellen [73]. Auf Grund der Inhomogenität in der Rezeptorexpression der Ins-1e- Zellen wurde die vorliegende Arbeit auf den besser erforschten MIN-6 Zellen aufgebaut.

Durch den Einsatz von Hemmstoffen unterschiedlicher S1P-Rezeptoren wie JTE-013 und VPC23019, und der Kombination selbiger mit Agonisten, die nur an einigen der S1P-Rezeptoren wirken wie FTY720-Phosphat und VPC24191 konnte im Rahmen dieser Arbeit der S1P₂-Rezeptor als verantwortlicher Rezeptor für den hemmenden Einfluss des S1P auf die insulininduzierte Akt-Phosphorylierung in MIN-6 Zellen identifiziert werden. Interessanterweise konnte durch den Einfluss von JTE-013 die insulininduzierte Akt-Aktivierung durch S1P sogar noch ein wenig gesteigert werden, was auf eine parallel stattfindende Akt-Aktivierung durch S1P über andere Rezeptoren schließen lässt, welche offensichtlich normalerweise durch die durch den S1P₂-Rezeptor ausgelöste Hemmung der Akt-Phosphorylierung unterdrückt wird.

Eine Möglichkeit der Hemmung der Akt-Aktivierung besteht beispielweise über eine Aktivierung der Phosphatase PTEN. Hierbei wurde interessanterweise ein hemmender, PTEN- vermittelter Signalweg über S1P₂ und die durch S1P₂ aktivierte G12/13 und RhoA entdeckt [393]. Auch Du et. al. konnten eine über S1P₂ vermittelte Beeinflussung der G12/13 - Rho- Signalkaskade und eine damit verbundene Hemmung der Akt-Phosphorylierung beobachten [394]. Dies unterstützt die in der vorliegenden Arbeit erbrachten Erkenntnisse und weist auf mögliche Hemmmechanismen hin.

Weiter untermauert wurden diese Ergebnisse bezüglich der Beteiligung des S1P₂-Rezeptors an den in dieser Arbeit an MIN-6 Zellen untersuchten Wirkungen durch die Versuche mit Hemmstoffen der S1P-Rezeptoren in insulininduzierten Proliferations- und Apoptoseversuchen. Auch hier konnte der S1P₂-Rezeptor als ursächlich für die Hemmung identifiziert werden, da in den Proliferationsversuchen auch bei Hemmung des S1P₁- und S1P₃-Rezeptors mit VPC23019 eine Hemmung der Proliferation nach S1P- Stimulation beobachtet werden konnte, welche mit FTY-720, das an alle S1P-Rezeptoren ausser den S1P₂-Rezeptor bindet, und mit VPC24191 nicht auftrat. Im Gegenteil, hier konnte die Proliferation sogar noch ein wenig gesteigert werden. Diese Beobachtung wurde ebenfalls von Zhao et. al. bei der Behandlung von Mäusen mit FTY-720 und der anschließenden Untersuchung der β -Zellproliferation

gemacht. [372]. Diese Ergebnisse können durch eine Studie an Brustkrebspatienten untermauert werden, in welcher für Patienten mit einer vergleichsweise hohen Expression an S1P₁ und ₃-Rezeptoren eine schlechte Überlebensprognose in Folge starker Tumorproliferation und ein schlechtes Ansprechen auf tumorproliferationsverringende Medikation beobachtet werden konnte. Bei Patienten mit einer hohen S1P₂-Expression konnte dagegen eine längere Überlebenszeit und ein besseres Ansprechen auf die Therapie beobachtet werden [395]. Auch hier erweist sich der S1P₂-Rezeptor als offensichtlich proliferationshemmend, was sich in dieser Studie zum Vorteil der Patienten auswirkte.

In Apoptoseversuchen mit FTY720-P und Insulin konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls keine Beeinflussung des durch Insulin ausgelösten antiapoptotischen Effektes durch FTY720-P mehr beobachtet werden, was einen Wirkmechanismus über den S1P₂-Rezeptor bei Stimulation mit S1P wahrscheinlich macht. Im Gegenteil, es wurde sogar eine leichte Steigerung des antiapoptotischen Effektes gemessen, welche allerdings nicht signifikant war. FTY720-P alleine hatte, wie S1P auch, eine leicht antiapoptotische Wirkung, wenn es ohne gleichzeitige Insulinstimulation auf die Zellen einwirkte.

Die entscheidende Rolle des S1P₂-Rezeptors in Bezug auf den Verlauf der β -Zellapoptose wird auch in einer Studie von Imasawa et. al. mit S1P₂^{-/-}- Mäusen deutlich. In S1P₂^{-/-}- Mäusen konnte eine durch Streptozotocin ausgelösten β -Zellapoptose im Vergleich zu Wildtypen durch die Fütterung von FTY720-P stark vermindert werden, gleiche Ergebnisse wurden mit dem S1P₂-Rezeptorantagonisten JTE-013 erzielt [396]. Hier konnte also durch die Ausschaltung des S1P₂-Rezeptors ein starker Rückgang der Apoptose in den β -Zellen herbeigeführt werden beziehungsweise durch Benutzung eines Agonisten, welcher alle S1P-Rezeptoren bis auf den S1P₂-Rezeptor anspricht, die positive Wirkung der anderen S1P-Rezeptoren in den Vordergrund gerückt werden.

4.2 Beteiligung von S1P an den Wirkungen auf den Insulinsignalweg durch Palmitat in β -Zellen

Da Palmitat im heute weitverbreiteten westlichen Ernährungsstil mit hohem Fettanteil in der Nahrung eine entscheidende Rolle spielt, stehen auch seine Wirkungen auf die β -Zelle und das Fortschreiten des T2DM im Zentrum des Interesses, wenn man sich auf der Suche nach den Ursachen der β -Zelldysfunktion befindet.

Unbestritten ist die Tatsache, dass besonders in übergewichtigen Patienten extrem erhöhte Palmitat Spiegel im Blut gemessen werden, und dass diese erhöhten Palmitat Spiegel einen entscheidenden Risikofaktor für die Entwicklung von Insulinresistenz und T2DM darstellen [46, 47, 49].

Da die Akt-Kinase ein entscheidender Regulator des Zellüberlebens ist, und auch als kritischer Regulationspunkt in der Insulinresistenz gilt, sind besonders Wirkungen von Palmitat auf diesen Signalweg innerhalb der β -Zelle von Interesse. Wirkt Palmitat in niedriger Dosis oder nur über sehr kurze Zeit auf β -Zellen ein, so kommt es zu anabolen Effekten wie Proliferationssteigerung und Aktivierung der Akt-Kinase. Wirkt Palmitat allerdings in höheren Konzentrationen oder über einen längeren Zeitraum auf die Zelle ein, so kommt es zur Hemmung der Akt-Phosphorylierung, gesteigerter Apoptose und gehemmter Proliferation in der β -Zelle [397]. Eine hemmende Wirkung auf die Akt-Phosphorylierung durch Langzeitstimulation (>12h) mit Palmitat ist bereits aus vielen Zelllinien bekannt, wobei ein Signalweg über oxidativen Stress und DNA-Schäden vermutet wird [57, 398, 399]. Bei Infusion großer Mengen freier Fettsäuren über einen längeren Zeitraum kommt es beim Menschen ebenfalls zu einer Hemmung der Akt-Aktivierung [400].

Auch in MIN-6-Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit in Übereinstimmung mit Kluth et. al. eine konzentrationsabhängige Hemmung der Akt-Phosphorylierung nach 24 h Inkubation mit Palmitat beobachtet werden [401]. Eine solche Hemmung der Akt-Aktivierung in β -Zellen wird auch von Kwon et. al. beschrieben [402]. Eine maximale Hemmung trat bei gleichzeitiger Stimulation mit erhöhten Mengen an Glucose auf. Dieser Effekt wird auch als Glucolipotoxizität in vielen anderen Arbeiten beschrieben [403, 404].

Aus heutiger Sicht ist für die lipotoxische Wirkung des Palmitat nicht alleine eine Wirkung des Palmitats über seine Rezeptoren wie GPR40 verantwortlich, sondern besonders im Zusammenspiel mit Glucose, in der Glucolipotoxizität, wird eine Umwandlung des Palmitats in andere Effektormoleküle vermutet [405, 406]. Glucose inhibiert in hohen Konzentrationen die Fettoxidation und begünstigt somit die Akkumulation langkettiger Acyl-CoA- Einheiten in der Zelle [407, 408]. Diese können daraufhin über die SPT vermehrt zu komplexen Lipiden wie beispielsweise Sphingolipiden umgewandelt werden. Ceramid stellt in diesem Feld das besterforschte Sphingolipid dar [63]. Die SPT- Aktivität wird dabei durch Übergewicht oder eine diabetische Grunderkrankung stark erhöht, wodurch dieser Effekt noch verstärkt wird [60]. Auch durch die bei T2DM chronisch erhöhten Entzündungsmediatoren kann die Ceramidproduktion erheblich erhöht werden [409]. In diabetischen ZDF- Ratten kann ein direkter Umbau von markiertem ^3H - Palmitat in ^3H - Ceramide beobachtet werden, wobei die Ceramidspiegel auf bis zu das Doppelte anstiegen, wenn es sich um diabetische Pankreasinseln handelte [125].

Diese bei diabetischen Ratten erhöhten Ceramidspiegel sind durch die Hemmung der Akt-Phosphorylierung und somit der Unterbrechung der Insulinsignalkaskade maßgeblich an der Entstehung der Insulinresistenz beteiligt und durch Hemmung der SPT konnte sowohl die erhöhte Bildung von Ceramid als auch der hemmende Effekt auf die Akt-Aktivierung und somit die Insulinsignalkaskade aufgehoben werden [62, 410]. Ceramide können allerdings auch in nicht unerheblichem Maße über die Ceramidase und die SphK in weitere Sphingolipide wie Sphingosin oder letztendlich S1P umgewandelt werden, welche ebenfalls stark wirksame Biomoleküle darstellen.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine direkte Beeinflussung der S1P- produzierenden und - abbauenden Enzyme in MIN-6 Zellen durch erhöhte Palmitatkonzentrationen nachgewiesen werden. So stieg die Expression der SphK1, die maßgeblich für erhöhte S1P-Spiegel im Blut verantwortlich ist, stark an, während die Expression der SphK2 absank. Eine verminderte Expression der SphK2 kann allerdings ebenfalls zu erhöhten S1P-Spiegeln führen, wie eine Studie mit SphK2- inhibierten Mäusen zeigt, in welchen die S1P-Spiegel nach der SphK2- Inhibition stark anstiegen, während sie nur durch Inhibition der SphK1 stark absanken [411].

Da die SPL als einziges Enzym S1P irreversibel aus dem Sphingolipidkreislauf entfernen kann, spielt sie eine besonders wichtige Rolle in der Regulation der S1P-Spiegel.

Bei Blockade der SPL kommt es zu sehr stark erhöhten Sphingolipidspiegeln [412]. Interessanterweise war Palmitat in MIN-6 Zellen ebenfalls in der Lage, zusätzlich zur Regulation der SphK hin zu einer vermehrten S1P-Produktion auch die Expression der SPL stark abzusenken, und so noch zusätzlich begünstigende Bedingungen für sehr stark erhöhte S1P-Spiegel zu schaffen. Diese Beobachtungen werden durch eine Studie von Véret et. al. gestützt, in der in palmitatstimulierten INS-1 β -Zellen stark erhöhte S1P-Spiegel und eine Erhöhung der SphK1-Expression gemessen werden konnten [64]. Parallel zu diesen Forschungsergebnissen konnten in MIN-6-Zellen nach Stimulation mit Palmitat ebenfalls erhöhte S1P-Spiegel gemessen werden, die, in Übereinstimmung mit den weiter oben erwähnten schon existierenden Untersuchungen zu Ceramidspiegeln, ebenfalls durch Hemmstoffe der SPT wie Myriocin hemmbar waren. Auch ein Hemmstoff der SphK (SKI-II) verhinderte die Akkumulation von S1P. Dies bedeutet, dass die durch Palmitatstimulation erhöhten S1P-Spiegel in MIN-6 Zellen auf die vermehrte *de novo* Synthese von Sphingolipiden über die SPT und die SphK zurückzuführen sind.

Jedoch konnte durch Smith et. al. in einer Studie mit radioaktiv markiertem Palmitoyl-CoA gezeigt werden, dass die Erhöhung der Sphingosin- und S1P-Spiegel nach Palmitatzugabe nicht direkt durch *de novo* Synthese über Ceramid erfolgt, sondern über die vermehrte Bildung von Sphingomyelin und dessen nachgeschaltetem Umbau zu Sphingosin über den Sphingolipidturnover [413]. Interessanterweise besteht nämlich zusätzlich zur Neusynthese innerhalb der Zelle die Möglichkeit, S1P mittels des Sphingolipidturnovers durch Degradation von Sphingomyelin über die Sphingomyelinase zu bilden [414]. Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit zusätzlich zu dem Blick auf die *de novo* Synthese auch ein Blick auf den Sphingolipidturnover geworfen werden. Zu diesem Zweck wurde der Ceramidsynthasehemmstoff FB1 eingesetzt.

FB1 nimmt im Rahmen dieser Versuchsreihen eine Sonderrolle ein, da es zwar durch die Hemmung der Ceramidsynthese ebenfalls die *de novo* Synthese von S1P aus Palmitat über Sphinganin verhindert, es jedoch in den MIN-6 Zellen trotzdem zu höheren S1P-Spiegeln als durch alleinige Palmitatstimulation kam. Dies liegt vermutlich darin begründet, dass das FB1 durch den Eingriff in die Rückumwandlung von Sphingosin zu Ceramid, die ebenfalls durch die Ceramidsynthese katalysiert wird, das Sphingolipidrheostats zu Gunsten erhöhter Sphingosin- und S1P-Spiegel aus dem Gleichgewicht bringt und die Ansammlung von S1P aus dem Sphingolipidturno-

ver forciert.. Der Sphingolipidturnover scheint also in MIN-6 Zellen eine unerwartet große Rolle zu spielen. Zudem ist das S1P-abbauende Enzym SPL bei der gleichzeitigen Stimulation mit Palmitat in MIN-6 Zellen herunterreguliert (siehe Abbildung 3.2.9), und es kann somit kein endgültiger Abbau des S1P als Ausgleich für die durch die Ceramidsynthasehemmung fehlende Umwandlung von Sphingosin zu Ceramid stattfinden.

Eine solche Erhöhung der S1P-Spiegel bei Behandlung mit Fumonisin ist auch aus anderen Zelllinien bekannt und wird mit als einer der Gründe für das erhöhte Krebsrisiko bei chronischen Vergiftungen mit FB1 vermutet [308, 414].

Erstmals konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch stark erhöhte S1P-Spiegel in diabetischen NZO- Mäusen gemessen werden, die mit einer Palmitatreichen Diät gefüttert wurden. Im Vergleich trat bei den gesunden Kontrolltieren auch durch Fütterung hoher Palmitatmengen kein Anstieg der S1P- Spiegel auf. Auf diesem Gebiet konzentrierte sich die Forschung bisher ausschließlich auf Ceramide und andere Sphingolipide, abgesehen von S1P.

Über Hemmstoffe der S1P- Synthese wie Myriocin sollte in der vorliegenden Arbeit die Beteiligung von S1P an der Hemmung der Akt-Phosphorylierung durch Palmitat untersucht werden. Durch Myriocin ließ sich die durch Palmitat hervorgerufene Hemmung der Akt-Phosphorylierung komplett aufheben, was eine Umwandlung des Palmitats in Sphingolipide über die SPT und eine darauf folgende Wirkung auf die Akt-Phosphorylierung sehr wahrscheinlich macht. Allerdings kann bei diesem Versuchsaufbau nicht zwischen der Wirkung des Ceramids und der Wirkung des S1P unterschieden werden. Eine hemmende Wirkung des Ceramids auf die Akt-Aktivierung ist bereits hinlänglich bekannt [62]. Da sich der Einfluss des Palmitats auf die Akt-Aktivierung allerdings durch den Einsatz des S1P₂-Rezeptorantagonisten JTE-013 verringern ließ, steht zumindest eine Beteiligung von S1P an den Palmitatwirkungen außer Frage. Des Weiteren scheint die Wirkung über den S1P₂-Rezeptor vermittelt zu werden, da der Effekt des Palmitats durch den Einsatz von JTE-013 verringert werden konnte, während er durch den S1P_{1,3}-Rezeptorantagonisten VPC23019 unbeeinflusst blieb.

In der vorliegenden Arbeit konnten also zum ersten Mal erhöhte S1P-Spiegel in diabetischen Mäusen gemessen werden, die in anschließenden Versuchen mit der

kultivierbaren β -Zelllinie MIN-6 mit erhöhten Palmitatspiegeln und signifikanten Veränderungen in den Enzymen des Sphingolipidreostats in Verbindung gebracht werden konnten. Zudem konnte eine Beteiligung des S1P an der durch Palmitat hervorgerufenen verminderten Akt-Aktivierung in MIN-6 Zellen nachgewiesen werden, indem der S1P₂-Rezeptor als der verantwortliche Rezeptor für die negativen Auswirkungen des S1P auf die insulininduzierte Akt-Phosphorylierung und nachgeschaltete Effekte wie Proliferation und Apoptosehemmung identifiziert wurde.

Die Abhängigkeit der in dieser Arbeit erforschten hemmenden Wirkungen des S1P vom S1P₂-Rezeptor könnten einen Ansatzpunkt für zukünftige Therapien darstellen. So konnte in einer Studie mit diabetischen Mäusen nachgewiesen werden, dass die Ausschaltung des S1P₂-Rezeptors zu einer Abnahme der Inzidenz für T2DM in der untersuchten Mauspopulation führte [396]. In einer Studie bezüglich möglicher Modulatoren des Insulinsignalwegs, die als Ursache für die bei T2DM auftretende Insulinresistenz in Frage kämen, konnte der S1P₂-Rezeptor zudem als wichtiges Kandidatengen identifiziert werden [415]. Die in der Studie untersuchten S1P₂^{-/-}- Mäuse wiesen nach Auslösung der Insulinresistenz durch Hochfettfütterung signifikant höhere Insulinspiegel als die zu diesem Zeitpunkt schon insulinresistenten Wildtypen auf.

Besonders problematisch erweist sich im Krankheitsbild des T2DM auch die durch chronisch erhöhte Blutzuckerspiegel vermittelte Herunterregulation der S1P₁-Rezeptorexpression, welcher normalerweise zusammen mit dem S1P₃-Rezeptor in der Lage wäre, den über S1P₂ vermittelten, negativen Effekten entgegenzuwirken [392]. Hier weisen aber Fütterungsversuche mit FTY720, einem Agonisten an allen S1P-Rezeptoren bis auf den S1P₂, einen vielversprechenden Weg, da der Agonist zu einer Abnahme der Insulinresistenz und der T2DM- Rate in der FTY720- gefütterten Gruppe führte [372, 416]. Beim Menschen konnte durch Einnahme von FTY720 immerhin keine negative Beeinflussung der β -Zellfunktion beobachtet werden [417]. Interessanterweise führt FTY720 auch beim autoimmunen T1DM der Maus zu einer Verlangsamung des Krankheitsverlaufes und kann bei rechtzeitiger Gabe diesen sogar komplett verhindern, was seine mögliche Eignung als Arzneistoff in der Diabetesprävention weiter unterstreicht [418].

4.3 Charakterisierung des durch S1P ausgelösten antiapoptotischen Effekts in Keratinozyten

Obwohl aus Keratinozyten ebenfalls eine negative Beeinflussung der insulininduzierten Akt-Aktivierung durch S1P berichtet wird, wird gleichzeitig eine antiapoptotische Wirkung des S1P auf diese Zellen beschrieben, wenn die Stimulation der Zellen mit S1P ohne gleichzeitige Stimulation mit Insulin erfolgt [248, 329]. Entscheidend für die Vermittlung des durch S1P angestoßenen, antiapoptotischen Signals in Keratinozyten gilt die Regulation des Bcl-2 Proteins durch S1P [247].

4.3.1 Die Rolle der eNOS in der antiapoptotischen Wirkung des S1P

NO stellt neben seiner potenten Wirkung als Vasodilatator ein wichtiges regulatorisches Molekül des Zellschicksals dar. Dabei entscheidet hauptsächlich die Konzentration und die Herkunft des NO darüber, ob es zu einer positiven oder negativen Wirkung auf das Zellüberleben und die Proliferation kommt [419, 420]. Bei sehr hohen NO-Konzentrationen kann es durch Akkumulation des Oxidationsmittels Peroxynitrit zur DNA- Fragmentierung und somit zur Apoptose kommen. Niedrige NO-Spiegel hingegen wirken über cGMP antiapoptotisch, indem die Caspaseaktivität und die Cytochrom C- Freisetzung gesenkt wird und die Bcl2-Aktivität gleichzeitig erhöht wird. Die Beeinflussung findet hierbei hauptsächlich über eine direkte S- Nitrosylierung von Caspasen und ihrer daraus folgenden Deaktivierung und über eine Hemmung des Bcl2- Abbaus statt [421].

