

Signalwege der anti-apoptotischen Wirkung von Dexamethason in humanen Fibroblasten

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

Barbara Christina Stephanie Nieuwenhuis
aus Bocholt, Kreis Borken

Dezember 2009

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Burkhard Kleuser
2. Gutachter: Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting

Datum der Disputation: 29.01.2010

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von

Herrn Prof. Dr. Burkhard Kleuser

am Institut für Pharmakologie und Toxikologie
des Instituts für Pharmazie
der Freien Universität Berlin angefertigt.

Für meine Familie

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Burkhard Kleuser für die Vergabe des hochinteressanten Dissertationsthemas, die ausgezeichnete Betreuung und die ständige Gesprächsbereitschaft während der Durchführung des Promotionsvorhabens. Seine hilfreiche Unterstützung und wissenschaftliche Kompetenz haben diese Arbeit erst ermöglicht.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, für die Erstellung des Zweitgutachtens. Außerdem danke ich Herrn Dr. Markus Tölle, Medizinische Klinik für Nephrologie der Charité, für die Bereitstellung des Gewebematerials zur Gewinnung muriner Fibroblasten

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Hannelore Gonska, die mir während der Einarbeitung und Hilfe bei der Zellkultur und auch in sonstigen Lebenslagen stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

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

Allen Mitgliedern der Arbeitskreise von Frau Professor Dr. Monika Schäfer-Korting und Herrn Professor Dr. Burkhard Kleuser danke ich für die gute Zusammenarbeit und das freundschaftliche Arbeitsklima. Für die wunderbare Aufnahme in die Arbeitskreise, die enge Laborarbeit und die Unterstützung während der ganzen Zeit möchte ich mich besonders bei, Frau Dr. Christina Keller, Herrn Karsten Zimmermann, Frau Dr. Vivian Kral, Frau Dr. Anja Lüth, Herrn Henrik Potteck, Herrn Ullrich Kürschner, Frau Elisabeth Schmitz, Herrn Lukasz Japtok und Herrn Michael Jakobi bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Laborpartnern Herrn Karsten Zimmermann und Herrn Lukasz Japtok für die guten wissenschaftlichen und privaten Gespräche sowie das Beantworten meiner zahlreichen Fragen bedanken.

Frau Elisabeth Schmitz, Herrn Henrik Potteck, Frau Alexandra Kekewska, Herrn Lukasz Japtok, Frau Dr. Anja Lüth und Herrn Michael Jakobi danke ich ganz herzlich für die schönen Aktivitäten auch außerhalb des Labors.

Ich danke außerdem Frau Dr. Anja Lüth, Herrn Henrik Potteck, Herrn Lukasz Japtok, Frau Elisabeth Schmitz und Herrn Dr. Hans Schlieff für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich besonders bei meiner Familie und Herrn Alexander Gerhold für die wunderbare Unterstützung und den liebevollen Beistand in allen Höhen und Tiefen dieser Arbeit bedanken.

Originalarbeiten

Nieuwenhuis, B.; Lüth, A.; Chun, J.; Huwiler, A.; Pfeilschifter, J.; Schäfer-Korting, M.; Kleuser, B.

Involvement of the ABC-transporter ABCC1 and the sphingosine 1-phosphate receptor subtype S1P₃ in the cytoprotection of human fibroblasts by the glucocorticoid dexamethasone.

Journal of Molecular Medicine 2009 Jun;87(6):645-57. Epub 2009 Apr 17

Nieuwenhuis, B.; Lüth, A.; Kleuser, B.

Dexamethasone protects human fibroblasts from apoptosis via an S1P₃-receptor subtype dependent activation of PKB/Akt and Bcl_{XL}.

Pharmacological Research, Epub 18.12.2009

Förster, A.; Emmeler, T.; Schwalm, S.; Ebadi, M.; Meyer zu Heringdorf, D.; Nieuwenhuis, B.; Kleuser, B.; Huwiler, A.; Pfeilschifter, J.