Durch eine vollständige Ausschaltung der eNOS in Knockout- Mäusen wird die Apoptoserate stark angehoben, was deren Wichtigkeit in antiapoptotischen Signalwegen unterstreicht [339].

Nachdem schon durch M. Schüppel 2008 gezeigt werden konnte, dass die antiapoptotische Wirkung des S1P mit einer eNOS- Aktivierung in Zusammenhang gebracht werden kann, und die antiapoptotische Wirkung des S1P durch den Einsatz von Hemmstoffen der NO- Synthase vermindert werden konnte, konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals bewiesen werden, dass die gezielte Ausschaltung der eNOS mittels der RNAi- Technik zu einer Hemmung des antiapoptotischen S1P- Effektes

führte [329]. Der Beweis dieses Zusammenhangs stellt einen wichtigen Schritt in der Aufklärung des Signalwegs der antiapoptotischen Wirkung von S1P auf humane Keratinozyten dar, da durch die Ausschaltung der eNOS erstmals eindeutig das Vorhandensein dieser NO-Synthase als Voraussetzung für den antiapoptotischen Effekt des S1Ps bewiesen werden konnte.

Ein Zusammenhang zwischen der Aktivität der eNOS und des S1P in Bezug auf antiapoptotische Wirkungen des S1P kann auch in anderen Zellen nachgewiesen werden, auch die intrazellulären NO-Spiegel wurden in diesen Arbeiten durch S1P gesteigert [374, 422, 423].

Interessanterweise erwies sich die S1P-vermittelte Aktivierung der eNOS in Endothelzellen als Gi-Proteinabhängig, was auf eine Beteiligung der extrazellulären S1P-Rezeptoren hinweist [424].

4.3.2 S1P₃ vermittelt die antiapoptotische Wirkung des S1P

Im Gegensatz zu dem hemmenden Effekt des S1P auf die durch Insulin ausgelöste antiapoptotische und proliferationsfördernde Wirkung, welcher auch in Keratinozyten, wie in MIN-6 Zellen, über den S1P₂-Rezeptor vermittelt wird, wird der antiapoptotische Effekt in humanen Keratinozyten bei alleiniger Stimulation mit S1P durch den Einsatz von Antisenseoligonukleotiden gegen den S1P₃-Rezeptor aufgehoben, was für eine Beteiligung des S1P₃-Rezeptors spricht [329]. Der Einsatz von Antisenseoligonukleotiden gegen die anderen vier S1P-Rezeptoren zeigte keine Beeinflussung der antiapoptotischen Wirkung des S1P [329]. Auch in anderen Arbeiten wird deutlich, dass besonders der S1P₁- und der S1P₃-Rezeptor an zytoprotektiven Wirkungen des S1P beteiligt sind [374].

Bei weitergehender Untersuchung der Beteiligung des S1P₃-Rezeptors am antiapoptotischen Effekt des S1P konnte in der vorliegenden Arbeit mittels der RNAi-Technologie durch Ausschaltung des S1P₃-Rezeptors nicht nur die antiapoptotische Wirkung des S1P unterdrückt werden, sondern es konnte ebenfalls die Phosphorylierung an Serin 1177 und somit die Aktivierung der eNOS beinahe vollständig unterdrückt werden. Serin 1177 stellt hierbei die aktivierende Phosphorylierungsstelle an der eNOS dar, ganz im Gegensatz zu Threonin495, bei dessen Phosphorylierung die Aktivität der eNOS gehemmt werden kann [425].

Diese Ergebnisse stellen den S1P₃-Rezeptor erstmals eindeutig als den verantwortli-

chen Rezeptor für die Aktivierung der eNOS und die damit verbundene, durch gesteigerte NO- Bildung ausgelöste antiapoptotische Wirkung des S1P in humanen Keratinozyten heraus. Auch in der Myokardischämie ist eine über den S1P₃-Rezeptor vermittelte, und mit gesteigerter NO- Bildung verbundene zellprotektive Wirkung von S1P bekannt [426]. In humanen Endothelzellen kann ebenfalls durch die Blockade des S1P₃-Rezeptors die eNOS- Aktivierung verhindert werden, und die HDL-vermittelte Vasorelaxation, welche zu großen Teilen auf das in HDL gespeicherte S1P zurückgeführt wird, wird ebenfalls über S1P₃ vermittelt und geht mit einer Erhöhung der NO- Spiegel einher [230, 427].

Meist wird die Aktivierung der eNOS über den PI3K / Akt- Signalweg vermittelt [424, 428]. Interessanterweise lässt sich auch in Keratinozyten trotz seiner hemmenden Wirkung auf die basale Akt- Phosphorylierung ein antiapoptotischer Effekt des S1P nachweisen [248, 379]. Eine solche Akt- unabhängige, über den S1P₃-Rezeptor vermittelte antiapoptotische Wirkung wird ebenfalls aus humanen Fibroblasten berichtet, welche mit FTY720-P vorstimuliert wurden [429]. Dennoch kann der PI3K / Akt- Signalweg als verantwortlicher Signalweg zwischen dem S1P₃-Rezeptor und der eNOS nicht vollständig ausgeschlossen werden, da eine Hemmung des durch S1P vermittelten, antiapoptotischen Effektes in Keratinozyten durch Hemmstoffe der PI3K auftrat [248]. Die Akt-Kinase konnte aber in derselben Arbeit nicht durch S1P aktiviert werden. Es scheint also einen zwar PI3K-, aber nicht Akt- abhängigen Signalweg zu geben, welcher noch weiterer Forschung bedarf.

Alternative Signalwege, die ebenfalls zu einer Aktivierung der eNOS führen können wären beispielsweise Ca²⁺/Calmodulin- abhängige Kinase- II, AMP- aktivierte Kinase oder auch die Proteinkinase A [430]. Besonders hervorzuheben ist an dieser Stelle die Möglichkeit, über den S1P₃-Rezeptor die intrazellulären Calciumspiegel nach Stimulation mit S1P zu erhöhen, was eine Aktivierung der eNOS über den Ca²⁺ / calmodulinabhängigen Signalweg wahrscheinlich macht [431].

4.3.3 Bedeutung der antiapoptotischen Wirkung von S1P in Keratinozyten

Auch in der Haut ist das Gleichgewicht zwischen Apoptose und Proliferation von immenser Bedeutung für die Regulation der Dicke der Epidermis, der Hornschicht

und der Wundheilung. Durch ein verändertes Apoptoseverhalten der Keratinozyten kann es zu Erkrankungen wie der Psoriasis oder auch zur Tumorbildung kommen, die mit verminderter Apoptose einhergehen, doch auch in der Wundheilung kommt der Apoptose eine entscheidende Bedeutung zu [432]. Besonders NO spielt eine wichtige Rolle bei der Apoptoseregulation in der Wundheilung, und Substanzen, die die NO- Bildung steuern werden schon länger als potentielle Medikamente in der Regulation der Hautbalance diskutiert [339, 433]. Die Rolle des NO in der Wundheilung wird durch Einsatz von Inhibitoren der NO- Bildung klar, da durch Inhibitoren der NO- Bildung die Wundheilung drastisch verringert werden kann [434]. Auch ist bekannt, dass in eNOS^{-/-} Mäusen die Wundheilung erheblich vermindert ist. Ein besonderes Problem stellt die Wundheilung im Rahmen einer diabetischen Grunderkrankung dar. Bei diabetischen Patienten kann eine starke Abnahme der NO- Bildung im Wundgewebe beobachtet werden, allerdings kann durch Gabe einer NO- reichen Diät bei diabetischen ZDF Ratten eine Verbesserung der Wundheilung im Rahmen steigender NO- Spiegel beobachtet werden [435, 436]. Im Zusammenhang mit den in dieser Arbeit erbrachten Ergebnissen der gesteigerten Aktivierung der eNOS, und somit der NO- Bildung, durch S1P ist interessant, dass bei diabetischen Mäusen durch Injektion von S1P die Wundheilung signifikant verbessert werden kann [437]. Interessanterweise kann der wundheilungsfördernde Effekt durch die gleichzeitige Gabe eines S1P₂- Antagonisten nochmals gesteigert werden. Dies ist besonders in dem Zusammenhang interessant, als dass der S1P₂-Rezeptor für die Unterbrechung der Akt- vermittelten Insulineffekte in Keratinozyten durch S1P verantwortlich ist, und durch Ausschaltung des S1P₂-Rezeptors die zytoprotektive Wirkung des S1P verstärkt werden kann [248].

4.4 Ausblick

Mit Fingolimod steht ein medizinisch erprobter S1P-Rezeptoragonist zur Verfügung, der, da er keine Wirkung am S1P₂-Rezeptor zeigt, die in der vorliegenden Arbeit untersuchten negativen Effekte des S1P auf β -Zellen ausklammert. Es wäre also, besonders im Hinblick auf die schon existierende, positive Beeinflussung des Krankheitsverlaufs diabetischer Mäuse, welche mit Fingolimod gefüttert wurden, denkbar,

in diese Richtung weitere vielversprechende Wirkungen zu erforschen.

Ebenso besteht bezüglich des genauen Signalwegs der S1P-vermittelten Hemmung der Akt-Aktivierung über die in der vorliegenden Arbeit erbrachte Aufklärung der beteiligten Rezeptoren hinaus noch Forschungsbedarf. Hierbei wurde interessanterweise in anderen Zellen bereits ein Signalweg über S1P₂ und die durch S1P₂ aktivierte G12/13 und RhoA entdeckt, welcher über ROCK und PTEN direkt zu einer Senkung der Akt-Phosphorylierung führen kann [393, 438].

PTEN ist eine als Tumorsuppressor eingestufte Phosphatase, die über Dephosphorylierung der Akt- rekrutierenden Phosphatidylinositolderivate eine Aktivierung der Akt zu verhindern vermag, und somit auch die proliferationsfördernden und antiapoptotischen Signale des PI3K / Akt- Signalweges unterbinden kann [196]. In Studien mit PTEN^{-/-}- Mäusen konnte eine stark vergrößerte β -Zellmasse, und eine Resistenz gegen durch HFD induzierten T2DM beobachtet werden, was diese Phosphatase als wichtigen Forschungspunkt in der Regulation der β -Zellmasse und der Entstehung eines T2DM markiert [439].

Auch die positive Wirkung von S1P bei diabetischen Hautläsionen konnte durch Ausschaltung des S1P₂-Rezeptors verstärkt werden, was auch hier einen Vorteil durch Behandlung mit Fingolimod verschaffen könnte.

Durch die immunsuppressive Wirkung des Fingolimod wäre auch eine positive Beeinflussung der im späten Verlauf des T2DM auftretenden, stark dem autoimmunen T1DM ähnelnden, β -Zellzerstörung denkbar.

Ferner ist über die Wechselwirkungen des Pilzgiftes FB1 mit der β -Zelle sowie die Auswirkungen der erhöhten S1P-Spiegel nur sehr wenig bekannt, und auch die Regulation der Enzyme des Sphingolipidreostats durch Palmitat, besonders in diabetischen Mäusen, ist bisher nur wenig erforscht. Hier wären weitere Erkenntnisse wünschenswert.

5 Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung

Eine entscheidende Rolle im Fortschreiten des sich epidemieartig ausbreitenden Typ 2 Diabetes Mellitus (T2DM) kommt den freien Fettsäuren (FFA) zu. Besonders die gesättigte Fettsäure Palmitat ist hierbei ins Zentrum der Forschung gerückt, da sie in der Lage ist, den überlebenswichtigen Insulinsignalweg zu unterbrechen, welcher nach Andocken des anabolen und zellprotektiven Hormons an den Insulinrezeptor ausgelöst wird. Erhöhte Blutspiegel an FFA, insbesondere Palmitat, korrelieren demnach direkt mit dem Schweregrad der beim T2DM auftretenden Insulinresistenz, und Palmitat ist in der Lage, den Insulinsignalweg direkt durch negative Regulation der dem Insulinrezeptor nachgeschalteten PI3K / Akt- Signalkaskade zu unterbrechen.

Es ist aber nicht nur das Palmitat selbst, das eine solche Hemmung auslösen kann, sondern auch aus Palmitat gebildete Metabolite wie Ceramid, ein Sphingolipid, sind zur Hemmung der Akt- Aktivität befähigt. Ebenfalls das weniger gut erforschte Sphingolipid Sphingosin-1-phosphat (S1P) ist in vielen Zellen in der Lage, hemmend auf den Insulinsignalweg einzuwirken.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun gezeigt werden, ob auch in pankreatischen β -Zellen eine solche Hemmung des Insulinsignalwegs durch S1P feststellbar ist und inwiefern eine derartige Wechselwirkung in Bezug auf Erkrankungen der pankreatischen β -Zellen wie T2DM von Bedeutung sein können.

Zunächst interessant war, dass es besonders bei diabetischen Mäusen in Folge von fettreicher Nahrung zu einem starken Anstieg der S1P- Spiegel im Vergleich zu nicht- diabetischen Mäusen kam. Des Weiteren konnte bewiesen werden, dass in der β -Zelle die Umwandlung von Palmitat zu S1P in Abhängigkeit von der Serin-Palmitoyl-Transferase verläuft, dies aber nicht die einzige S1P-Quelle in der

β -Zelle darstellt. Zusätzlich ist Palmitat in der Lage, die Expression der auf- und abbauenden Enzyme des S1P so zu regulieren, dass eine massive Akkumulation von S1P in den β -Zellen begünstigt wird.

S1P ist ein elementarer Bestandteil der Zellmembranen, kann aber über intrazelluläre Wirkungen und seine fünf membranständigen, G-Proteingekoppelten Rezeptoren auch maßgeblich Einfluß auf viele Vorgänge in der Zelle nehmen. Eine besondere Rolle spielt S1P meist im Zellüberleben und in der Zellproliferation, wobei die Wirkungen aber stark vom Expressionsmuster der S1P- Rezeptoren auf der Zelloberfläche abhängig sind, da diese sehr unterschiedliche, teilweise sogar gegenläufige Effekte vermitteln können.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in der pankreatischen Betazelllinie MIN-6 eine verhältnismäßig starke Expression des S1P₂- Rezeptors belegt werden. Des Weiteren konnte eine über den S1P₂- Rezeptor vermittelte, hemmende Wirkung des S1P auf die insulinvermittelte Akt- Phosphorylierung ermittelt werden. Auch die insulinvermittelten, zellprotektiven Mechanismen wie Proliferation und Apoptosehemmung konnten durch S1P über den S1P₂- Rezeptor unterbrochen werden. Eine Beteiligung von S1P an der negativen Wirkung des Palmitats auf den Insulinsignalweg über den S1P₂- Rezeptor konnte ebenfalls belegt werden.

Bei Betrachtung dieser desaströsen Wirkungen von S1P auf die β -Zelle sollte aber nicht außer Acht gelassen werden, dass diese exklusiv über den S1P₂- Rezeptor vermittelt werden. Über andere Rezeptoren wie S1P₁ oder S1P₃ kann S1P auch zellprotektiv wirken. Dies wird besonders in der Haut deutlich, wo innerhalb einer Versuchsreihe der vorliegenden Arbeit bewiesen werden konnte, dass S1P über eine erhöhte Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) und eine Aktivierung der endothelialen NO-Synthase eNOS primäre Keratinozyten vor der Apoptose schützen kann. Dieser Mechanismus konnte aber exklusiv auf den S1P₃- Rezeptor zurückgeführt werden.

Die Abhängigkeit der in dieser Arbeit erforschten hemmenden Wirkungen des S1P vom S1P₂- Rezeptor könnten einen Ansatzpunkt für zukünftige Therapien darstellen, indem über die therapeutische Verwendung von S1P- Agonisten, welche nicht an den S1P₂-Rezeptor binden, die positiven Wirkungen des S1P über andere Rezeptoren wie den S1P₁- und ₃- Rezeptor in den Vordergrund gerückt werden.

5.2 Abstract

Free fatty acids (FFA) inherit a crucial role in the progression of the epidemic spreading disease type 2 diabetes mellitus (T2DM). Hereby, particularly the saturated fatty acid palmitate is placed at the center of research, since it is in a position to interrupt the insulin signaling, which is elemental for the survival of the cell. The insulin pathway is normally activated, if the anabolic and cellprotective hormone insulin binds to the insulin receptor. Elevated FFA levels, especially palmitate, directly correlate with the severity of insulinresistance and palmitate can directly inhibit the insulin pathway by negatively regulating the PI3K / Akt signaling cascade downstream of the insulin receptor.

But it is not only palmitate itself, which can cause such an inhibition, but also metabolites built from palmitate like ceramide, a sphingolipid, which can also inhibit Akt activation. But also sphingosine-1-phosphate (S1P), a relatively less well researched sphingolipid, can negatively influence the insulin signaling pathway in many cell lines.

In the present study it was to be shown, whether S1P is also able to inhibit the insulin signaling pathway in pancreatic β cells and how such an interaction may be important in terms of pancreatic diseases of the β -cell like T2DM.

First it was of interest that, as a result of high fat feeding, it comes to a sharp increase in S1P levels in diabetic mice compared to non-diabetic littermates. It was also shown, that a palmitate oversupply in the β -cell can lead to the generation of S1P, which is dependant on the serine palmitoyl transferase. But it was clear, that this is not the only source of S1P in the β -cell. Additionally, palmitate can regulate the expression of S1P-building and S1P-degrading enzymes in a way that leads to a massive accumulation of S1P.

S1P is an elementary component of the cell membrane, but it can also elicit intracellular effects as well as effects via its five membranebound G-proteincoupled receptors. It's effects are highly dependant on the expression pattern of the S1P receptors at the cell surface, because these receptors can mediate very different, sometimes even contrary effects.

In this work, a relatively strong expression of the S1P₂-receptor could be observed in the pancreatic β -cell line MIN-6. Furthermore, an S1P₂ dependant, inhibitory effect of S1P on the insulinmediated Akt- phosphorylation could be observed, as well as an inhibition of insulin mediated proliferative and antiapoptotic signalingm which was

also mediated via the S1P₂-receptor. A participation of S1P on the negative effects of palmitate on insulin signaling via the S1P₂-receptor could also be assigned.

In considering these disastrous effects of S1P on the β -cell it should not be ignored, that these effects are exclusively mediated via the S1P₂-receptor. But S1P can also be cellprotective via the S1P₁ or the S1P₃ receptor. This is particularly evident in the skin, where it could be proven in one series of experiments of the present study, that S1P can protect primary keratinocytes from apoptosis via the activation of the endothelial nitric oxide synthase eNOS and subsequent production of nitric oxide. This mechanism could be traced back exclusively to a signaling via the S1P₃ - receptor.

The dependence of the inhibitory effects of S1P on the S1P₂ - receptor studied in this work could provide a starting point for future therapies. By using S1P agonists, which do not bind to the S1P₂- receptor, the positive effects of S1P on other receptors such as the S1P₁ - and the S1P₃ - receptor could be brought to the fore.

Literaturverzeichnis

- [1] A. Klip und M. R. Pâquet. „Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation.“ In: *Diabetes Care* 13.3 (März 1990), S. 228–243 (siehe S. 11).
- [2] J. Nakae, B. C. Park und D. Accili. „Insulin stimulates phosphorylation of the forkhead transcription factor FKHR on serine 253 through a Wortmannin-sensitive pathway.“ In: *J Biol Chem* 274.23 (Juni 1999), S. 15982–15985 (siehe S. 12).
- [3] S. J. Pilkis und D. K. Granner. „Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis.“ In: *Annu Rev Physiol* 54 (1992), S. 885–909. DOI: 10.1146/annurev.ph.54.030192.004321. URL: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ph.54.030192.004321> (siehe S. 12).
- [4] Ingo B. Leibiger, Barbara Leibiger und Per-Olof Berggren. „Insulin signaling in the pancreatic beta-cell.“ In: *Annu Rev Nutr* 28 (2008), S. 233–251. DOI: 10.1146/annurev.nutr.28.061807.155530. URL: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.nutr.28.061807.155530> (siehe S. 12).
- [5] S. H. Chiang u. a. „Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10.“ In: *Nature* 410.6831 (Apr. 2001), S. 944–948. DOI: 10.1038/35073608. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/35073608> (siehe S. 12).
- [6] M. E. Patti und C. R. Kahn. „The insulin receptor—a critical link in glucose homeostasis and insulin action.“ In: *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 9.2-4 (1998), S. 89–109 (siehe S. 12).
- [7] M. F. White. „The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action.“ In: *Mol Cell Biochem* 182.1-2 (Mai 1998), S. 3–11 (siehe S. 12).
- [8] P. R. Shepherd, B. T. Navé und K. Siddle. „Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase.“ In: *Biochem J* 305 (Pt 1) (Jan. 1995), S. 25–28 (siehe S. 12).
- [9] D. R. Alessi u. a. „Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha.“ In: *Curr Biol* 7.4 (Apr. 1997), S. 261–269 (siehe S. 12, 29).
- [10] D. A. Cross u. a. „The inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin or insulin-like growth factor 1 in the rat skeletal muscle cell line L6 is blocked by wortmannin, but not by rapamycin: evidence that wortmannin blocks activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in L6 cells between Ras and Raf.“ In: *Biochem J* 303 (Pt 1) (Okt. 1994), S. 21–26 (siehe S. 12).
- [11] D. A. Cross u. a. „Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B.“ In: *Nature* 378.6559 (1995), S. 785–789. DOI: 10.1038/378785a0. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/378785a0> (siehe S. 12).
- [12] M. D. Michael u. a. „Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction.“ In: *Mol Cell* 6.1 (Juli 2000), S. 87–97 (siehe S. 12).
- [13] M. Elchebly u. a. „Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene.“ In: *Science* 283.5407 (März 1999), S. 1544–1548 (siehe S. 12).