Glucocorticoids protect renal mesangial cells from apoptosis by increasing cellular sphingosine-1-phosphate levels.

Kidney international, angenommen im Januar 2010

Potteck, H.; Nieuwenhuis, B.; Kleuser, B.

Phosphorylation of the Immunomodulator FTY720 protects fibroblasts from apoptosis via the S1P₃ receptor subtype and Bcl-2 activation.

Cellular Physiology and Biochemistry, eingereicht

Poster

Nieuwenhuis, B.; Kleuser, B.

Der ABC-Transporter ABCC1 ist am antiapoptotischen Effekt von Dexamethason auf humane dermale Fibroblasten beteiligt

DPhG-Symposium Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor 04 Juli 2008

Nieuwenhuis, B.; Kleuser, B.

Involvement of the ABC-transporter ABCC1 and the sphingosine 1-phosphate receptor subtype S1P3 in the cytoprotection of human fibroblasts by the glucocorticoid dexamethasone

Keystone Symposium PI3K signalling in disease 22-27 april 2009 Olympic Valley, CA, USA

Vorträge

Nieuwenhuis, B.; Kleuser, B.

Beteiligung der S1P-Kaskade am antiapoptotischen Effekt von Dexamethason

DPhG-Tagung Frankfurt September 2008

Lebenslauf:

Der Lebenslauf wurde aus Datenschutzgründen entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus Datenschutzgründen entfernt.

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	7
1.1	Glukokortikoide	8
1.1.1	Der Wirkmechanismus von Glukokortikoiden	8
1.1.2	Glukokortikoide als Arzneistoffe	10
1.2	Der programmierte Zelltod	13
1.2.1	Apoptose	14
1.2.1.1	Der extrinsische Signalweg zur Auslösung der Apoptose	15
1.2.1.2	Der intrinsische Signalweg zur Auslösung der Apoptose	16
1.2.2	Bedeutung der Apoptose in der Entstehung von Erkrankungen unter besonderer Berücksichtigung der Haut	19
1.3	Sphingolipide	21
1.3.1	Ceramid, Sphingosin und S1P	22
1.3.1.1	Der Sphingolipid-Rheostat	23
1.3.1.2	Sphingosinkinasen	24
1.3.1.3	S1P-Rezeptoren und das „Inside-Out“-Signalverhalten von S1P	25
1.3.2	ABC-Transporter	29
1.3.3	Der PI3K/Akt-Signalweg	31
1.3.3.1	Die Lipidkinase Akt	31
1.3.3.2	Die Serin/Threoninkinase Akt	33
1.4	Zielstellung	34
2	Material und Methoden	36
2.1	Materialien	37
2.1.1	Geräte	37
2.1.2	Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	38
2.1.3	Zusammensetzung der verwendeten Lösungen	43
2.1.3.1	Zusammensetzung der Lösungen für die Zellkultur	43
2.1.3.2	Zusammensetzung der Kulturmedien	44
2.1.3.3	Lösungen für die Durchflusszytometrie	44
2.1.3.4	Lösungen für die Hochleistungsflüssigkeits-chromatographie (HPLC)	45
2.1.3.5	Lösungen zur Zellyse	45