- [14] Christian Janßen u. a. *Der Einfluss von sozialer Ungleichheit auf die medizinische und gesundheitsbezogene Versorgung in Deutschland*. Springer, 2009 (siehe S. 13).
- [15] A. Kukreja und N. K. Maclaren. „Autoimmunity and diabetes.“ In: *J Clin Endocrinol Metab* 84.12 (Dez. 1999), S. 4371–4378 (siehe S. 13).
- [16] Sergey Nejentsev u. a. „Localization of type 1 diabetes susceptibility to the MHC class I genes HLA-B and HLA-A.“ In: *Nature* 450.7171 (Dez. 2007), S. 887–892 (siehe S. 13).
- [17] Kalindi D. Hettiarachchi, Paul Z. Zimmet und Mark A. Myers. „The effects of repeated exposure to sub-toxic doses of plecomacrolide antibiotics on the endocrine pancreas.“ In: *Food Chem Toxicol* 44.12 (Dez. 2006), S. 1966–1977. DOI: 10.1016/j.fct.2006.06.023. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2006.06.023> (siehe S. 13).
- [18] K. D. Hettiarachchi, P. Z. Zimmet und M. A. Myers. „The plecomacrolide vacuolar-ATPase inhibitor bafilomycin, alters insulin signaling in MIN6 beta-cells.“ In: *Cell Biol Toxicol* 22.3 (Mai 2006), S. 169–181. DOI: 10.1007/s10565-006-0054-8. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s10565-006-0054-8> (siehe S. 13).
- [19] R. A. DeFronzo. „Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia and atherosclerosis.“ In: *Neth J Med* 50.5 (Mai 1997), S. 191–197 (siehe S. 14).
- [20] R. C. Turner u. a. „Insulin deficiency and insulin resistance interaction in diabetes: estimation of their relative contribution by feedback analysis from basal plasma insulin and glucose concentrations.“ In: *Metabolism* 28.11 (Nov. 1979), S. 1086–1096 (siehe S. 14).
- [21] Christine C. Jensen u. a. „Beta-cell function is a major contributor to oral glucose tolerance in high-risk relatives of four ethnic groups in the U.S.“ In: *Diabetes* 51.7 (Juli 2002), S. 2170–2178 (siehe S. 14).
- [22] J. Rahier u. a. „Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes.“ In: *Diabetes Obes Metab* 10 Suppl 4 (Nov. 2008), S. 32–42. DOI: 10.1111/j.1463-1326.2008.00969.x. URL: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-1326.2008.00969.x> (siehe S. 14).
- [23] J. E. Pessin und A. R. Saltiel. „Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance.“ In: *J Clin Invest* 106.2 (Juli 2000), S. 165–169. DOI: 10.1172/JCI10582. URL: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI10582> (siehe S. 14).
- [24] K. J. Chang-Chen, R. Mullur und E. Bernal-Mizrachi. „Beta-cell failure as a complication of diabetes.“ In: *Rev Endocr Metab Disord* 9.4 (Dez. 2008), S. 329–343. DOI: 10.1007/s11154-008-9101-5. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s11154-008-9101-5> (siehe S. 14).
- [25] Olivia Gill-Carey und Andrew T. Hattersley. „Genetics and type 2 diabetes in youth.“ In: *Pediatr Diabetes* 8 Suppl 9 (Dez. 2007), S. 42–47. DOI: 10.1111/j.1399-5448.2007.00331.x. URL: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-5448.2007.00331.x> (siehe S. 14).
- [26] Zachary T. Bloomgarden. „Adiposity and diabetes.“ In: *Diabetes Care* 25.12 (Dez. 2002), S. 2342–2349 (siehe S. 14).
- [27] J. Vander Molen u. a. „Population genetics of CAPN10 and GPR35: implications for the evolution of type 2 diabetes variants.“ In: *Am J Hum Genet* 76.4 (Apr. 2005), S. 548–560. DOI: 10.1086/428784. URL: <http://dx.doi.org/10.1086/428784> (siehe S. 14).
- [28] Inga Prokopenko, Mark I. McCarthy und Cecilia M. Lindgren. „Type 2 diabetes: new genes, new understanding.“ In: *Trends Genet* 24.12 (Dez. 2008), S. 613–621. DOI: 10.1016/j.tig.2008.09.004. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2008.09.004> (siehe S. 14).
- [29] H. Wobser u. a. „Downregulation of protein kinase B/Akt-1 mediates INS-1 insulinoma cell apoptosis induced by dominant-negative suppression of hepatocyte nuclear factor-1alpha function.“ eng. In: *Diabetologia* 49.3 (März 2006), S. 519–526. DOI: 10.1007/s00125-005-0119-x. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-005-0119-x> (siehe S. 14).

- [30] Eric Ravussin und Steven R. Smith. „Increased fat intake, impaired fat oxidation, and failure of fat cell proliferation result in ectopic fat storage, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus.“ In: *Ann N Y Acad Sci* 967 (Juni 2002), S. 363–378 (siehe S. 14).
- [31] Michael W. Rajala und Philipp E. Scherer. „Minireview: The adipocyte—at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis.“ In: *Endocrinology* 144.9 (Sep. 2003), S. 3765–3773 (siehe S. 14).
- [32] N. M. O’Meara u. a. „Lack of control by glucose of ultradian insulin secretory oscillations in impaired glucose tolerance and in non-insulin-dependent diabetes mellitus.“ In: *J Clin Invest* 92.1 (Juli 1993), S. 262–271. DOI: 10.1172/JCI116560. URL: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI116560> (siehe S. 14).
- [33] Muhammad Sajid Hamid Akash, Kanwal Rehman und Shuqing Chen. „Role of inflammatory mechanisms in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus.“ In: *J Cell Biochem* (Sep. 2012). DOI: 10.1002/jcb.24402. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.24402> (siehe S. 15).
- [34] Y. Zick. „Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling.“ In: *Trends Cell Biol* 11.11 (Nov. 2001), S. 437–441 (siehe S. 15).
- [35] Michael Stumvoll, Barry J. Goldstein und Timon W. van Haeften. „Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy.“ In: *Lancet* 365.9467 (2005), S. 1333–1346. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)61032-X. URL: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)61032-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(05)61032-X) (siehe S. 15).
- [36] G. Boden. „Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM.“ In: *Diabetes* 46.1 (Jan. 1997), S. 3–10 (siehe S. 15).
- [37] Michael Stumvoll u. a. „Glucose allostasis.“ In: *Diabetes* 52.4 (Apr. 2003), S. 903–909 (siehe S. 15).
- [38] C. Weyer u. a. „The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus.“ In: *J Clin Invest* 104.6 (Sep. 1999), S. 787–794. DOI: 10.1172/JCI7231. URL: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI7231> (siehe S. 15).
- [39] R Paul Robertson u. a. „Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection.“ In: *Diabetes* 52.3 (März 2003), S. 581–587 (siehe S. 15).
- [40] C. Carlsson, L. A. Borg und N. Welsh. „Sodium palmitate induces partial mitochondrial uncoupling and reactive oxygen species in rat pancreatic islets in vitro.“ In: *Endocrinology* 140.8 (Aug. 1999), S. 3422–3428 (siehe S. 15).
- [41] R. N. Bergman und M. Ader. „Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus.“ In: *Trends Endocrinol Metab* 11.9 (Nov. 2000), S. 351–356 (siehe S. 15).
- [42] M. Manco u. a. „Insulin resistance directly correlates with increased saturated fatty acids in skeletal muscle triglycerides.“ In: *Metabolism* 49.2 (Feb. 2000), S. 220–224 (siehe S. 15).
- [43] G. S. Hotamisligil und B. M. Spiegelman. „Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link.“ In: *Diabetes* 43.11 (Nov. 1994), S. 1271–1278 (siehe S. 15).
- [44] R. N. Kulkarni u. a. „Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes.“ In: *Cell* 96.3 (Feb. 1999), S. 329–339 (siehe S. 15, 27).
- [45] Ernesto Bernal-Mizrachi u. a. „Defective insulin secretion and increased susceptibility to experimental diabetes are induced by reduced Akt activity in pancreatic islet beta cells.“ eng. In: *J Clin Invest* 114.7 (Okt. 2004), S. 928–936. DOI: 10.1172/JCI20016. URL: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI20016> (siehe S. 16).
- [46] Steven E. Kahn, Rebecca L. Hull und Kristina M. Utzschneider. „Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes.“ In: *Nature* 444.7121 (Dez. 2006), S. 840–846. DOI: 10.1038/nature05482. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nature05482> (siehe S. 16, 114).

- [47] James S. Pankow u. a. „Fasting plasma free fatty acids and risk of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study.“ In: *Diabetes Care* 27.1 (Jan. 2004), S. 77–82 (siehe S. 16, 114).
- [48] Marc Prentki und Christopher J. Nolan. „Islet beta cell failure in type 2 diabetes.“ In: *J Clin Invest* 116.7 (Juli 2006), S. 1802–1812. DOI: 10.1172/JCI29103. URL: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI29103> (siehe S. 16).
- [49] G. Paolisso u. a. „A high concentration of fasting plasma non-esterified fatty acids is a risk factor for the development of NIDDM.“ In: *Diabetologia* 38.10 (Okt. 1995), S. 1213–1217 (siehe S. 16, 114).
- [50] J. Górski, A. Nawrocki und M. Murthy. „Characterization of free and glyceride-esterified long chain fatty acids in different skeletal muscle types of the rat.“ In: *Mol Cell Biochem* 178.1-2 (Jan. 1998), S. 113–118 (siehe S. 16).
- [51] Thierry Alquier und Vincent Poitout. „GPR40: good cop, bad cop?“ In: *Diabetes* 58.5 (Mai 2009), S. 1035–1036. DOI: 10.2337/db09-0215. URL: <http://dx.doi.org/10.2337/db09-0215> (siehe S. 16).
- [52] Yasuaki Itoh und Shuji Hinuma. „GPR40, a free fatty acid receptor on pancreatic beta cells, regulates insulin secretion.“ In: *Hepatol Res* 33.2 (Okt. 2005), S. 171–173. DOI: 10.1016/j.hepres.2005.09.028. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hepres.2005.09.028> (siehe S. 16).
- [53] M. Cnop u. a. „Causes and cures for endoplasmic reticulum stress in lipotoxic β -cell dysfunction.“ In: *Diabetes Obes Metab* 12 Suppl 2 (Okt. 2010), S. 76–82. DOI: 10.1111/j.1463-1326.2010.01279.x. URL: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-1326.2010.01279.x> (siehe S. 16).
- [54] Y. P. Zhou und V. Grill. „Long term exposure to fatty acids and ketones inhibits B-cell functions in human pancreatic islets of Langerhans.“ In: *J Clin Endocrinol Metab* 80.5 (Mai 1995), S. 1584–1590 (siehe S. 16).
- [55] M. Cnop u. a. „Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation.“ In: *Diabetes* 50.8 (Aug. 2001), S. 1771–1777 (siehe S. 16).
- [56] A. Chabowski u. a. „Fatty acid transporters involved in the palmitate and oleate induced insulin resistance in primary rat hepatocytes.“ eng. In: *Acta Physiol (Oxf)* (Nov. 2012). DOI: 10.1111/apha.12022. URL: <http://dx.doi.org/10.1111/apha.12022> (siehe S. 16).
- [57] Sattar Gorgani-Firuzjaee u. a. „Leukocyte antigen-related inhibition attenuates palmitate-induced insulin resistance in muscle cells.“ In: *J Endocrinol* 215.1 (Okt. 2012), S. 71–77. DOI: 10.1530/JOE-12-0160. URL: <http://dx.doi.org/10.1530/JOE-12-0160> (siehe S. 16, 114).
- [58] Xiao-Jin Li u. a. „LRP16 gene protects mouse insulinoma MIN6 cells against fatty acid-induced apoptosis through Akt/FoxO1 signaling.“ eng. In: *Chin Med J (Engl)* 125.10 (Mai 2012), S. 1695–1702 (siehe S. 16).
- [59] M. J. Watt u. a. „Regulation of plasma ceramide levels with fatty acid oversupply: evidence that the liver detects and secretes de novo synthesised ceramide.“ eng. In: *Diabetologia* 55.10 (Okt. 2012), S. 2741–2746. DOI: 10.1007/s00125-012-2649-3. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-012-2649-3> (siehe S. 16).
- [60] Agnieszka U. Blachnio-Zabielska u. a. „A liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for measuring the in vivo incorporation of plasma free fatty acids into intramyocellular ceramides in humans.“ eng. In: *Rapid Commun Mass Spectrom* 26.9 (Mai 2012), S. 1134–1140. DOI: 10.1002/rcm.6216. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/rcm.6216> (siehe S. 16, 115).
- [61] J. Turinsky, D. M. O’Sullivan und B. P. Bayly. „1,2-Diacylglycerol and ceramide levels in insulin-resistant tissues of the rat in vivo.“ eng. In: *J Biol Chem* 265.28 (Okt. 1990), S. 16880–16885 (siehe S. 16, 31).

- [62] S. A. Summers u. a. „Regulation of insulin-stimulated glucose transporter GLUT4 translocation and Akt kinase activity by ceramide.“ eng. In: *Mol Cell Biol* 18.9 (Sep. 1998), S. 5457–5464 (siehe S. 16, 31, 115, 117).
- [63] Julien Véret u. a. „Ceramide synthase 4 and de novo production of ceramides with specific N-acyl chain lengths are involved in glucolipotoxicity-induced apoptosis of INS-1 β -cells.“ In: *Biochem J* 438.1 (Aug. 2011), S. 177–189. DOI: 10.1042/BJ20101386. URL: <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20101386> (siehe S. 16, 115).
- [64] Julien Véret u. a. „Role of palmitate-induced sphingoid base-1-phosphate biosynthesis in INS-1 β -cell survival.“ eng. In: *Biochim Biophys Acta* 1831.2 (Okt. 2012), S. 251–262. DOI: 10.1016/j.bbaliip.2012.10.003. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbaliip.2012.10.003> (siehe S. 16, 116).
- [65] J. R. Ortlepp u. a. „A metabolic syndrome of hypertension, hyperinsulinaemia and hypercholesterolaemia in the New Zealand obese mouse.“ In: *Eur J Clin Invest* 30.3 (März 2000), S. 195–202 (siehe S. 17).
- [66] R. Kluge u. a. „Quantitative trait loci for obesity and insulin resistance (Nob1, Nob2) and their interaction with the leptin receptor allele (LeprA720T/T1044I) in New Zealand obese mice.“ In: *Diabetologia* 43.12 (Dez. 2000), S. 1565–1572. DOI: 10.1007/s001250051570. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s001250051570> (siehe S. 17).
- [67] R. J. Gates u. a. „Return to normal of blood-glucose, plasma-insulin, and weight gain in New Zealand obese mice after implantation of islets of Langerhans.“ In: *Lancet* 2.7777 (Sep. 1972), S. 567–570 (siehe S. 18).
- [68] M. C. Veroni, J. Proietto und R. G. Larkins. „Evolution of insulin resistance in New Zealand obese mice.“ In: *Diabetes* 40.11 (Nov. 1991), S. 1480–1487 (siehe S. 18).
- [69] H. Huchzermeyer, K. H. Rudorff und W. Staib. „[Experimental studies on the problem of insulin resistance in adipositas and diabetes mellitus, with the aid of New Zealand obese mice. Pathogenesis of the obese-hyperglycaemic syndrome (author’s transl)].“ In: *Z Klin Chem Klin Biochem* 11.6 (Juni 1973), S. 249–256 (siehe S. 18).
- [70] R. G. Larkins. „Defective insulin secretion in the N.Z.O. mouse: in vitro studies.“ In: *Endocrinology* 93.5 (Nov. 1973), S. 1052–1056 (siehe S. 18).
- [71] H. Ishihara u. a. „Pancreatic beta cell line MIN6 exhibits characteristics of glucose metabolism and glucose-stimulated insulin secretion similar to those of normal islets.“ In: *Diabetologia* 36.11 (Nov. 1993), S. 1139–1145 (siehe S. 18).
- [72] Paul Dowling u. a. „Proteomic screening of glucose-responsive and glucose non-responsive MIN-6 beta cells reveals differential expression of proteins involved in protein folding, secretion and oxidative stress.“ In: *Proteomics* 6.24 (Dez. 2006), S. 6578–6587. DOI: 10.1002/pmic.200600298. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200600298> (siehe S. 18).
- [73] Arnaud Merglen u. a. „Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells.“ In: *Endocrinology* 145.2 (Feb. 2004), S. 667–678. DOI: 10.1210/en.2003-1099. URL: <http://dx.doi.org/10.1210/en.2003-1099> (siehe S. 18, 57, 112).
- [74] Alfons Lawen. „Apoptosis-an introduction.“ In: *Bioessays* 25.9 (Sep. 2003), S. 888–896. DOI: 10.1002/bies.10329. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/bies.10329> (siehe S. 18, 19).
- [75] JW Saunders Jr. „Death in embryonic systems.“ In: *Science* 154.3749 (Nov. 1966), S. 604–612 (siehe S. 18).
- [76] Peter G H. Clarke. „Apoptosis: from morphological types of cell death to interacting pathways.“ In: *Trends Pharmacol Sci* 23.7 (Juli 2002), 308–9, author reply 310 (siehe S. 18).

- [77] M. O. Hengartner. „The biochemistry of apoptosis.“ In: *Nature* 407.6805 (Okt. 2000), S. 770–776. DOI: 10.1038/35037710. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/35037710> (siehe S. 19).
- [78] Aimee L. Edinger und Craig B. Thompson. „Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy.“ In: *Curr Opin Cell Biol* 16.6 (Dez. 2004), S. 663–669. DOI: 10.1016/j.ceb.2004.09.011. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2004.09.011> (siehe S. 19).
- [79] J. Van Limbergen u. a. „Autophagy: from basic science to clinical application.“ In: *Mucosal Immunol* 2.4 (Juli 2009), S. 315–330. DOI: 10.1038/mi.2009.20. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/mi.2009.20> (siehe S. 19).
- [80] Daniel J. Klionsky. „The molecular machinery of autophagy: unanswered questions.“ In: *J Cell Sci* 118.Pt 1 (Jan. 2005), S. 7–18. DOI: 10.1242/jcs.01620. URL: <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.01620> (siehe S. 19).
- [81] T. Noda, N. Fujita und T. Yoshimori. „The late stages of autophagy: how does the end begin?“ In: *Cell Death Differ* 16.7 (Juli 2009), S. 984–990. DOI: 10.1038/cdd.2009.54. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2009.54> (siehe S. 19).
- [82] Luisa Martino u. a. „Palmitate activates autophagy in INS-1E β -cells and in isolated rat and human pancreatic islets.“ In: *PLoS One* 7.5 (2012), e36188. DOI: 10.1371/journal.pone.0036188. URL: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0036188> (siehe S. 19, 109).
- [83] Dmitri V. Krysko u. a. „Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis.“ In: *Methods* 44.3 (März 2008), S. 205–221. DOI: 10.1016/j.ymeth.2007.12.001. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.12.001> (siehe S. 19).
- [84] Alexandra E. Butler u. a. „Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes.“ In: *Diabetes* 52.1 (Jan. 2003), S. 102–110 (siehe S. 19, 23).
- [85] P. G. Clarke und S. Clarke. „Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena.“ In: *Anat Embryol (Berl)* 193.2 (Feb. 1996), S. 81–99 (siehe S. 20).
- [86] R. A. Lockshin und C. M. Williams. „Programmed cell death. V. Cytolytic enzymes in relation to the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms.“ In: *J Insect Physiol* 11.7 (Juli 1965), S. 831–844 (siehe S. 20).
- [87] J. F. Kerr, A. H. Wyllie und A. R. Currie. „Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.“ In: *Br J Cancer* 26.4 (Aug. 1972), S. 239–257 (siehe S. 20).
- [88] Vanessa Zuzarte-Luís und Juan M. Hurlé. „Programmed cell death in the developing limb.“ In: *Int J Dev Biol* 46.7 (2002), S. 871–876 (siehe S. 20).
- [89] G. Melino. „The Sirens’ song.“ In: *Nature* 412.6842 (Juli 2001), S. 23. DOI: 10.1038/35083653. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/35083653> (siehe S. 20).
- [90] P. Saikumar u. a. „Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease.“ In: *Am J Med* 107.5 (Nov. 1999), S. 489–506 (siehe S. 20).
- [91] B. F. Trump u. a. „The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis.“ In: *Toxicol Pathol* 25.1 (1997), S. 82–88 (siehe S. 20).
- [92] E. S. Alnemri u. a. „Human ICE/CED-3 protease nomenclature.“ In: *Cell* 87.2 (Okt. 1996), S. 171 (siehe S. 20).
- [93] D. R. Green und J. C. Reed. „Mitochondria and apoptosis.“ In: *Science* 281.5381 (Aug. 1998), S. 1309–1312 (siehe S. 20).
- [94] C. A. Smith, T. Farrah und R. G. Goodwin. „The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death.“ In: *Cell* 76.6 (März 1994), S. 959–962 (siehe S. 21).

- [95] A. M. Chinnaiyan und V. M. Dixit. „The cell-death machine.“ In: *Curr Biol* 6.5 (Mai 1996), S. 555–562 (siehe S. 21).
- [96] Pablo Fuentes-Prior und Guy S. Salvesen. „The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition.“ In: *Biochem J* 384.Pt 2 (Dez. 2004), S. 201–232. DOI: 10.1042/BJ20041142. URL: <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20041142> (siehe S. 21).
- [97] M. Chen und J. Wang. „Initiator caspases in apoptosis signaling pathways.“ In: *Apoptosis* 7.4 (Aug. 2002), S. 313–319 (siehe S. 21).
- [98] Cristina Pop und Guy S. Salvesen. „Human caspases: activation, specificity, and regulation.“ In: *J Biol Chem* 284.33 (Aug. 2009), S. 21777–21781. DOI: 10.1074/jbc.R800084200. URL: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R800084200> (siehe S. 21).
- [99] Olivier Micheau und Jürg Tschopp. „Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes.“ In: *Cell* 114.2 (Juli 2003), S. 181–190 (siehe S. 21).
- [100] L. Boscá und S. Hortelano. „Mechanisms of nitric oxide-dependent apoptosis: involvement of mitochondrial mediators.“ In: *Cell Signal* 11.4 (Apr. 1999), S. 239–244 (siehe S. 22).
- [101] Jianze Li, Brenda Lee und Amy S. Lee. „Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53.“ In: *J Biol Chem* 281.11 (März 2006), S. 7260–7270. DOI: 10.1074/jbc.M509868200. URL: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M509868200> (siehe S. 22).
- [102] S. Desagher und J. C. Martinou. „Mitochondria as the central control point of apoptosis.“ In: *Trends Cell Biol* 10.9 (Sep. 2000), S. 369–377 (siehe S. 22).
- [103] Hiroshi Shiraishi u. a. „ER stress-induced apoptosis and caspase-12 activation occurs downstream of mitochondrial apoptosis involving Apaf-1.“ In: *J Cell Sci* 119.Pt 19 (Okt. 2006), S. 3958–3966. DOI: 10.1242/jcs.03160. URL: <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.03160> (siehe S. 22).
- [104] Stefan J. Riedl und Guy S. Salvesen. „The apoptosome: signalling platform of cell death.“ In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 8.5 (Mai 2007), S. 405–413. DOI: 10.1038/nrm2153. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2153> (siehe S. 22).
- [105] Hanan Boujrad u. a. „AIF-mediated programmed necrosis: a highly regulated way to die.“ In: *Cell Cycle* 6.21 (Nov. 2007), S. 2612–2619 (siehe S. 22).
- [106] Frederik H. Igney und Peter H. Krammer. „Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis.“ In: *Nat Rev Cancer* 2.4 (Apr. 2002), S. 277–288. DOI: 10.1038/nrc776. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc776> (siehe S. 22).
- [107] H. Li u. a. „Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis.“ In: *Cell* 94.4 (Aug. 1998), S. 491–501 (siehe S. 22).
- [108] W. C. Earnshaw, L. M. Martins und S. H. Kaufmann. „Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis.“ In: *Annu Rev Biochem* 68 (1999), S. 383–424. DOI: 10.1146/annurev.biochem.68.1.383. URL: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.383> (siehe S. 22).
- [109] T. Chittenden u. a. „Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak.“ In: *Nature* 374.6524 (Apr. 1995), S. 733–736. DOI: 10.1038/374733a0. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/374733a0> (siehe S. 22).
- [110] D. T. Chao und S. J. Korsmeyer. „BCL-2 family: regulators of cell death.“ In: *Annu Rev Immunol* 16 (1998), S. 395–419. DOI: 10.1146/annurev.immunol.16.1.395. URL: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.395> (siehe S. 22).
- [111] M. B. Jarpe u. a. „Anti-apoptotic versus pro-apoptotic signal transduction: checkpoints and stop signs along the road to death.“ In: *Oncogene* 17.11 Reviews (Sep. 1998), S. 1475–1482. DOI: 10.1038/sj.onc.1202183. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1202183> (siehe S. 22).

- [112] T. W. Behrens und D. L. Mueller. „Bcl-x and the regulation of survival in the immune system.“ In: *Immunol Res* 16.2 (1997), S. 149–160 (siehe S. 22).
- [113] B. Huppertz, H. G. Frank und P. Kaufmann. „The apoptosis cascade–morphological and immunohistochemical methods for its visualization.“ In: *Anat Embryol (Berl)* 200.1 (Juli 1999), S. 1–18 (siehe S. 23).
- [114] U. K. Messmer und J. Pfeilschifter. „New insights into the mechanism for clearance of apoptotic cells.“ In: *Bioessays* 22.10 (Okt. 2000), S. 878–881. DOI: 3.0.CO;2-J. URL: <http://dx.doi.org/3.0.CO;2-J> (siehe S. 23).
- [115] S. A. Kassem u. a. „Beta-cell proliferation and apoptosis in the developing normal human pancreas and in hyperinsulinism of infancy.“ In: *Diabetes* 49.8 (Aug. 2000), S. 1325–1333 (siehe S. 23).
- [116] A. V. Matveyenko und P. C. Butler. „Relationship between beta-cell mass and diabetes onset.“ In: *Diabetes Obes Metab* 10 Suppl 4 (Nov. 2008), S. 23–31. DOI: 10.1111/j.1463-1326.2008.00939.x. URL: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-1326.2008.00939.x> (siehe S. 23).
- [117] G. S. Eisenbarth. „Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease.“ In: *N Engl J Med* 314.21 (Mai 1986), S. 1360–1368. DOI: 10.1056/NEJM198605223142106. URL: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM198605223142106> (siehe S. 23).
- [118] Huw Bowen Jones, David Nugent und Richard Jenkins. „Variation in characteristics of islets of Langerhans in insulin-resistant, diabetic and non-diabetic-rat strains.“ In: *Int J Exp Pathol* 91.3 (Juni 2010), S. 288–301. DOI: 10.1111/j.1365-2613.2010.00713.x. URL: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2613.2010.00713.x> (siehe S. 23).
- [119] Piero Marchetti u. a. „Pancreatic islets from type 2 diabetic patients have functional defects and increased apoptosis that are ameliorated by metformin.“ In: *J Clin Endocrinol Metab* 89.11 (Nov. 2004), S. 5535–5541. DOI: 10.1210/jc.2004-0150. URL: <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2004-0150> (siehe S. 23, 24).
- [120] Seiichi Oyadomari, E. Araki und M. Mori. „Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells.“ In: *Apoptosis* 7.4 (Aug. 2002), S. 335–345 (siehe S. 23).
- [121] Ilham Kharroubi u. a. „Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-kappaB and endoplasmic reticulum stress.“ In: *Endocrinology* 145.11 (Nov. 2004), S. 5087–5096. DOI: 10.1210/en.2004-0478. URL: <http://dx.doi.org/10.1210/en.2004-0478> (siehe S. 23, 109).
- [122] S. Oyadomari u. a. „Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic beta cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway.“ In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 98.19 (Sep. 2001), S. 10845–10850. DOI: 10.1073/pnas.191207498. URL: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.191207498> (siehe S. 23).
- [123] M. Federici u. a. „High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of Langerhans: a potential role for regulation of specific Bcl family genes toward an apoptotic cell death program.“ In: *Diabetes* 50.6 (Juni 2001), S. 1290–1301 (siehe S. 24).
- [124] Salvatore Piro u. a. „Chronic exposure to free fatty acids or high glucose induces apoptosis in rat pancreatic islets: possible role of oxidative stress.“ In: *Metabolism* 51.10 (Okt. 2002), S. 1340–1347 (siehe S. 24).
- [125] M. Shimabukuro u. a. „Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes.“ In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95.5 (März 1998), S. 2498–2502 (siehe S. 24, 115).
- [126] Christian E. Wrede u. a. „Protein kinase B/Akt prevents fatty acid-induced apoptosis in pancreatic beta-cells (INS-1).“ In: *J Biol Chem* 277.51 (Dez. 2002), S. 49676–49684. DOI: 10.1074/jbc.M208756200. URL: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M208756200> (siehe S. 24).

- [127] S. Lippens u. a. „Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification.“ eng. In: *Cell Death Differ* 12 Suppl 2 (Nov. 2005), S. 1497–1508. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401722. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4401722> (siehe S. 24).
- [128] B. M. Kurbanov u. a. „Resistance of melanoma cells to TRAIL does not result from upregulation of antiapoptotic proteins by NF-kappaB but is related to downregulation of initiator caspases and DR4.“ eng. In: *Oncogene* 26.23 (Mai 2007), S. 3364–3377. DOI: 10.1038/sj.onc.1210134. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1210134> (siehe S. 24).
- [129] H. Yan u. a. „Induction of melanoma cell apoptosis and inhibition of tumor growth using a cell-permeable Survivin antagonist.“ eng. In: *Oncogene* 25.52 (Nov. 2006), S. 6968–6974. DOI: 10.1038/sj.onc.1209676. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1209676> (siehe S. 24).
- [130] John M. Sheehan und Antony R. Young. „The sunburn cell revisited: an update on mechanistic aspects.“ eng. In: *Photochem Photobiol Sci* 1.6 (Juni 2002), S. 365–377 (siehe S. 24).
- [131] Hanna Galkowska u. a. „Expression of apoptosis- and cell cycle-related proteins in epidermis of venous leg and diabetic foot ulcers.“ eng. In: *Surgery* 134.2 (Aug. 2003), S. 213–220. DOI: 10.1067/msy.2003.223. URL: <http://dx.doi.org/10.1067/msy.2003.223> (siehe S. 24).
- [132] Azad Ahmad Ahanger u. a. „Wound healing activity of carbon monoxide liberated from CO-releasing molecule (CO-RM).“ eng. In: *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 384.1 (Juli 2011), S. 93–102. DOI: 10.1007/s00210-011-0653-7. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-011-0653-7> (siehe S. 24).
- [133] Chitrlekha Macherla u. a. „Nitric oxide releasing nanoparticles for treatment of Candida albicans burn infections.“ eng. In: *Front Microbiol* 3 (2012), S. 193. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00193. URL: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00193> (siehe S. 24).
- [134] Richard B. Weller. „Nitric oxide-containing nanoparticles as an antimicrobial agent and enhancer of wound healing.“ eng. In: *J Invest Dermatol* 129.10 (Okt. 2009), S. 2335–2337. DOI: 10.1038/jid.2009.149. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2009.149> (siehe S. 24).
- [135] David R. Hipfner und Stephen M. Cohen. „Connecting proliferation and apoptosis in development and disease.“ In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 5.10 (Okt. 2004), S. 805–815. DOI: 10.1038/nrm1491. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1491> (siehe S. 25).
- [136] T. C. Ko, W. A. Bresnahan und E. A. Thompson. „Intestinal cell cycle regulation.“ In: *Prog Cell Cycle Res* 3 (1997), S. 43–52 (siehe S. 25).
- [137] D. J. Lew und S. Kornbluth. „Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control.“ In: *Curr Opin Cell Biol* 8.6 (Dez. 1996), S. 795–804 (siehe S. 25).
- [138] K. Nakayama und K. Nakayama. „Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors: brakes of the cell cycle engine during development.“ In: *Bioessays* 20.12 (Dez. 1998), S. 1020–1029. DOI: 3.0.C0;2-D. URL: <http://dx.doi.org/3.0.C0;2-D> (siehe S. 25).
- [139] H. A. Coller u. a. „Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion.“ In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 97.7 (März 2000), S. 3260–3265 (siehe S. 25).
- [140] D. G. Johnson u. a. „Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase.“ In: *Nature* 365.6444 (Sep. 1993), S. 349–352. DOI: 10.1038/365349a0. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/365349a0> (siehe S. 25).
- [141] Hui-Zi Chen, Shih-Yin Tsai und Gustavo Leone. „Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control.“ In: *Nat Rev Cancer* 9.11 (Nov. 2009), S. 785–797. DOI: 10.1038/nrc2696. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2696> (siehe S. 26).
- [142] David Cobrinik. „Pocket proteins and cell cycle control.“ In: *Oncogene* 24.17 (Apr. 2005), S. 2796–2809. DOI: 10.1038/sj.onc.1208619. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1208619> (siehe S. 26).

- [143] A. J. Giaccia und M. B. Kastan. „The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals.“ In: *Genes Dev* 12.19 (Okt. 1998), S. 2973–2983 (siehe S. 26).
- [144] Pinar Yesil und Eckhard Lammert. „Islet dynamics: a glimpse at beta cell proliferation.“ In: *Histol Histopathol* 23.7 (Juli 2008), S. 883–895 (siehe S. 26).
- [145] L. Bouwens u. a. „Cytokeratins as markers of ductal cell differentiation and islet neogenesis in the neonatal rat pancreas.“ In: *Diabetes* 43.11 (Nov. 1994), S. 1279–1283 (siehe S. 26).
- [146] Luc Bouwens und Ilse Rooman. „Regulation of pancreatic beta-cell mass.“ In: *Physiol Rev* 85.4 (Okt. 2005), S. 1255–1270. DOI: 10.1152/physrev.00025.2004. URL: <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00025.2004> (siehe S. 26).
- [147] I. Swenne und U. Eriksson. „Diabetes in pregnancy: islet cell proliferation in the fetal rat pancreas.“ In: *Diabetologia* 23.6 (Dez. 1982), S. 525–528 (siehe S. 26).
- [148] A. Pick u. a. „Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat.“ In: *Diabetes* 47.3 (März 1998), S. 358–364 (siehe S. 26).
- [149] J. A. Parsons, T. C. Brelje und R. L. Sorenson. „Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion.“ In: *Endocrinology* 130.3 (März 1992), S. 1459–1466 (siehe S. 26).
- [150] J. C. Brüning u. a. „Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles.“ In: *Cell* 88.4 (Feb. 1997), S. 561–572 (siehe S. 26, 27).
- [151] Susan Bonner-Weir u. a. „The pancreatic ductal epithelium serves as a potential pool of progenitor cells.“ In: *Pediatr Diabetes* 5 Suppl 2 (2004), S. 16–22. DOI: 10.1111/j.1399-543X.2004.00075.x. URL: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-543X.2004.00075.x> (siehe S. 26).
- [152] Kristen Brennand, Danwei Huangfu und Doug Melton. „All beta cells contribute equally to islet growth and maintenance.“ In: *PLoS Biol* 5.7 (Juli 2007), e163. DOI: 10.1371/journal.pbio.0050163. URL: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0050163> (siehe S. 26).
- [153] Monica Teta u. a. „Growth and regeneration of adult beta cells does not involve specialized progenitors.“ In: *Dev Cell* 12.5 (Mai 2007), S. 817–826. DOI: 10.1016/j.devcel.2007.04.011. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2007.04.011> (siehe S. 26).
- [154] E. Montanya u. a. „Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats: role of beta-cell hyperplasia and hypertrophy.“ In: *Diabetes* 49.8 (Aug. 2000), S. 1341–1346 (siehe S. 26).
- [155] J. S. Brockenbrough, G. C. Weir und S. Bonner-Weir. „Discordance of exocrine and endocrine growth after 90% pancreatectomy in rats.“ In: *Diabetes* 37.2 (Feb. 1988), S. 232–236 (siehe S. 26).
- [156] Michele Pagano und Peter K. Jackson. „Wagging the dogma; tissue-specific cell cycle control in the mouse embryo.“ In: *Cell* 118.5 (Sep. 2004), S. 535–538. DOI: 10.1016/j.cell.2004.08.013. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.013> (siehe S. 26).
- [157] Irene Cozar-Castellano u. a. „Induction of beta-cell proliferation and retinoblastoma protein phosphorylation in rat and human islets using adenovirus-mediated transfer of cyclin-dependent kinase-4 and cyclin D1.“ In: *Diabetes* 53.1 (Jan. 2004), S. 149–159 (siehe S. 26).
- [158] Xiaoboo Zhang u. a. „Overexpression of cyclin D1 in pancreatic beta-cells in vivo results in islet hyperplasia without hypoglycemia.“ In: *Diabetes* 54.3 (März 2005), S. 712–719 (siehe S. 26).
- [159] Irene Cozar-Castellano u. a. „Molecular control of cell cycle progression in the pancreatic beta-cell.“ In: *Endocr Rev* 27.4 (Juni 2006), S. 356–370. DOI: 10.1210/er.2006-0004. URL: <http://dx.doi.org/10.1210/er.2006-0004> (siehe S. 26, 27, 107).

- [160] Lluis Fajas u. a. „Impaired pancreatic growth, beta cell mass, and beta cell function in E2F1 (-/-) mice.“ In: *J Clin Invest* 113.9 (Mai 2004), S. 1288–1295. DOI: 10.1172/JCI18555. URL: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI18555> (siehe S. 27).
- [161] Janakiraman Krishnamurthy u. a. „Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging.“ In: *J Clin Invest* 114.9 (Nov. 2004), S. 1299–1307. DOI: 10.1172/JCI22475. URL: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI22475> (siehe S. 27).
- [162] Tohru Uchida u. a. „Deletion of Cdkn1b ameliorates hyperglycemia by maintaining compensatory hyperinsulinemia in diabetic mice.“ In: *Nat Med* 11.2 (Feb. 2005), S. 175–182. DOI: 10.1038/nm1187. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nm1187> (siehe S. 27).
- [163] Janakiraman Krishnamurthy u. a. „p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential.“ In: *Nature* 443.7110 (Sep. 2006), S. 453–457. DOI: 10.1038/nature05092. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nature05092> (siehe S. 27).
- [164] Jeremy J. Heit, Satyajit K. Karnik und Seung K. Kim. „Intrinsic regulators of pancreatic beta-cell proliferation.“ In: *Annu Rev Cell Dev Biol* 22 (2006), S. 311–338. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104425. URL: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104425> (siehe S. 27, 107).
- [165] Rohit N. Kulkarni. „New insights into the roles of insulin/IGF-I in the development and maintenance of beta-cell mass.“ In: *Rev Endocr Metab Disord* 6.3 (Aug. 2005), S. 199–210. DOI: 10.1007/s11154-005-3051-y. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s11154-005-3051-y> (siehe S. 27).
- [166] R. L. Tuttle u. a. „Regulation of pancreatic beta-cell growth and survival by the serine/threonine protein kinase Akt1/PKBalpha.“ In: *Nat Med* 7.10 (Okt. 2001), S. 1133–1137. DOI: 10.1038/nm1001-1133. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nm1001-1133> (siehe S. 27).
- [167] Jun Nakae u. a. „Regulation of insulin action and pancreatic beta-cell function by mutated alleles of the gene encoding forkhead transcription factor Foxo1.“ In: *Nat Genet* 32.2 (Okt. 2002), S. 245–253. DOI: 10.1038/ng890. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/ng890> (siehe S. 27).
- [168] Michihiro Matsumoto und Domenico Accili. „All roads lead to FoxO.“ In: *Cell Metab* 1.4 (Apr. 2005), S. 215–216. DOI: 10.1016/j.cmet.2005.03.008. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2005.03.008> (siehe S. 27).
- [169] D. J. Withers u. a. „Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice.“ In: *Nature* 391.6670 (Feb. 1998), S. 900–904. DOI: 10.1038/36116. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/36116> (siehe S. 27).
- [170] M. Frödin u. a. „Glucose, other secretagogues, and nerve growth factor stimulate mitogen-activated protein kinase in the insulin-secreting beta-cell line, INS-1.“ In: *J Biol Chem* 270.14 (Apr. 1995), S. 7882–7889 (siehe S. 27).
- [171] M. Y. Donath u. a. „Hyperglycemia-induced beta-cell apoptosis in pancreatic islets of *Psammomys obesus* during development of diabetes.“ In: *Diabetes* 48.4 (Apr. 1999), S. 738–744 (siehe S. 27).
- [172] B.D. Manning und L.C. Cantley. „AKT/PKB signaling: navigating downstream“. In: *Cell* 129.7 (2007), S. 1261–1274 (siehe S. 27, 77).
- [173] D. Etro u. a. „AKT1 (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1)“. In: (2010) (siehe S. 28).
- [174] P. J. Coffey und J. R. Woodgett. „Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families.“ In: *Eur J Biochem* 201.2 (Okt. 1991), S. 475–481 (siehe S. 28).
- [175] S. P. Staal, J. W. Hartley und W. P. Rowe. „Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma.“ In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 74.7 (Juli 1977), S. 3065–3067 (siehe S. 28).

- [176] S. P. Staal. „Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma.“ In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 84.14 (Juli 1987), S. 5034–5037 (siehe S. 28).
- [177] Zhong-Zhou Yang u. a. „Protein kinase B alpha/Akt1 regulates placental development and fetal growth.“ In: *J Biol Chem* 278.34 (Aug. 2003), S. 32124–32131. DOI: 10.1074/jbc.M302847200. URL: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M302847200> (siehe S. 28).
- [178] Marjorie J. Lindhurst u. a. „A mosaic activating mutation in AKT1 associated with the Proteus syndrome.“ In: *N Engl J Med* 365.7 (Aug. 2011), S. 611–619. DOI: 10.1056/NEJMoa1104017. URL: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1104017> (siehe S. 28).
- [179] M. R. Calera u. a. „Insulin increases the association of Akt-2 with Glut4-containing vesicles.“ In: *J Biol Chem* 273.13 (März 1998), S. 7201–7204 (siehe S. 28).
- [180] Kei Sakamoto u. a. „Role of Akt2 in contraction-stimulated cell signaling and glucose uptake in skeletal muscle.“ In: *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291.5 (Nov. 2006), E1031–E1037. DOI: 10.1152/ajpendo.00204.2006. URL: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00204.2006> (siehe S. 28).
- [181] Robert S. Garofalo u. a. „Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta.“ In: *J Clin Invest* 112.2 (Juli 2003), S. 197–208. DOI: 10.1172/JCI16885. URL: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI16885> (siehe S. 28).
- [182] H. Cho u. a. „Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta).“ In: *Science* 292.5522 (Juni 2001), S. 1728–1731. DOI: 10.1126/science.292.5522.1728. URL: <http://dx.doi.org/10.1126/science.292.5522.1728> (siehe S. 28, 31).
- [183] Rachael M. Easton u. a. „Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size.“ In: *Mol Cell Biol* 25.5 (März 2005), S. 1869–1878. DOI: 10.1128/MCB.25.5.1869-1878.2005. URL: <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.25.5.1869-1878.2005> (siehe S. 28).
- [184] T. F. Franke u. a. „The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase.“ In: *Cell* 81.5 (Juni 1995), S. 727–736 (siehe S. 29).
- [185] D. Stokoe u. a. „Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B.“ In: *Science* 277.5325 (Juli 1997), S. 567–570 (siehe S. 29).
- [186] T. F. Franke u. a. „Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate.“ In: *Science* 275.5300 (Jan. 1997), S. 665–668 (siehe S. 29).
- [187] S. R. James u. a. „Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate without subsequent activation.“ In: *Biochem J* 315 (Pt 3) (Mai 1996), S. 709–713 (siehe S. 29).
- [188] X. Zhang und T. A. Vik. „Growth factor stimulation of hematopoietic cells leads to membrane translocation of AKT1 protein kinase.“ In: *Leuk Res* 21.9 (Sep. 1997), S. 849–856 (siehe S. 29).
- [189] Christine C. Thomas u. a. „High-resolution structure of the pleckstrin homology domain of protein kinase b/akt bound to phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate.“ In: *Curr Biol* 12.14 (Juli 2002), S. 1256–1262 (siehe S. 29).
- [190] Christine C. Milburn u. a. „Binding of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate to the pleckstrin homology domain of protein kinase B induces a conformational change.“ In: *Biochem J* 375.Pt 3 (Nov. 2003), S. 531–538. DOI: 10.1042/BJ20031229. URL: <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20031229> (siehe S. 29).
- [191] Jing Yang u. a. „Molecular mechanism for the regulation of protein kinase B/Akt by hydrophobic motif phosphorylation.“ In: *Mol Cell* 9.6 (Juni 2002), S. 1227–1240 (siehe S. 29).
- [192] D. R. Alessi u. a. „Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1.“ In: *EMBO J* 15.23 (Dez. 1996), S. 6541–6551 (siehe S. 29).

- [193] C. A. Meier. „Novel pharmacological approaches to the prevention and treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus.“ In: *Eur J Endocrinol* 137.3 (Sep. 1997), S. 224–225 (siehe S. 29).
- [194] S. Ramaswamy u. a. „Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway.“ In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96.5 (März 1999), S. 2110–2115 (siehe S. 29).
- [195] Eugene S. Kandel u. a. „Activation of Akt/protein kinase B overcomes a G(2)/m cell cycle checkpoint induced by DNA damage.“ In: *Mol Cell Biol* 22.22 (Nov. 2002), S. 7831–7841 (siehe S. 29).
- [196] T. Maehama und J. E. Dixon. „PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase.“ In: *Trends Cell Biol* 9.4 (Apr. 1999), S. 125–128 (siehe S. 29, 123).
- [197] J. E. Damen u. a. „The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetrakisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate 5-phosphatase.“ In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 93.4 (Feb. 1996), S. 1689–1693 (siehe S. 29).
- [198] Armelle A. Troussard u. a. „Conditional knock-out of integrin-linked kinase demonstrates an essential role in protein kinase B/Akt activation.“ In: *J Biol Chem* 278.25 (Juni 2003), S. 22374–22378. DOI: 10.1074/jbc.M303083200. URL: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M303083200> (siehe S. 29).
- [199] Yuko Kawakami u. a. „Protein kinase C betaII regulates Akt phosphorylation on Ser-473 in a cell type- and stimulus-specific fashion.“ In: *J Biol Chem* 279.46 (Nov. 2004), S. 47720–47725. DOI: 10.1074/jbc.M408797200. URL: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M408797200> (siehe S. 29).
- [200] John Brognard u. a. „PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms.“ In: *Mol Cell* 25.6 (März 2007), S. 917–931. DOI: 10.1016/j.molcel.2007.02.017. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2007.02.017> (siehe S. 29).
- [201] R. Chen u. a. „Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation.“ In: *J Biol Chem* 276.34 (Aug. 2001), S. 31858–31862. DOI: 10.1074/jbc.C100271200. URL: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.C100271200> (siehe S. 29).
- [202] Gerald Künstle u. a. „Identification of Akt association and oligomerization domains of the Akt kinase coactivator TCL1.“ In: *Mol Cell Biol* 22.5 (März 2002), S. 1513–1525 (siehe S. 30).
- [203] N. Filippa u. a. „Mechanism of protein kinase B activation by cyclic AMP-dependent protein kinase.“ In: *Mol Cell Biol* 19.7 (Juli 1999), S. 4989–5000 (siehe S. 30).
- [204] Jorid T. Stuenkel u. a. „Beta-adrenoceptor stimulation potentiates insulin-stimulated PKB phosphorylation in rat cardiomyocytes via cAMP and PKA.“ In: *Br J Pharmacol* 160.1 (Mai 2010), S. 116–129. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.00677.x. URL: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00677.x> (siehe S. 30).
- [205] H. Konishi u. a. „Activation of protein kinase B (Akt/RAC-protein kinase) by cellular stress and its association with heat shock protein Hsp27.“ In: *FEBS Lett* 410.2-3 (Juni 1997), S. 493–498 (siehe S. 30).
- [206] S. Sato, N. Fujita und T. Tsuruo. „Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90.“ In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 97.20 (Sep. 2000), S. 10832–10837. DOI: 10.1073/pnas.170276797. URL: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.170276797> (siehe S. 30).
- [207] H. Konishi u. a. „Activation of RAC-protein kinase by heat shock and hyperosmolarity stress through a pathway independent of phosphatidylinositol 3-kinase.“ In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 93.15 (Juli 1996), S. 7639–7643 (siehe S. 30).
- [208] S. R. Datta u. a. „Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery.“ In: *Cell* 91.2 (Okt. 1997), S. 231–241 (siehe S. 30, 81).

- [209] J. Downward. „How BAD phosphorylation is good for survival.“ In: *Nat Cell Biol* 1.2 (Juni 1999), E33–E35. DOI: 10.1038/10026. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/10026> (siehe S. 30).
- [210] N. N. Ahmed u. a. „Transduction of interleukin-2 antiapoptotic and proliferative signals via Akt protein kinase.“ In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94.8 (Apr. 1997), S. 3627–3632 (siehe S. 30).
- [211] Mrudula Donepudi und Markus G. Grütter. „Structure and zymogen activation of caspases.“ In: *Biophys Chem* 101-102 (Dez. 2002), S. 145–153 (siehe S. 30).
- [212] Jiyong Liang und Joyce M. Slingerland. „Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression.“ In: *Cell Cycle* 2.4 (2003), S. 339–345 (siehe S. 30, 31).
- [213] Arnaud Autret u. a. „Early phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway activation limits poliovirus-induced JNK-mediated cell death.“ In: *J Virol* 82.7 (Apr. 2008), S. 3796–3802. DOI: 10.1128/JVI.02020-07. URL: <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02020-07> (siehe S. 30).
- [214] Lawrence P. Kane u. a. „Akt-dependent phosphorylation specifically regulates Cot induction of NF-kappa B-dependent transcription.“ In: *Mol Cell Biol* 22.16 (Aug. 2002), S. 5962–5974 (siehe S. 30).
- [215] K. Du und M. Montminy. „CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB.“ In: *J Biol Chem* 273.49 (Dez. 1998), S. 32377–32379 (siehe S. 30).
- [216] Yuanxin Hu u. a. „Akt phosphorylates acinus and inhibits its proteolytic cleavage, preventing chromatin condensation.“ In: *EMBO J* 24.20 (Okt. 2005), S. 3543–3554. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600823. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7600823> (siehe S. 30).
- [217] Shailly Varma und Ramji L. Khandelwal. „Effects of rapamycin on cell proliferation and phosphorylation of mTOR and p70(S6K) in HepG2 and HepG2 cells overexpressing constitutively active Akt/PKB.“ In: *Biochim Biophys Acta* 1770.1 (Jan. 2007), S. 71–78. DOI: 10.1016/j.bbagen.2006.07.016. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.07.016> (siehe S. 31).
- [218] L. D. Mayo und D. B. Donner. „A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus.“ In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 98.20 (Sep. 2001), S. 11598–11603. DOI: 10.1073/pnas.181181198. URL: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.181181198> (siehe S. 31).
- [219] Xiaoling Tang u. a. „Akt phosphorylation regulates the tumour-suppressor merlin through ubiquitination and degradation.“ In: *Nat Cell Biol* 9.10 (Okt. 2007), S. 1199–1207. DOI: 10.1038/ncb1641. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1641> (siehe S. 31).
- [220] L. Rössig u. a. „Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells.“ In: *Mol Cell Biol* 21.16 (Aug. 2001), S. 5644–5657. DOI: 10.1128/MCB.21.16.5644-5657.2001. URL: <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.21.16.5644-5657.2001> (siehe S. 31).
- [221] J. A. Diehl u. a. „Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization.“ In: *Genes Dev* 12.22 (Nov. 1998), S. 3499–3511 (siehe S. 31).
- [222] Masashi Okada, Sang-Wuk Jang und Keqiang Ye. „Akt phosphorylation and nuclear phosphoinositide association mediate mRNA export and cell proliferation activities by ALY.“ In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 105.25 (Juni 2008), S. 8649–8654. DOI: 10.1073/pnas.0802533105. URL: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0802533105> (siehe S. 31).
- [223] S. S. Kang u. a. „Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit.“ In: *J Biol Chem* 274.19 (Mai 1999), S. 13085–13090 (siehe S. 31).
- [224] Eoin Fahy u. a. „Lipid classification, structures and tools.“ In: *Biochim Biophys Acta* 1811.11 (Nov. 2011), S. 637–647. DOI: 10.1016/j.bbalip.2011.06.009. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.06.009> (siehe S. 32).

- [225] S. Lahiri und A. H. Futerman. „The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids.“ In: *Cell Mol Life Sci* 64.17 (Sep. 2007), S. 2270–2284. DOI: 10.1007/s00018-007-7076-0. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-007-7076-0> (siehe S. 32).
- [226] Juan Rivera, Richard L. Proia und Ana Olivera. „The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity.“ In: *Nat Rev Immunol* 8.10 (Okt. 2008), S. 753–763. DOI: 10.1038/nri2400. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2400> (siehe S. 32).
- [227] K. Kawahara u. a. „Chemical structure of glycosphingolipids isolated from *Sphingomonas paucimobilis*.“ In: *FEBS Lett* 292.1-2 (Nov. 1991), S. 107–110 (siehe S. 32).
- [228] JiYoung Mun u. a. „Structural confirmation of the dihydrosphinganine and fatty acid constituents of the dental pathogen *Porphyromonas gingivalis*.“ In: *Org Biomol Chem* 5.23 (Dez. 2007), S. 3826–3833. DOI: 10.1039/b712707c. URL: <http://dx.doi.org/10.1039/b712707c> (siehe S. 32).
- [229] Philipp Ternes u. a. „Two pathways of sphingolipid biosynthesis are separated in the yeast *Pichia pastoris*.“ In: *J Biol Chem* 286.13 (Apr. 2011), S. 11401–11414. DOI: 10.1074/jbc.M110.193094. URL: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.193094> (siehe S. 32).
- [230] Jerzy-Roch Nofer u. a. „HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3.“ In: *J Clin Invest* 113.4 (Feb. 2004), S. 569–581. DOI: 10.1172/JCI18004. URL: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI18004> (siehe S. 32, 121).
- [231] A. Olivera und S. Spiegel. „Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens.“ In: *Nature* 365.6446 (Okt. 1993), S. 557–560. DOI: 10.1038/365557a0. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/365557a0> (siehe S. 32).
- [232] O. Cu villier u. a. „Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate.“ In: *Nature* 381.6585 (Juni 1996), S. 800–803. DOI: 10.1038/381800a0. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/381800a0> (siehe S. 32).
- [233] Maria Laura Allende und Richard L. Proia. „Sphingosine-1-phosphate receptors and the development of the vascular system.“ In: *Biochim Biophys Acta* 1582.1-3 (Mai 2002), S. 222–227 (siehe S. 32).
- [234] Julie D. Saba und Timothy Hla. „Point-counterpoint of sphingosine 1-phosphate metabolism.“ In: *Circ Res* 94.6 (Apr. 2004), S. 724–734. DOI: 10.1161/01.RES.0000122383.60368.24. URL: <http://dx.doi.org/10.1161/01.RES.0000122383.60368.24> (siehe S. 32).
- [235] Jun Kunisawa und Hiroshi Kiyono. „Immunological function of sphingosine 1-phosphate in the intestine.“ In: *Nutrients* 4.3 (März 2012), S. 154–166. DOI: 10.3390/nu4030154. URL: <http://dx.doi.org/10.3390/nu4030154> (siehe S. 32).
- [236] Alfred H Merrill Jr. „Sphingolipid and glycosphingolipid metabolic pathways in the era of sphingolipidomics.“ In: *Chem Rev* 111.10 (Okt. 2011), S. 6387–6422. DOI: 10.1021/cr2002917. URL: <http://dx.doi.org/10.1021/cr2002917> (siehe S. 33).
- [237] Rajita Pappu u. a. „Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate.“ In: *Science* 316.5822 (Apr. 2007), S. 295–298. DOI: 10.1126/science.1139221. URL: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1139221> (siehe S. 33).
- [238] Krishnan Venkataraman u. a. „Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate.“ In: *Circ Res* 102.6 (März 2008), S. 669–676. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.107.165845. URL: <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.165845> (siehe S. 33).
- [239] Petra Hänel, Paul Andréani und Markus H. Gräler. „Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood.“ eng. In: *FASEB J* 21.4 (Apr. 2007), S. 1202–1209. DOI: 10.1096/fj.06-7433com. URL: <http://dx.doi.org/10.1096/fj.06-7433com> (siehe S. 33).

- [240] Kiyoharu Ito u. a. „Lack of sphingosine 1-phosphate-degrading enzymes in erythrocytes.“ eng. In: *Biochem Biophys Res Commun* 357.1 (Mai 2007), S. 212–217. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.03.123. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.03.123> (siehe S. 33).
- [241] Takao Kimura u. a. „High-density lipoprotein stimulates endothelial cell migration and survival through sphingosine 1-phosphate and its receptors.“ In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23.7 (Juli 2003), S. 1283–1288. DOI: 10.1161/01.ATV.0000079011.67194.5A. URL: <http://dx.doi.org/10.1161/01.ATV.0000079011.67194.5A> (siehe S. 33).
- [242] Yutaka Yatomi. „Plasma sphingosine 1-phosphate metabolism and analysis.“ In: *Biochim Biophys Acta* 1780.3 (März 2008), S. 606–611. DOI: 10.1016/j.bbagen.2007.10.006. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.10.006> (siehe S. 33).
- [243] Barbara Nieuwenhuis u. a. „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.“ In: *J Mol Med (Berl)* 87.6 (Juni 2009), S. 645–657. DOI: 10.1007/s00109-009-0468-x. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-009-0468-x> (siehe S. 33, 37, 75, 109).
- [244] Nobuyoshi Kobayashi u. a. „Sphingosine 1-phosphate is released from the cytosol of rat platelets in a carrier-mediated manner.“ In: *J Lipid Res* 47.3 (März 2006), S. 614–621. DOI: 10.1194/jlr.M500468-JLR200. URL: <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M500468-JLR200> (siehe S. 33).
- [245] Yang Yang und Stefan Uhlig. „The role of sphingolipids in respiratory disease.“ In: *Thorax* 66.5 (Okt. 2011), S. 325–344. DOI: 10.1177/1753465811406772. URL: <http://dx.doi.org/10.1177/1753465811406772> (siehe S. 33).
- [246] R. Kolesnick und Y. A. Hannun. „Ceramide and apoptosis.“ In: *Trends Biochem Sci* 24.6 (Juni 1999), 224–5, author reply 227 (siehe S. 33).
- [247] M. Manggau u. a. „1Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 protects human keratinocytes from apoptosis by the formation of sphingosine-1-phosphate.“ In: *J Invest Dermatol* 117.5 (Nov. 2001), S. 1241–1249. DOI: 10.1046/j.0022-202x.2001.01496.x. URL: <http://dx.doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01496.x> (siehe S. 33, 119).
- [248] Melanie Schüppel u. a. „Sphingosine 1-phosphate restrains insulin-mediated keratinocyte proliferation via inhibition of Akt through the S1P2 receptor subtype.“ In: *J Invest Dermatol* 128.7 (Juli 2008), S. 1747–1756. DOI: 10.1038/sj.jid.5701259. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jid.5701259> (siehe S. 33, 77, 107, 108, 111, 119, 121, 122).
- [249] Kenneth C. Loh, Dianna Baldwin und Julie D. Saba. „Sphingolipid signaling and hematopoietic malignancies: to the rheostat and beyond.“ In: *Anticancer Agents Med Chem* 11.9 (Nov. 2011), S. 782–793 (siehe S. 33).
- [250] AH Merrill Jr u. a. „Sphingolipids—the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology.“ In: *Toxicol Appl Pharmacol* 142.1 (Jan. 1997), S. 208–225. DOI: 10.1006/taap.1996.8029. URL: <http://dx.doi.org/10.1006/taap.1996.8029> (siehe S. 34).
- [251] T. Levade und J. P. Jaffrézou. „Signalling sphingomyelinases: which, where, how and why?“ In: *Biochim Biophys Acta* 1438.1 (Apr. 1999), S. 1–17 (siehe S. 34).
- [252] S. C. Linn u. a. „Regulation of de novo sphingolipid biosynthesis and the toxic consequences of its disruption.“ In: *Biochem Soc Trans* 29.Pt 6 (Nov. 2001), S. 831–835 (siehe S. 34).
- [253] Alfred H Merrill Jr. „De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway.“ In: *J Biol Chem* 277.29 (Juli 2002), S. 25843–25846. DOI: 10.1074/jbc.R200009200. URL: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R200009200> (siehe S. 34).
- [254] Kentaro Hanada. „Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism.“ In: *Biochim Biophys Acta* 1632.1-3 (Juni 2003), S. 16–30 (siehe S. 34).

- [255] Gongshe Han u. a. „The topology of the Lcb1p subunit of yeast serine palmitoyltransferase.“ In: *J Biol Chem* 279.51 (Dez. 2004), S. 53707–53716. DOI: 10.1074/jbc.M410014200. URL: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M410014200> (siehe S. 34).
- [256] Marine C C. Raman u. a. „The external aldimine form of serine palmitoyltransferase: structural, kinetic, and spectroscopic analysis of the wild-type enzyme and HSAN1 mutant mimics.“ In: *J Biol Chem* 284.25 (Juni 2009), S. 17328–17339. DOI: 10.1074/jbc.M109.008680. URL: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.008680> (siehe S. 34).
- [257] K. Bejaoui u. a. „SPTLC1 is mutated in hereditary sensory neuropathy, type 1.“ In: *Nat Genet* 27.3 (März 2001), S. 261–262. DOI: 10.1038/85817. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/85817> (siehe S. 34).
- [258] G. van Meer und J. C. Holthuis. „Sphingolipid transport in eukaryotic cells.“ In: *Biochim Biophys Acta* 1486.1 (Juni 2000), S. 145–170 (siehe S. 34).
- [259] Motohiro Tani, Makoto Ito und Yasuyuki Igarashi. „Ceramide/sphingosine/sphingosine 1-phosphate metabolism on the cell surface and in the extracellular space.“ In: *Cell Signal* 19.2 (Feb. 2007), S. 229–237. DOI: 10.1016/j.cellsig.2006.07.001. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.07.001> (siehe S. 34).
- [260] Yusuf A. Hannun und Lina M. Obeid. „Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids.“ In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 9.2 (Feb. 2008), S. 139–150. DOI: 10.1038/nrm2329. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2329> (siehe S. 34).
- [261] R. Alemany u. a. „Depolarisation induces rapid and transient formation of intracellular sphingosine-1-phosphate.“ In: *FEBS Lett* 509.2 (Dez. 2001), S. 239–244 (siehe S. 34).
- [262] Sarah Spiegel, Denis English und Sheldon Milstien. „Sphingosine 1-phosphate signaling: providing cells with a sense of direction.“ In: *Trends Cell Biol* 12.5 (Mai 2002), S. 236–242 (siehe S. 36).
- [263] Kiyomi Mizugishi u. a. „Maternal disturbance in activated sphingolipid metabolism causes pregnancy loss in mice.“ In: *J Clin Invest* 117.10 (Okt. 2007), S. 2993–3006. DOI: 10.1172/JCI30674. URL: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI30674> (siehe S. 36).
- [264] Kiyomi Mizugishi u. a. „Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development.“ In: *Mol Cell Biol* 25.24 (Dez. 2005), S. 11113–11121. DOI: 10.1128/MCB.25.24.11113-11121.2005. URL: <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.25.24.11113-11121.2005> (siehe S. 36).
- [265] Wen-Qi Lai, Faith Li-Ann Chia und Bernard P. Leung. „Sphingosine kinase and sphingosine-1-phosphate receptors: novel therapeutic targets of rheumatoid arthritis?“ In: *Future Med Chem* 4.6 (Apr. 2012), S. 727–733. DOI: 10.4155/fmc.12.28. URL: <http://dx.doi.org/10.4155/fmc.12.28> (siehe S. 36).
- [266] Mathew Vadas u. a. „The role of sphingosine kinase 1 in cancer: oncogene or non-oncogene addiction?“ In: *Biochim Biophys Acta* 1781.9 (Sep. 2008), S. 442–447. DOI: 10.1016/j.bbailip.2008.06.007. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbailip.2008.06.007> (siehe S. 36).
- [267] Nigel J. Pyne und Susan Pyne. „Sphingosine 1-phosphate and cancer.“ In: *Nat Rev Cancer* 10.7 (Juli 2010), S. 489–503. DOI: 10.1038/nrc2875. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2875> (siehe S. 36).
- [268] Carol Watson u. a. „High expression of sphingosine 1-phosphate receptors, S1P1 and S1P3, sphingosine kinase 1, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 is associated with development of tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive breast cancer patients.“ In: *Am J Pathol* 177.5 (Nov. 2010), S. 2205–2215. DOI: 10.2353/ajpath.2010.100220. URL: <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2010.100220> (siehe S. 36).
- [269] Nigel J. Pyne u. a. „Sphingosine 1-phosphate signalling in cancer.“ In: *Biochem Soc Trans* 40.1 (Feb. 2012), S. 94–100. DOI: 10.1042/BST20110602. URL: <http://dx.doi.org/10.1042/BST20110602> (siehe S. 36).

- [270] Susan R. Schwab u. a. „Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients.“ In: *Science* 309.5741 (Sep. 2005), S. 1735–1739. DOI: 10.1126/science.1113640. URL: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1113640> (siehe S. 36).
- [271] Sridhar Ramaswamy u. a. „A molecular signature of metastasis in primary solid tumors.“ In: *Nat Genet* 33.1 (Jan. 2003), S. 49–54. DOI: 10.1038/ng1060. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/ng1060> (siehe S. 36).
- [272] Kathleen Hibbs u. a. „Differential gene expression in ovarian carcinoma: identification of potential biomarkers.“ In: *Am J Pathol* 165.2 (Aug. 2004), S. 397–414. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63306-8. URL: [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63306-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63306-8) (siehe S. 36).
- [273] Babak Oskouian u. a. „Sphingosine-1-phosphate lyase potentiates apoptosis via p53- and p38-dependent pathways and is down-regulated in colon cancer.“ In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 103.46 (Nov. 2006), S. 17384–17389. DOI: 10.1073/pnas.0600050103. URL: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0600050103> (siehe S. 36).
- [274] Katja Ihlefeld u. a. „Evidence for a link between histone deacetylation and Ca²⁺ homeostasis in sphingosine-1-phosphate lyase-deficient fibroblasts.“ In: *Biochem J* 447.3 (Nov. 2012), S. 457–464. DOI: 10.1042/BJ20120811. URL: <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20120811> (siehe S. 36).
- [275] Sergio E. Alvarez u. a. „Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2.“ In: *Nature* 465.7301 (Juni 2010), S. 1084–1088. DOI: 10.1038/nature09128. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nature09128> (siehe S. 36).
- [276] Graham M. Strub u. a. „Sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase 2 in mitochondria interacts with prohibitin 2 to regulate complex IV assembly and respiration.“ In: *FASEB J* 25.2 (Feb. 2011), S. 600–612. DOI: 10.1096/fj.10-167502. URL: <http://dx.doi.org/10.1096/fj.10-167502> (siehe S. 36).
- [277] Nitai C. Hait u. a. „Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate.“ In: *Science* 325.5945 (Sep. 2009), S. 1254–1257. DOI: 10.1126/science.1176709. URL: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1176709> (siehe S. 36).
- [278] S. Spiegel, S. Milstien und S. Grant. „Endogenous modulators and pharmacological inhibitors of histone deacetylases in cancer therapy.“ In: *Oncogene* 31.5 (Feb. 2012), S. 537–551. DOI: 10.1038/onc.2011.267. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2011.267> (siehe S. 36).
- [279] S. Spiegel und S. Milstien. „Exogenous and intracellularly generated sphingosine 1-phosphate can regulate cellular processes by divergent pathways.“ In: *Biochem Soc Trans* 31.Pt 6 (Dez. 2003), S. 1216–1219. DOI: 10.1042/. URL: <http://dx.doi.org/10.1042/> (siehe S. 36).
- [280] S. Spiegel und S. Milstien. „Sphingosine-1-phosphate: signaling inside and out.“ In: *FEBS Lett* 476.1-2 (Juni 2000), S. 55–57 (siehe S. 36).
- [281] Denise G. Hemmings. „Signal transduction underlying the vascular effects of sphingosine 1-phosphate and sphingosylphosphorylcholine.“ In: *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 373.1 (Apr. 2006), S. 18–29. DOI: 10.1007/s00210-006-0046-5. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-006-0046-5> (siehe S. 37).
- [282] T. Hla und T. Maciag. „An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors.“ In: *J Biol Chem* 265.16 (Juni 1990), S. 9308–9313 (siehe S. 37).
- [283] S. An, E. J. Goetzl und H. Lee. „Signaling mechanisms and molecular characteristics of G protein-coupled receptors for lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate.“ In: *J Cell Biochem Suppl* 30-31 (1998), S. 147–157 (siehe S. 37).
- [284] Jerold Chun u. a. „International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature.“ In: *Pharmacol Rev* 54.2 (Juni 2002), S. 265–269 (siehe S. 37).

- [285] H. Okazaki u. a. „Molecular cloning of a novel putative G protein-coupled receptor expressed in the cardiovascular system.“ In: *Biochem Biophys Res Commun* 190.3 (Feb. 1993), S. 1104–1109. DOI: 10.1006/bbrc.1993.1163. URL: <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1993.1163> (siehe S. 37).
- [286] F. Yamaguchi u. a. „Molecular cloning of the novel human G protein-coupled receptor (GPCR) gene mapped on chromosome 9.“ In: *Biochem Biophys Res Commun* 227.2 (Okt. 1996), S. 608–614. DOI: 10.1006/bbrc.1996.1553. URL: <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1996.1553> (siehe S. 37).
- [287] M. H. Gräler, G. Bernhardt und M. Lipp. „EDG6, a novel G-protein-coupled receptor related to receptors for bioactive lysophospholipids, is specifically expressed in lymphoid tissue.“ In: *Genomics* 53.2 (Okt. 1998), S. 164–169. DOI: 10.1006/geno.1998.5491. URL: <http://dx.doi.org/10.1006/geno.1998.5491> (siehe S. 37).
- [288] D. S. Im, A. R. Ungar und K. R. Lynch. „Characterization of a zebrafish (*Danio rerio*) sphingosine 1-phosphate receptor expressed in the embryonic brain.“ In: *Biochem Biophys Res Commun* 279.1 (Dez. 2000), S. 139–143. DOI: 10.1006/bbrc.2000.3933. URL: <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2000.3933> (siehe S. 37).
- [289] Brigitte Anliker und Jerold Chun. „Cell surface receptors in lysophospholipid signaling.“ In: *Semin Cell Dev Biol* 15.5 (Okt. 2004), S. 457–465. DOI: 10.1016/j.semcd.2004.05.005. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcd.2004.05.005> (siehe S. 37).
- [290] Hyun Suk Lim u. a. „Syntheses of sphingosine-1-phosphate stereoisomers and analogues and their interaction with EDG receptors.“ In: *Bioorg Med Chem Lett* 13.2 (Jan. 2003), S. 237–240 (siehe S. 37).
- [291] Kirsten Uhlenbrock, Hans Gassenhuber und Evi Kostenis. „Sphingosine 1-phosphate is a ligand of the human gpr3, gpr6 and gpr12 family of constitutively active G protein-coupled receptors.“ In: *Cell Signal* 14.11 (Nov. 2002), S. 941–953 (siehe S. 37).
- [292] Jen-Fu Lee u. a. „Balance of S1P1 and S1P2 signaling regulates peripheral microvascular permeability in rat cremaster muscle vasculature.“ eng. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296.1 (Jan. 2009), H33–H42. DOI: 10.1152/ajpheart.00097.2008. URL: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00097.2008> (siehe S. 38).
- [293] Edward J. Goetzl und Markus H. Gräler. „Sphingosine 1-phosphate and its type 1 G protein-coupled receptor: trophic support and functional regulation of T lymphocytes.“ In: *J Leukoc Biol* 76.1 (Juli 2004), S. 30–35. DOI: 10.1189/jlb.1103567. URL: <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.1103567> (siehe S. 38).
- [294] Jesse A. Green und Jason G. Cyster. „S1PR2 links germinal center confinement and growth regulation.“ In: *Immunol Rev* 247.1 (Mai 2012), S. 36–51. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2012.01114.x. URL: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01114.x> (siehe S. 38, 106, 111).
- [295] Yasuhiro Maeda u. a. „Migration of CD4 T cells and dendritic cells toward sphingosine 1-phosphate (S1P) is mediated by different receptor subtypes: S1P regulates the functions of murine mature dendritic cells via S1P receptor type 3.“ In: *J Immunol* 178.6 (März 2007), S. 3437–3446 (siehe S. 38).
- [296] J. R. Van Brocklyn u. a. „Sphingosine-1-phosphate is a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-6.“ In: *Blood* 95.8 (Apr. 2000), S. 2624–2629 (siehe S. 38).
- [297] Y. Yamazaki u. a. „Edg-6 as a putative sphingosine 1-phosphate receptor coupling to Ca(2+) signaling pathway.“ In: *Biochem Biophys Res Commun* 268.2 (Feb. 2000), S. 583–589. DOI: 10.1006/bbrc.2000.2162. URL: <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2000.2162> (siehe S. 38).

- [298] Mari Rios Candelore u. a. „Phytosphingosine 1-phosphate: a high affinity ligand for the S1P(4)/Edg-6 receptor.“ In: *Biochem Biophys Res Commun* 297.3 (Sep. 2002), S. 600–606 (siehe S. 38).
- [299] Dagmar Meyer zu Heringdorf und Karl H. Jakobs. „Lysophospholipid receptors: signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism.“ In: *Biochim Biophys Acta* 1768.4 (Apr. 2007), S. 923–940. DOI: 10.1016/j.bbamem.2006.09.026. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.09.026> (siehe S. 38).
- [300] R. L. Malek u. a. „Nrg-1 belongs to the endothelial differentiation gene family of G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptors.“ In: *J Biol Chem* 276.8 (Feb. 2001), S. 5692–5699. DOI: 10.1074/jbc.M003964200. URL: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M003964200> (siehe S. 38).
- [301] Francesca Tonelli u. a. „FTY720 and (S)-FTY720 vinylphosphonate inhibit sphingosine kinase 1 and promote its proteasomal degradation in human pulmonary artery smooth muscle, breast cancer and androgen-independent prostate cancer cells.“ In: *Cell Signal* 22.10 (Okt. 2010), S. 1536–1542. DOI: 10.1016/j.cellsig.2010.05.022. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.05.022> (siehe S. 39).
- [302] M Germana Sanna u. a. „Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor subtypes S1P1 and S1P3, respectively, regulate lymphocyte recirculation and heart rate.“ eng. In: *J Biol Chem* 279.14 (Apr. 2004), S. 13839–13848. DOI: 10.1074/jbc.M311743200. URL: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M311743200> (siehe S. 39).
- [303] Brandon A. Brown, Pranish P. Kantesaria und Lisa M. McDevitt. „Fingolimod: a novel immunosuppressant for multiple sclerosis.“ In: *Ann Pharmacother* 41.10 (Okt. 2007), S. 1660–1668. DOI: 10.1345/aph.1G424. URL: <http://dx.doi.org/10.1345/aph.1G424> (siehe S. 39).
- [304] Andreas Billich u. a. „Phosphorylation of the immunomodulatory drug FTY720 by sphingosine kinases.“ In: *J Biol Chem* 278.48 (Nov. 2003), S. 47408–47415. DOI: 10.1074/jbc.M307687200. URL: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M307687200> (siehe S. 39).
- [305] Ulrich Kunzendorf, Ekkehard Ziegler und Dieter Kabelitz. „FTY720—the first compound of a new promising class of immunosuppressive drugs.“ In: *Nephrol Dial Transplant* 19.7 (Juli 2004), S. 1677–1681. DOI: 10.1093/ndt/gfh295. URL: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfh295> (siehe S. 39).
- [306] Volker Brinkmann u. a. „The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors.“ In: *J Biol Chem* 277.24 (Juni 2002), S. 21453–21457. DOI: 10.1074/jbc.C200176200. URL: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.C200176200> (siehe S. 39).
- [307] W. F. Marasas. „Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective.“ In: *Environ Health Perspect* 109 Suppl 2 (Mai 2001), S. 239–243 (siehe S. 39).
- [308] AH Merrill Jr u. a. „Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins.“ In: *Environ Health Perspect* 109 Suppl 2 (Mai 2001), S. 283–289 (siehe S. 39, 117).
- [309] Abby L. Parrill, Vineet M. Sardar und Hongbin Yuan. „Sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid receptors: agonist and antagonist binding and progress toward development of receptor-specific ligands.“ In: *Semin Cell Dev Biol* 15.5 (Okt. 2004), S. 467–476. DOI: 10.1016/j.semcdb.2004.05.006. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2004.05.006> (siehe S. 40).
- [310] Salvatore Salomone und Christian Waeber. „Selectivity and specificity of sphingosine-1-phosphate receptor ligands: caveats and critical thinking in characterizing receptor-mediated effects.“ eng. In: *Front Pharmacol* 2 (2011), S. 9. DOI: 10.3389/fphar.2011.00009. URL: <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2011.00009> (siehe S. 40).

- [311] Y. Miyake u. a. „Serine palmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, ISP-1/myriocin.“ In: *Biochem Biophys Res Commun* 211.2 (Juni 1995), S. 396–403. DOI: 10.1006/bbrc.1995.1827. URL: <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1995.1827> (siehe S. 40).
- [312] Kevin J. French u. a. „Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase.“ eng. In: *Cancer Res* 63.18 (Sep. 2003), S. 5962–5969 (siehe S. 40).
- [313] Shuyu Ren u. a. „A novel mode of action of the putative sphingosine kinase inhibitor 2-(p-hydroxyanilino)-4-(p-chlorophenyl) thiazole (SKI II): induction of lysosomal sphingosine kinase 1 degradation.“ eng. In: *Cell Physiol Biochem* 26.1 (2010), S. 97–104. DOI: 10.1159/000315110. URL: <http://dx.doi.org/10.1159/000315110> (siehe S. 40).
- [314] Kevin J. French u. a. „Antitumor activity of sphingosine kinase inhibitors.“ eng. In: *J Pharmacol Exp Ther* 318.2 (Aug. 2006), S. 596–603. DOI: 10.1124/jpet.106.101345. URL: <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.106.101345> (siehe S. 40).
- [315] Michael D. Davis u. a. „Sphingosine 1-phosphate analogs as receptor antagonists.“ In: *J Biol Chem* 280.11 (März 2005), S. 9833–9841. DOI: 10.1074/jbc.M412356200. URL: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M412356200> (siehe S. 40).
- [316] Frank W Foss Jr u. a. „Synthesis, stability, and implications of phosphothioate agonists of sphingosine-1-phosphate receptors.“ In: *Bioorg Med Chem Lett* 15.20 (Okt. 2005), S. 4470–4474. DOI: 10.1016/j.bmc.2005.07.057. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2005.07.057> (siehe S. 40).
- [317] M. Jongsma u. a. „Different response patterns of several ligands at the sphingosine-1-phosphate receptor subtype 3 (S1P(3)).“ In: *Br J Pharmacol* 156.8 (Apr. 2009), S. 1305–1311. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00134.x. URL: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00134.x> (siehe S. 40).
- [318] JC Floyd Jr u. a. „Stimulation of insulin secretion by amino acids.“ In: *J Clin Invest* 45.9 (Sep. 1966), S. 1487–1502. DOI: 10.1172/JCI105456. URL: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI105456> (siehe S. 48).
- [319] Lorraine O’Driscoll u. a. „Phenotypic and global gene expression profile changes between low passage and high passage MIN-6 cells.“ eng. In: *J Endocrinol* 191.3 (Dez. 2006), S. 665–676. DOI: 10.1677/joe.1.06894. URL: <http://dx.doi.org/10.1677/joe.1.06894> (siehe S. 57).
- [320] M. M. Bradford. „A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.“ eng. In: *Anal Biochem* 72 (Mai 1976), S. 248–254 (siehe S. 59).
- [321] U. K. Laemmli. „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.“ eng. In: *Nature* 227.5259 (Aug. 1970), S. 680–685 (siehe S. 60).
- [322] B. Vogelstein und D. Gillespie. „Preparative and analytical purification of DNA from agarose.“ eng. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 76.2 (Feb. 1979), S. 615–619 (siehe S. 67).
- [323] Van Luu-The u. a. „Improved real-time RT-PCR method for high-throughput measurements using second derivative calculation and double correction.“ eng. In: *Biotechniques* 38.2 (Feb. 2005), S. 287–293 (siehe S. 69).
- [324] F. R. Schmidt. „About the nature of RNA interference.“ eng. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 67.4 (Juni 2005), S. 429–435. DOI: 10.1007/s00253-004-1882-1. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-004-1882-1> (siehe S. 69).
- [325] David L. Lewis und Jon A. Wolff. „Delivery of siRNA and siRNA expression constructs to adult mammals by hydrodynamic intravascular injection.“ eng. In: *Methods Enzymol* 392 (2005), S. 336–350. DOI: 10.1016/S0076-6879(04)92020-4. URL: [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(04\)92020-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(04)92020-4) (siehe S. 69).

- [326] Mayuko Yoda u. a. „ATP-dependent human RISC assembly pathways.“ eng. In: *Nat Struct Mol Biol* 17.1 (Jan. 2010), S. 17–23. DOI: 10.1038/nsmb.1733. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.1733> (siehe S. 69).
- [327] L. Ruwisch, M. Schäfer-Korting und B. Kleuser. „An improved high-performance liquid chromatographic method for the determination of sphingosine-1-phosphate in complex biological materials.“ eng. In: *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 363.3 (März 2001), S. 358–363 (siehe S. 71).
- [328] Y. Yatomi u. a. „Quantitative measurement of sphingosine 1-phosphate in biological samples by acylation with radioactive acetic anhydride.“ eng. In: *Anal Biochem* 230.2 (Sep. 1995), S. 315–320 (siehe S. 71).
- [329] Melanie Schüppel. „Bedeutung der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren in der Regulation der Apoptose und Proliferation humaner Keratinozyten“. Diss. Freie Universität Berlin, 2008 (siehe S. 75, 78, 97, 98, 100, 109, 110, 119, 120).
- [330] *BioGPS: S1P-Receptors in Mus Musculus*. URL: <http://biogps.org/#goto=genereport&id=13609,14739,13610,13611,94226> (siehe S. 75, 111).
- [331] Christopher J. Rhodes. „Type 2 diabetes—a matter of beta-cell life and death?“ eng. In: *Science* 307.5708 (Jan. 2005), S. 380–384. DOI: 10.1126/science.1104345. URL: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1104345> (siehe S. 77).
- [332] D. R. Alessi und C. P. Downes. „The role of PI 3-kinase in insulin action.“ In: *Biochim Biophys Acta* 1436.1-2 (Dez. 1998), S. 151–164 (siehe S. 77, 105).
- [333] Sabine Rutti u. a. „In vitro proliferation of adult human beta-cells.“ eng. In: *PLoS One* 7.4 (2012), e35801. DOI: 10.1371/journal.pone.0035801. URL: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0035801> (siehe S. 77).
- [334] N. Murata u. a. „Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions.“ eng. In: *Biochem J* 352 Pt 3 (Dez. 2000), S. 809–815 (siehe S. 77).
- [335] B. M. Marte und J. Downward. „PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond.“ eng. In: *Trends Biochem Sci* 22.9 (Sep. 1997), S. 355–358 (siehe S. 81).
- [336] Reinhart Kluge u. a. „Pathophysiology and genetics of obesity and diabetes in the New Zealand obese mouse: a model of the human metabolic syndrome.“ eng. In: *Methods Mol Biol* 933 (2012), S. 59–73. DOI: 10.1007/978-1-62703-068-7_5. URL: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-62703-068-7_5 (siehe S. 92).
- [337] Frank C. Victor, Alice B. Gottlieb und Alan Menter. „Changing paradigms in dermatology: tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) blockade in psoriasis and psoriatic arthritis.“ In: *Clin Dermatol* 21.5 (2003), S. 392–397 (siehe S. 97).
- [338] H. T. Chung u. a. „Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis.“ In: *Biochem Biophys Res Commun* 282.5 (Apr. 2001), S. 1075–1079. DOI: 10.1006/bbrc.2001.4670. URL: <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2001.4670> (siehe S. 98).
- [339] R. Weller. „Nitric oxide: a key mediator in cutaneous physiology.“ In: *Clin Exp Dermatol* 28.5 (Sep. 2003), S. 511–514 (siehe S. 98, 119, 122).
- [340] Lorna M. Dickson und Christopher J. Rhodes. „Pancreatic beta-cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes: a role for protein kinase B in the Akt?“ In: *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287.2 (Aug. 2004), E192–E198. DOI: 10.1152/ajpendo.00031.2004. URL: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00031.2004> (siehe S. 105).

- [341] Anke Assmann u. a. „Glucose effects on beta-cell growth and survival require activation of insulin receptors and insulin receptor substrate 2.“ In: *Mol Cell Biol* 29.11 (Juni 2009), S. 3219–3228. DOI: 10.1128/MCB.01489-08. URL: <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.01489-08> (siehe S. 105, 108).
- [342] Gang Song, Gaoliang Ouyang und Shideng Bao. „The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival.“ In: *J Cell Mol Med* 9.1 (2005), S. 59–71 (siehe S. 106, 109).
- [343] Yi-Chun Kuo u. a. „Regulation of phosphorylation of Thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival by the B55alpha regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt.“ In: *J Biol Chem* 283.4 (Jan. 2008), S. 1882–1892. DOI: 10.1074/jbc.M709585200. URL: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M709585200> (siehe S. 106).
- [344] Stella George u. a. „A family with severe insulin resistance and diabetes due to a mutation in AKT2.“ In: *Science* 304.5675 (Mai 2004), S. 1325–1328. DOI: 10.1126/science.1096706. URL: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1096706> (siehe S. 106).
- [345] Vidya Limaye u. a. „Sphingosine kinase-1 enhances endothelial cell survival through a PECAM-1-dependent activation of PI-3K/Akt and regulation of Bcl-2 family members.“ In: *Blood* 105.8 (Apr. 2005), S. 3169–3177. DOI: 10.1182/blood-2004-02-0452. URL: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2004-02-0452> (siehe S. 106).
- [346] Nathalie Auge u. a. „Oxidized LDL-induced smooth muscle cell proliferation involves the EGF receptor/PI-3 kinase/Akt and the sphingolipid signaling pathways.“ In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22.12 (Dez. 2002), S. 1990–1995 (siehe S. 106).
- [347] Malgorzata Knapp. „Cardioprotective role of sphingosine-1-phosphate.“ In: *J Physiol Pharmacol* 62.6 (Dez. 2011), S. 601–607 (siehe S. 106).
- [348] Tatsuo Nakahara u. a. „Sphingosine-1-phosphate inhibits H(2)O(2)-induced granulosa cell apoptosis via the PI3K/Akt signaling pathway.“ In: *Fertil Steril* 98.4 (Okt. 2012), 1001–1008.e1. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.06.008. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.06.008> (siehe S. 106).
- [349] Dong-Seok Kim u. a. „Sphingosine-1-phosphate inhibits human keratinocyte proliferation via Akt/protein kinase B inactivation.“ In: *Cell Signal* 16.1 (Jan. 2004), S. 89–95 (siehe S. 106).
- [350] Ambika T. Singh u. a. „Sphingosine-sphingosine-1-phosphate pathway regulates trophoblast differentiation and syncytialization.“ In: *Reprod Biomed Online* 24.2 (Feb. 2012), S. 224–234. DOI: 10.1016/j.rbmo.2011.10.012. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.10.012> (siehe S. 106).
- [351] Yoh Takuwa u. a. „Sphingosine-1-phosphate signaling in physiology and diseases.“ In: *Biofactors* 38.5 (Sep. 2012), S. 329–337. DOI: 10.1002/biof.1030. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/biof.1030> (siehe S. 106).
- [352] Dong-Jae Jun u. a. „Sphingosine-1-phosphate modulates both lipolysis and leptin production in differentiated rat white adipocytes.“ In: *Endocrinology* 147.12 (Dez. 2006), S. 5835–5844. DOI: 10.1210/en.2006-0579. URL: <http://dx.doi.org/10.1210/en.2006-0579> (siehe S. 107).
- [353] Laura Becciolini u. a. „Sphingosine 1-phosphate inhibits cell migration in C2C12 myoblasts.“ In: *Biochim Biophys Acta* 1761.1 (Jan. 2006), S. 43–51. DOI: 10.1016/j.bbalip.2006.01.006. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.01.006> (siehe S. 107).
- [354] I. C. Green und K. W. Taylor. „Effects of pregnancy in the rat on the size and insulin secretory response of the islets of Langerhans.“ In: *J Endocrinol* 54.2 (Aug. 1972), S. 317–325 (siehe S. 107).
- [355] F. A. Van Assche, L. Aerts und F. De Prins. „A morphological study of the endocrine pancreas in human pregnancy.“ In: *Br J Obstet Gynaecol* 85.11 (Nov. 1978), S. 818–820 (siehe S. 107).

- [356] J. M. Lucocq und J. A. Findlay. „Islet organ, blood glucose and glucose tolerance of lean and obese Mongolian gerbils. A quantitative study.“ In: *Cell Tissue Res* 220.3 (1981), S. 623–636 (siehe S. 107).
- [357] D. L. Coleman. „Diabetes-obesity syndromes in mice.“ In: *Diabetes* 31.Suppl 1 Pt 2 (1982), S. 1–6 (siehe S. 107).
- [358] H. Zulewski u. a. „Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes.“ In: *Diabetes* 50.3 (März 2001), S. 521–533 (siehe S. 107).
- [359] Rohit N. Kulkarni u. a. „PDX-1 haploinsufficiency limits the compensatory islet hyperplasia that occurs in response to insulin resistance.“ In: *J Clin Invest* 114.6 (Sep. 2004), S. 828–836. DOI: 10.1172/JCI21845. URL: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI21845> (siehe S. 107).
- [360] Yuval Dor u. a. „Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation.“ In: *Nature* 429.6987 (Mai 2004), S. 41–46. DOI: 10.1038/nature02520. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nature02520> (siehe S. 107).
- [361] M. A. Lawlor und D. R. Alessi. „PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses?“ eng. In: *J Cell Sci* 114.Pt 16 (Aug. 2001), S. 2903–2910 (siehe S. 107).
- [362] M. Blandino-Rosano u. a. „Enhanced beta cell proliferation in mice overexpressing a constitutively active form of Akt and one allele of p21Cip.“ In: *Diabetologia* 55.5 (Mai 2012), S. 1380–1389. DOI: 10.1007/s00125-012-2465-9. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-012-2465-9> (siehe S. 107).
- [363] Elizabeth Hughes und Carol Huang. „Participation of Akt, menin, and p21 in pregnancy-induced beta-cell proliferation.“ In: *Endocrinology* 152.3 (März 2011), S. 847–855. DOI: 10.1210/en.2010-1250. URL: <http://dx.doi.org/10.1210/en.2010-1250> (siehe S. 107).
- [364] E. Bernal-Mizrachi u. a. „Islet beta cell expression of constitutively active Akt1/PKB alpha induces striking hypertrophy, hyperplasia, and hyperinsulinemia.“ In: *J Clin Invest* 108.11 (Dez. 2001), S. 1631–1638. DOI: 10.1172/JCI13785. URL: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI13785> (siehe S. 107).
- [365] Jennifer L. Beith, Emilyn U. Alejandro und James D. Johnson. „Insulin stimulates primary beta-cell proliferation via Raf-1 kinase.“ In: *Endocrinology* 149.5 (Mai 2008), S. 2251–2260. DOI: 10.1210/en.2007-1557. URL: <http://dx.doi.org/10.1210/en.2007-1557> (siehe S. 108).
- [366] S. R. Hügl, M. F. White und C. J. Rhodes. „Insulin-like growth factor I (IGF-I)-stimulated pancreatic beta-cell growth is glucose-dependent. Synergistic activation of insulin receptor substrate-mediated signal transduction pathways by glucose and IGF-I in INS-1 cells.“ In: *J Biol Chem* 273.28 (Juli 1998), S. 17771–17779 (siehe S. 108).
- [367] Mitsuru Ohsugi u. a. „Reduced expression of the insulin receptor in mouse insulinoma (MIN6) cells reveals multiple roles of insulin signaling in gene expression, proliferation, insulin content, and secretion.“ In: *J Biol Chem* 280.6 (Feb. 2005), S. 4992–5003. DOI: 10.1074/jbc.M411727200. URL: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M411727200> (siehe S. 108).
- [368] J. Davaille u. a. „Antiproliferative properties of sphingosine 1-phosphate in human hepatic myofibroblasts. A cyclooxygenase-2 mediated pathway.“ In: *J Biol Chem* 275.44 (Nov. 2000), S. 34628–34633. DOI: 10.1074/jbc.M006393200. URL: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M006393200> (siehe S. 108).
- [369] Hitoshi Ikeda u. a. „Antiproliferative property of sphingosine 1-phosphate in rat hepatocytes involves activation of Rho via Edg-5.“ In: *Gastroenterology* 124.2 (Feb. 2003), S. 459–469. DOI: 10.1053/gast.2003.50049. URL: <http://dx.doi.org/10.1053/gast.2003.50049> (siehe S. 108).

- [370] Chiara Donati u. a. „Sphingosine 1-phosphate regulates myogenic differentiation: a major role for S1P2 receptor.“ In: *FASEB J* 19.3 (März 2005), S. 449–451. DOI: 10.1096/fj.04-1780fje. URL: <http://dx.doi.org/10.1096/fj.04-1780fje> (siehe S. 108).
- [371] Sonja Björklund u. a. „Effects of sphingosine 1-phosphate on calcium signaling, proliferation and S1P2 receptor expression in PC Cl3 rat thyroid cells.“ In: *Mol Cell Endocrinol* 231.1-2 (Feb. 2005), S. 65–74. DOI: 10.1016/j.mce.2004.12.001. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2004.12.001> (siehe S. 108).
- [372] Zhengshan Zhao u. a. „FTY720 normalizes hyperglycemia by stimulating β -cell in vivo regeneration in db/db mice through regulation of cyclin D3 and p57(KIP2).“ In: *J Biol Chem* 287.8 (Feb. 2012), S. 5562–5573. DOI: 10.1074/jbc.M111.305359. URL: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.305359> (siehe S. 108, 113, 118).
- [373] Kenneth Watterson u. a. „Pleiotropic actions of sphingosine-1-phosphate.“ In: *Prog Lipid Res* 42.4 (Juli 2003), S. 344–357 (siehe S. 108).
- [374] Julie Radeff-Huang u. a. „G protein mediated signaling pathways in lysophospholipid induced cell proliferation and survival.“ In: *J Cell Biochem* 92.5 (Aug. 2004), S. 949–966. DOI: 10.1002/jcb.20094. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.20094> (siehe S. 108, 109, 120).
- [375] Hsi-Lung Hsieh u. a. „Sphingosine 1-phosphate induces EGFR expression via Akt/NF-kappaB and ERK/AP-1 pathways in rat vascular smooth muscle cells.“ In: *J Cell Biochem* 103.6 (Apr. 2008), S. 1732–1746. DOI: 10.1002/jcb.21563. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.21563> (siehe S. 108).
- [376] Q. Wang u. a. „Glucagon-like peptide-1 regulates proliferation and apoptosis via activation of protein kinase B in pancreatic INS-1 beta cells.“ In: *Diabetologia* 47.3 (März 2004), S. 478–487. DOI: 10.1007/s00125-004-1327-5. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-004-1327-5> (siehe S. 109).
- [377] Fang Zhao u. a. „Nodal induces apoptosis through activation of the ALK7 signaling pathway in pancreatic INS-1 β -cells.“ eng. In: *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303.1 (Juli 2012), E132–E143. DOI: 10.1152/ajpendo.00074.2012. URL: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00074.2012> (siehe S. 109).
- [378] Gael Grouwels u. a. „Ectopic expression of E2F1 stimulates beta-cell proliferation and function.“ eng. In: *Diabetes* 59.6 (Juni 2010), S. 1435–1444. DOI: 10.2337/db09-1295. URL: <http://dx.doi.org/10.2337/db09-1295> (siehe S. 109).
- [379] Elisabeth I. Schmitz u. a. „Sphingosine 1-phosphate protects primary human keratinocytes from apoptosis via nitric oxide formation through the receptor subtype S1P(3).“ In: *Mol Cell Biochem* (Aug. 2012). DOI: 10.1007/s11010-012-1433-5. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-012-1433-5> (siehe S. 109, 121).
- [380] Suzanne G. Laychock u. a. „Sphingosine 1-phosphate affects cytokine-induced apoptosis in rat pancreatic islet beta-cells.“ In: *Endocrinology* 147.10 (Okt. 2006), S. 4705–4712. DOI: 10.1210/en.2006-0456. URL: <http://dx.doi.org/10.1210/en.2006-0456> (siehe S. 109).
- [381] G. Kulik und M. J. Weber. „Akt-dependent and -independent survival signaling pathways utilized by insulin-like growth factor I.“ In: *Mol Cell Biol* 18.11 (Nov. 1998), S. 6711–6718 (siehe S. 110).
- [382] J. Størling u. a. „Nitric oxide contributes to cytokine-induced apoptosis in pancreatic beta cells via potentiation of JNK activity and inhibition of Akt.“ eng. In: *Diabetologia* 48.10 (Okt. 2005), S. 2039–2050. DOI: 10.1007/s00125-005-1912-2. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-005-1912-2> (siehe S. 110).

- [383] T. Murayama und M. Ui. „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.“ In: *J Biol Chem* 258.5 (März 1983), S. 3319–3326 (siehe S. 110).
- [384] Leyre Brizuela u. a. „Sphingosine-1-phosphate stimulates aldosterone secretion through a mechanism involving the PI3K/PKB and MEK/ERK 1/2 pathways.“ In: *J Lipid Res* 48.10 (Okt. 2007), S. 2264–2274. DOI: 10.1194/jlr.M700291-JLR200. URL: <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M700291-JLR200> (siehe S. 111).
- [385] Yoshiko Banno u. a. „Involvement of phospholipase D in insulin-like growth factor-I-induced activation of extracellular signal-regulated kinase, but not phosphoinositide 3-kinase or Akt, in Chinese hamster ovary cells.“ In: *Biochem J* 369.Pt 2 (Jan. 2003), S. 363–368. DOI: 10.1042/BJ20021368. URL: <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20021368> (siehe S. 111).
- [386] Sonja Balthasar u. a. „Interactions between sphingosine-1-phosphate and vascular endothelial growth factor signalling in ML-1 follicular thyroid carcinoma cells.“ In: *Endocr Relat Cancer* 15.2 (Juni 2008), S. 521–534. DOI: 10.1677/ERC-07-0253. URL: <http://dx.doi.org/10.1677/ERC-07-0253> (siehe S. 111).
- [387] Linnea M. Baudhuin u. a. „S1P3-mediated Akt activation and cross-talk with platelet-derived growth factor receptor (PDGFR).“ In: *FASEB J* 18.2 (Feb. 2004), S. 341–343. DOI: 10.1096/fj.03-0302fje. URL: <http://dx.doi.org/10.1096/fj.03-0302fje> (siehe S. 111).
- [388] Mariana Lagadari u. a. „Sphingosine-1-phosphate inhibits the cytotoxic activity of NK cells via Gs protein-mediated signalling.“ In: *Int J Oncol* 34.1 (Jan. 2009), S. 287–294 (siehe S. 111).
- [389] Hesham M. El-Shewy u. a. „Insulin-like growth factors mediate heterotrimeric G protein-dependent ERK1/2 activation by transactivating sphingosine 1-phosphate receptors.“ eng. In: *J Biol Chem* 281.42 (Okt. 2006), S. 31399–31407. DOI: 10.1074/jbc.M605339200. URL: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M605339200> (siehe S. 111).
- [390] Elena Germinario u. a. „S1P2 receptor promotes mouse skeletal muscle regeneration.“ In: *J Appl Physiol* 113.5 (Sep. 2012), S. 707–713. DOI: 10.1152/japplphysiol.00300.2012. URL: <http://dx.doi.org/10.1152/japplphysiol.00300.2012> (siehe S. 111).
- [391] Yoh Takuwa. „Subtype-specific differential regulation of Rho family G proteins and cell migration by the Edg family sphingosine-1-phosphate receptors.“ eng. In: *Biochim Biophys Acta* 1582.1-3 (Mai 2002), S. 112–120 (siehe S. 111).
- [392] Suzanne G. Laychock, Yingrao Tian und Shawn M. Sessanna. „Endothelial differentiation gene receptors in pancreatic islets and INS-1 cells.“ In: *Diabetes* 52.8 (Aug. 2003), S. 1986–1993 (siehe S. 111, 118).
- [393] Teresa Sanchez u. a. „PTEN as an effector in the signaling of antimigratory G protein-coupled receptor.“ In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 102.12 (März 2005), S. 4312–4317. DOI: 10.1073/pnas.0409784102. URL: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0409784102> (siehe S. 112, 123).
- [394] Wa Du u. a. „S1P(2), the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, negatively regulates tumor angiogenesis and tumor growth in vivo in mice.“ eng. In: *Cancer Res* 70.2 (Jan. 2010), S. 772–781. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2722. URL: <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2722> (siehe S. 112).
- [395] Jan Ohotski u. a. „Identification of novel functional and spatial associations between sphingosine kinase 1, sphingosine 1-phosphate receptors and other signaling proteins that affect prognostic outcome in estrogen receptor-positive breast cancer.“ In: *Int J Cancer* (Juni 2012). DOI: 10.1002/ijc.27692. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.27692> (siehe S. 113).

- [396] Toshiyuki Imasawa u. a. „Blockade of sphingosine 1-phosphate receptor 2 signaling attenuates streptozotocin-induced apoptosis of pancreatic beta-cells.“ In: *Biochem Biophys Res Commun* 392.2 (Feb. 2010), S. 207–211. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.01.016. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.01.016> (siehe S. 113, 118).
- [397] M. Higa u. a. „Protein kinase B/Akt signalling is required for palmitate-induced beta-cell lipotoxicity.“ eng. In: *Diabetes Obes Metab* 8.2 (März 2006), S. 228–233. DOI: 10.1111/j.1463-1326.2005.00488.x. URL: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-1326.2005.00488.x> (siehe S. 114).
- [398] Xiao-Tao Feng u. a. „Palmitate contributes to insulin resistance through downregulation of the Src-mediated phosphorylation of Akt in C2C12 myotubes.“ In: *Biosci Biotechnol Biochem* 76.7 (2012), S. 1356–1361 (siehe S. 114).
- [399] Larysa V. Yuzefovych u. a. „Protection from palmitate-induced mitochondrial DNA damage prevents from mitochondrial oxidative stress, mitochondrial dysfunction, apoptosis, and impaired insulin signaling in rat L6 skeletal muscle cells.“ In: *Endocrinology* 153.1 (Jan. 2012), S. 92–100. DOI: 10.1210/en.2011-1442. URL: <http://dx.doi.org/10.1210/en.2011-1442> (siehe S. 114).
- [400] A. Dresner u. a. „Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity.“ In: *J Clin Invest* 103.2 (Jan. 1999), S. 253–259. DOI: 10.1172/JCI5001. URL: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI5001> (siehe S. 114).
- [401] O. Kluth u. a. „Dissociation of lipotoxicity and glucotoxicity in a mouse model of obesity associated diabetes: role of forkhead box O1 (FOXO1) in glucose-induced beta cell failure.“ In: *Diabetologia* 54.3 (März 2011), S. 605–616. DOI: 10.1007/s00125-010-1973-8. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-010-1973-8> (siehe S. 114).
- [402] Min Jeong Kwon u. a. „The Effects of Glyburide on Apoptosis and Endoplasmic Reticulum Stress in INS-1 Cells in a Glucolipotoxic Condition.“ In: *Diabetes Metab J* 35.5 (Okt. 2011), S. 480–488. DOI: 10.4093/dmj.2011.35.5.480. URL: <http://dx.doi.org/10.4093/dmj.2011.35.5.480> (siehe S. 114).
- [403] Wissal El-Assaad u. a. „Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death.“ In: *Endocrinology* 144.9 (Sep. 2003), S. 4154–4163 (siehe S. 114).
- [404] Marc Prentki u. a. „Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes.“ In: *Diabetes* 51 Suppl 3 (Dez. 2002), S405–S413 (siehe S. 114).
- [405] Martin G. Latour u. a. „GPR40 is necessary but not sufficient for fatty acid stimulation of insulin secretion in vivo.“ In: *Diabetes* 56.4 (Apr. 2007), S. 1087–1094. DOI: 10.2337/db06-1532. URL: <http://dx.doi.org/10.2337/db06-1532> (siehe S. 115).
- [406] Carina P. Tan u. a. „Selective small-molecule agonists of G protein-coupled receptor 40 promote glucose-dependent insulin secretion and reduce blood glucose in mice.“ In: *Diabetes* 57.8 (Aug. 2008), S. 2211–2219. DOI: 10.2337/db08-0130. URL: <http://dx.doi.org/10.2337/db08-0130> (siehe S. 115).
- [407] M. Prentki und B. E. Corkey. „Are the beta-cell signaling molecules malonyl-CoA and cystolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM?“ In: *Diabetes* 45.3 (März 1996), S. 273–283 (siehe S. 115).
- [408] Vincent Poirout und R Paul Robertson. „Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction.“ In: *Endocr Rev* 29.3 (Mai 2008), S. 351–366. DOI: 10.1210/er.2007-0023. URL: <http://dx.doi.org/10.1210/er.2007-0023> (siehe S. 115).
- [409] Benjamin T. Bikman und Scott A. Summers. „Ceramides as modulators of cellular and whole-body metabolism.“ eng. In: *J Clin Invest* 121.11 (Nov. 2011), S. 4222–4230. DOI: 10.1172/JCI57144. URL: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI57144> (siehe S. 115).

- [410] Jose Antonio Chavez u. a. „A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids.“ eng. In: *J Biol Chem* 278.12 (März 2003), S. 10297–10303. DOI: 10.1074/jbc.M212307200. URL: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M212307200> (siehe S. 115).
- [411] Yugesh Kharel u. a. „Sphingosine kinase type 2 inhibition elevates circulating sphingosine 1-phosphate.“ eng. In: *Biochem J* 447.1 (Okt. 2012), S. 149–157. DOI: 10.1042/BJ20120609. URL: <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20120609> (siehe S. 115).
- [412] Claudia Weber u. a. „Discontinued postnatal thymocyte development in sphingosine 1-phosphate-lyase-deficient mice.“ eng. In: *J Immunol* 183.7 (Okt. 2009), S. 4292–4301. DOI: 10.4049/jimmunol.0901724. URL: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0901724> (siehe S. 116).
- [413] E. R. Smith und AH Merrill Jr. „Differential roles of de novo sphingolipid biosynthesis and turnover in the "burst" free sphingosine and sphinganine, and their 1-phosphates and N-acyl-derivatives, that occurs upon changing the medium of cells in culture.“ eng. In: *J Biol Chem* 270.32 (Aug. 1995), S. 18749–18758 (siehe S. 116).
- [414] R. T. Riley u. a. „Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis.“ eng. In: *Environ Health Perspect* 109 Suppl 2 (Mai 2001), S. 301–308 (siehe S. 116, 117).
- [415] Zhidong Tu u. a. „Integrating siRNA and protein-protein interaction data to identify an expanded insulin signaling network.“ eng. In: *Genome Res* 19.6 (Juni 2009), S. 1057–1067. DOI: 10.1101/gr.087890.108. URL: <http://dx.doi.org/10.1101/gr.087890.108> (siehe S. 118).
- [416] M. R. Kendall und C. J. Hupfeld. „FTY720, a sphingosine-1-phosphate receptor modulator, reverses high-fat diet-induced weight gain, insulin resistance and adipose tissue inflammation in C57BL/6 mice.“ eng. In: *Diabetes Obes Metab* 10.9 (Sep. 2008), S. 802–805. DOI: 10.1111/j.1463-1326.2008.00910.x. URL: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-1326.2008.00910.x> (siehe S. 118).
- [417] W. Truong u. a. „Human islet function is not impaired by the sphingosine-1-phosphate receptor modulator FTY720.“ eng. In: *Am J Transplant* 7.8 (Aug. 2007), S. 2031–2038. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2007.01880.x. URL: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-6143.2007.01880.x> (siehe S. 118).
- [418] Margaret A. Morris u. a. „Prevention, but not cure, of autoimmune diabetes in a NOD.scid transfer model by FTY720 despite effective modulation of blood T cells.“ eng. In: *Autoimmunity* 44.2 (März 2011), S. 115–128. DOI: 10.3109/08916934.2010.499885. URL: <http://dx.doi.org/10.3109/08916934.2010.499885> (siehe S. 118).
- [419] M-M. Cals-Grierson und A. D. Ormerod. „Nitric oxide function in the skin.“ In: *Nitric Oxide* 10.4 (Juni 2004), S. 179–193. DOI: 10.1016/j.niox.2004.04.005. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2004.04.005> (siehe S. 119).
- [420] V. Krischel u. a. „Biphasic effect of exogenous nitric oxide on proliferation and differentiation in skin derived keratinocytes but not fibroblasts.“ In: *J Invest Dermatol* 111.2 (Aug. 1998), S. 286–291. DOI: 10.1046/j.1523-1747.1998.00268.x. URL: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1747.1998.00268.x> (siehe S. 119).
- [421] Y. M. Kim, C. A. Bombeck und T. R. Billiar. „Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis.“ In: *Circ Res* 84.3 (Feb. 1999), S. 253–256 (siehe S. 119).
- [422] Junichi Yamaoka, Seiji Kawana und Yoshiki Miyachi. „Nitric oxide inhibits ultraviolet B-induced murine keratinocyte apoptosis by regulating apoptotic signaling cascades.“ In: *Free Radic Res* 38.9 (Sep. 2004), S. 943–950. DOI: 10.1080/10715760412331284807. URL: <http://dx.doi.org/10.1080/10715760412331284807> (siehe S. 120).

- [423] Y. G. Kwon u. a. „Sphingosine 1-phosphate protects human umbilical vein endothelial cells from serum-deprived apoptosis by nitric oxide production.“ In: *J Biol Chem* 276.14 (Apr. 2001), S. 10627–10633. DOI: 10.1074/jbc.M011449200. URL: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M011449200> (siehe S. 120).
- [424] M. Morales-Ruiz u. a. „Sphingosine 1-phosphate activates Akt, nitric oxide production, and chemotaxis through a Gi protein/phosphoinositide 3-kinase pathway in endothelial cells.“ In: *J Biol Chem* 276.22 (Juni 2001), S. 19672–19677. DOI: 10.1074/jbc.M009993200. URL: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M009993200> (siehe S. 120, 121).
- [425] Ingrid Fleming und Rudi Busse. „Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase.“ In: *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284.1 (Jan. 2003), R1–12. DOI: 10.1152/ajpregu.00323.2002. URL: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00323.2002> (siehe S. 120).
- [426] Yoh Takuwa u. a. „Sphingosine-1-phosphate signaling and biological activities in the cardiovascular system.“ In: *Biochim Biophys Acta* 1781.9 (Sep. 2008), S. 483–488. DOI: 10.1016/j.bbaliip.2008.04.003. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbaliip.2008.04.003> (siehe S. 121).
- [427] Clara De Palma u. a. „Endothelial nitric oxide synthase activation by tumor necrosis factor alpha through neutral sphingomyelinase 2, sphingosine kinase 1, and sphingosine 1 phosphate receptors: a novel pathway relevant to the pathophysiology of endothelium.“ In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26.1 (Jan. 2006), S. 99–105. DOI: 10.1161/01.ATV.0000194074.59584.42. URL: <http://dx.doi.org/10.1161/01.ATV.0000194074.59584.42> (siehe S. 121).
- [428] J. Igarashi, S. G. Bernier und T. Michel. „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.“ In: *J Biol Chem* 276.15 (Apr. 2001), S. 12420–12426. DOI: 10.1074/jbc.M008375200. URL: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M008375200> (siehe S. 121).
- [429] Henrik Potteck u. a. „Phosphorylation of the immunomodulator FTY720 inhibits programmed cell death of fibroblasts via the S1P3 receptor subtype and Bcl-2 activation.“ In: *Cell Physiol Biochem* 26.1 (2010), S. 67–78. DOI: 10.1159/000315107. URL: <http://dx.doi.org/10.1159/000315107> (siehe S. 121).
- [430] William C. Sessa. „eNOS at a glance.“ In: *J Cell Sci* 117.Pt 12 (Mai 2004), S. 2427–2429. DOI: 10.1242/jcs.01165. URL: <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.01165> (siehe S. 121).
- [431] Karin Lichte u. a. „Lysophospholipid receptor-mediated calcium signaling in human keratinocytes.“ In: *J Invest Dermatol* 128.6 (Juni 2008), S. 1487–1498. DOI: 10.1038/sj.jid.5701207. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jid.5701207> (siehe S. 121).
- [432] Vincent Falanga. „Wound healing and its impairment in the diabetic foot.“ eng. In: *Lancet* 366.9498 (Nov. 2005), S. 1736–1743. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)67700-8. URL: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67700-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67700-8) (siehe S. 122).
- [433] I B J G. Debats u. a. „Role of arginine in superficial wound healing in man.“ In: *Nitric Oxide* 21.3-4 (2009), S. 175–183. DOI: 10.1016/j.niox.2009.07.006. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2009.07.006> (siehe S. 122).
- [434] Ali R. Bokhari und George A C. Murrell. „The role of nitric oxide in tendon healing.“ eng. In: *J Shoulder Elbow Surg* 21.2 (Feb. 2012), S. 238–244. DOI: 10.1016/j.jse.2011.11.001. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jse.2011.11.001> (siehe S. 122).
- [435] Lu Tie u. a. „Genistein accelerates refractory wound healing by suppressing superoxide and FoxO1/iNOS pathway in type 1 diabetes.“ eng. In: *J Nutr Biochem* 24.1 (Jan. 2013), S. 88–96. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2012.02.011. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.02.011> (siehe S. 122).

- [436] A. Raynaud-Simon u. a. „Arginine plus proline supplementation elicits metabolic adaptation that favors wound healing in diabetic rats.“ eng. In: *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 303.10 (Nov. 2012), R1053–R1061. DOI: 10.1152/ajpregu.00003.2012. URL: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00003.2012> (siehe S. 122).
- [437] Takeshi Kawanabe u. a. „Sphingosine 1-phosphate accelerates wound healing in diabetic mice.“ eng. In: *J Dermatol Sci* 48.1 (Okt. 2007), S. 53–60. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2007.06.002. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2007.06.002> (siehe S. 122).
- [438] Zhong Li u. a. „Regulation of PTEN by Rho small GTPases.“ In: *Nat Cell Biol* 7.4 (Apr. 2005), S. 399–404. DOI: 10.1038/ncb1236. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1236> (siehe S. 123).
- [439] Zan Tong u. a. „Pancreas-specific Pten deficiency causes partial resistance to diabetes and elevated hepatic AKT signaling.“ eng. In: *Cell Res* 19.6 (Juni 2009), S. 710–719. DOI: 10.1038/cr.2009.42. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2009.42> (siehe S. 123).

Originalarbeiten

Elisabeth I. Schmitz, Henrik Potteck, Melanie Schüppel, Marianti Manggau, Elly Wahyudin, Burkhard Kleuser

Sphingosine 1-phosphate protects primary human keratinocytes from apoptosis via nitric oxide formation through the receptor subtype S1P(3).

In: Molecular and Cellular Biochemistry, August 2012.

DOI: 10.1007/s11010-012-1433-5. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-012-1433-5>.

Vorträge

Sphingosine 1-phosphate protects primary human keratinocytes from apoptosis via nitric oxide formation through the receptor subtype S1P3

Sphingolipidclub SLC Meeting Glasgow 2010

Abkürzungsverzeichnis

^3H	Tritium
AIF	Apoptosis inducing factor
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
APC	Allophyocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	Bcl-2-associated death promoter
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl2	B-Cell Lymphoma 2
Bcl _{XL}	B-Cell Lymphoma extra large
Bid	BH3 interacting death domain
BPE	Bovine pituitary extract
BSA	bovines Serumalbumin
BSN- Puffer	Bjerrum- Schafer- Nielsen Puffer
CD14 / 36	Cluster of Differentiation 14 / 36
CDK	Cyclinabhängige Kinasen
CDKI	CDK- Inhibitoren
Chk1	DNA-damage Checkpointkinase
CHOP	C/EBP homologous protein
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CREB	cAMP response element-binding protein

DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DED	Death effector domain
DEPC	Diethyldicarbonat
DISC	Death inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco's modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO- Synthase
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
ESI	Elektronensprayionisation
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FADD	Fas-associated protein with death domain
FB1	Fumonisin B1
FFA	Freie Fettsäure
FKS	Fötales Kälberserum
FoxO1	Forkhead-Box-Protein O1
FSC	Vorwärtsstreulicht
FTY-720	Fingolimod
GLP-1	Glucagon-like-peptide 1
GPCR	G- Proteingekoppelter Rezeptor
GSK-3	Glykogen-Synthase-Kinase 3
h	Stunden
hEGF	humaner epidermaler Wachstumsfaktor

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HFD	Hochfettdiät
HRP	Meerrettichperoxidase
hTERT	Telomerase Reverse Transkriptase
IGF	Insulin-like Growth Factor
ILK	Integrin- linked Kinase
IR	Insulinrezeptor
IRS1	Insulinrezeptorsubstrat 1
IRS2	Insulinrezeptorsubstrat 2
IUPHAR	International Union of Pharmacology
KBM	Keratinocytenbasalmedium
LPA	Lysophosphatidsäure
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
Mcl-1	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
MHC-Proteine	Major Histocompatibility Complex Proteine
min	Minuten
mTor	Mammalian Target of Rapamycin
Myc	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog
NFκB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NO	Stickstoffmonoxid
NZO-Maus	New Zealand Obese Maus
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatpufferte Kochsalzlösung
PCD	Programmierter Zelltod
PDK	PIP ₃ - abhängige Kinase

PH- Domäne	Pleckstrin Homologie Domäne
PHLPP	PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase
PI	Propidiumjodid
PI3K	Phosphoinositid-3 Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIP ₃	Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PVDF	Polyvinylidenfluorid
QTOF	Quadrupol Time of flight
Rip	Receptor interacting protein
RIPA- Puffer	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
rpm	Umdrehungen pro min
RRLC	Rapid Resolution Liquid Chromatography
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
S1P	Sphingosin-1 phosphat
SD	Standarddiät
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHIP	Src homology-2 domain-containing inositol polyphosphate 5'-phosphatase
siRNA	small interfering RNA
SphK	Sphingosinkinase

SPL	S1P-Lyase
SPT	Serinpalmitoyltransferase
Src	Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate
SSC	Seitwärtsstreulicht
T1DM	Typ 1 Diabetes Mellitus
T2DM	Typ 2 Diabetes Mellitus
TBE- Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TdT	Terminale desoxynucleotidyltransferase
TEMED	Tetramethylenethylendiamin
TLC	Telomerase Component
TMR	Tetramethylrhodamin
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TRADD	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein
TRAF	TNF receptor-associated factor
TUNEL	TdT-mediated dUTP-X nick end labeling
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
ZDF- Ratte	Zucker diabetic fat Ratte

Abbildungsverzeichnis

1.3.1 Schematische Darstellung der Apoptosesignalwege	21
1.6.1 S1P	32
1.6.2 Der S1P- Metabolismus	35
3.1.1 S1P-Rezeptorexpression in murinen β -Zellen (MIN-6)	76
3.1.2 S1P-Rezeptorexpression in Ratten- β -Zellen (INS-1e).	76
3.1.3 Aktivierung der Akt-Kinase durch Insulin.	78
3.1.4 Hemmung der insulininduzierten Akt-Aktivierung durch S1P	79
3.1.5 Maximale Hemmung der insulininduzierten Akt-Aktivierung bei 30 min Vorstimulation mit S1P	79
3.1.6 Maximale Hemmung der Akt-Aktivierung durch 10 μ M S1P	80
3.1.7 Hemmung der insulininduzierten Proliferation durch S1P	81
3.1.8 S1P hemmt die antiapoptotische Wirkung des Insulins	83
3.1.9 Einfluss von PTX auf die Hemmung der Akt-Aktivierung durch S1P	84
3.1.10 Einfluss von JTE013, FTY720-P, VPC23019 und VPC24191 auf die Hem- mung der Akt-Aktivierung durch S1P	85
3.1.11 Einfluss von S1P-Rezeptormodulatoren auf die Proliferation muriner β -Zellen	87
3.1.12 Einfluss von FTY720-P auf den antiapoptotischen Effekt des Insulins	87
3.2.1 Einfluss von Palmitat auf die Akt-Aktivierung - Konzentrationsreihe Glucose	89
3.2.2 Einfluss von Palmitat auf die Akt-Aktivierung - Konzentrationsreihe Palmitat	89
3.2.3 Rolle der SPT in der Hemmung der Akt-Aktivierung durch Palmitat	91
3.2.4 Beteiligte S1P-Rezeptoren in der Hemmung der Akt-Aktivierung durch Palmitat	91

3.2.5 Ernährungsabhängige S1P-Spiegel im Blut von NZO- und C57BL/6-Mäusen	93
3.2.6 S1P-Spiegel in MIN-6 Zellen nach Stimulation mit Palmitat	93
3.2.7 S1P-Spiegel in MIN-6 Zellen nach Stimulation mit Palmitat und Hemmstoffen der S1P- Synthese	94
3.2.8 Expression regulatorischer Enzyme des S1P-Spiegels in MIN-6 Zellen .	96
3.2.9 Expression regulatorischer Enzyme des S1P-Spiegels in MIN-6 Zellen nach Stimulation mit Palmitat	96
3.3.1 Antiapoptotischer Effekt von S1P in Keratinozyten	97
3.3.2 Erfolgreiche RNAi-Transfektion gegen eNOS	99
3.3.3 Einfluss von siRNA gegen eNOS auf die antiapoptotische Wirkung des S1P	100
3.3.4 Erfolgreiche RNAi- Transfektion gegen S1P ₃	101
3.3.5 Einfluss von siRNA gegen S1P ₃ auf die antiapoptotische Wirkung des S1P	101
3.3.6 Einfluss von siRNA gegen S1P ₃ auf die eNOS- Aktivierung durch S1P	102
3.3.7 Rolle des S1P ₃ -Rezeptors in der S1P- stimulierten NO- Produktion in Keratinozyten	103

Tabellenverzeichnis

1.6.1 S1P-Rezeptoren: alte und neue Bezeichnungen	37
2.1.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	43
2.1.3 HFD	51
2.1.7 Primer	53
2.2.1 Geräte	54
2.3.1 Geräteeinstellungen für die S1P-Bestimmung	71