2.1.3.6	Lösungen für die Proteinanalyse	46
2.1.3.7	Lösungen für fluoreszenzmikroskopische Analysen	48
2.1.3.8	Herstellung von Lösungen der Testsubstanzen	48
2.2	Methoden	50
2.2.1	Gewinnung und Kultivierung von Fibroblasten	50
2.2.1.1	Gewinnung humaner Fibroblasten	50
2.2.1.2	Gewinnung muriner Fibroblasten	51
2.2.1.3	Quantifizierung und Einsaat von Zellen	51
2.2.1.4	Cryokonservierung und Reaktivierung von Fibroblasten	52
2.2.2	Durchflusszytometrische Bestimmung apoptotischer Zellen	53
2.2.3	Bestimmung von S1P und Sphingosin mittels HPLC	55
2.2.4	Bestimmung von Ceramiden unter Verwendung der Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS)	58
2.2.5	Isolierung von Gesamt t-RNA	60
2.2.6	Synthese von cDNA mittels reverser Transkription	62
2.2.7	Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (PCR)	63
2.2.8	Methoden zur Analyse der Proteinexpression	65
2.2.8.1	Zellyse	65
2.2.8.2	Proteinbestimmung	66
2.2.8.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	66
2.2.8.4	Western Blot	67
2.2.8.5	Immunologische Detektion der Proteine	68
2.2.9	RNA-Interferenz (RNAi)	69
2.2.9.1	Antisensetechnologie	70
2.2.9.2	Verwendung von siRNA	71
2.2.10	Fluoreszenzmikroskopie	72
2.2.11	Messung des transepithelialen mitochondrialen Potentials $\Delta\psi_m$	73
2.2.12	Analyse der Caspase 3-Bildung mit dem Caspase 3 intracellular activity Kit 1	74
2.2.13	Quantifizierung der Aktivität der Caspasen 3/7	74
2.2.14	Statistik	75

3	Ergebnisse	77
3.1	Bedeutung des Sphingolipid-Rheostats und der SphK1 für den zytoprotektiven Effekt von Dex in humanen Fibroblasten	78
3.1.1	Untersuchung des intrazellulären Gleichgewichts von Ceramid, Sphingosin und S1P humaner Fibroblasten in Gegenwart von Dex	78
3.1.2	Regulation der SphK durch Dex	79
3.1.2.1	Untersuchung der Isoenzyme SphK1 und SphK2 auf mRNA-Ebene	79
3.1.2.2	Der Einfluss von Dex auf die Proteinexpression der SphK1	81
3.1.3	Untersuchungen zum Apoptoseverhalten von Fibroblasten nach Desensitivierung der SphK1 in Gegenwart von Dex	81
3.1.3.1	Überprüfung der SphK1 siRNA-Effektivität mittels RT-PCR	81
3.1.3.2	Ermittlung intrazellulärer S1P-Spiegel in Gegenwart von SphK1 siRNA	82
3.1.3.3	Darstellung der Induktion der SphK1 durch Dex unter Verwendung von SphK1 siRNA	83
3.1.3.4	Durchflusszytometrische Analyse zur Bestimmung des Apoptoseverhaltens von mit SphK1 siRNA behandelten Fibroblasten	84
3.2	Beteiligung des ABCC1 Transporters am anti-apoptotischen Effekt von Dex in Fibroblasten	85
3.2.1	Darstellung des Expressionsmusters von ABC-Transportern mittels Real-time PCR	85
3.2.2	Beeinflussung der Apoptoseinhibition von Dex durch die ABC-Transporter-Hemmstoffe MK571 und Verapamil	86
3.2.3	Untersuchung des Effekts von ABCC1 siRNA auf das Apoptoseverhalten humaner Fibroblasten	87
3.2.3.1	Überprüfung der Effektivität der ABCC1 siRNA mittels Real-time PCR	87
3.2.3.2	FACS-Analyse zur Bestimmung der Apoptoserate nach Verwendung von ABCC1 siRNA	88
3.2.4	Regulation von ABCC1 durch Dex	89
3.2.4.1	Beeinflussung der mRNA-Spiegel von ABCC1 durch Dex	89

3.2.4.2	Analyse der Proteinexpression des ABC-Transporters ABCC1 in mit Dex stimulierten Fibroblasten	90
3.2.4.3	Fluoreszenzmikroskopische Analyse der ABCC1-Regulation durch Dex	91
3.3	Identifizierung von S1P-Rezeptoren als essentielle Mediatoren der Dex-induzierten Hemmung des PCD	92
3.3.1	Analyse der Expression und Induktion von S1P-Rezeptoren in Gegenwart von Dex	92
3.3.2	FACS-Analyse unter Verwendung von S1P ₁₋₅ -ASO	93
3.3.3	Beeinflussung des anti-apoptotischen Effekts von Dex durch den S1P _{3/5} -Antagonisten Suramin	95
3.3.4	Vergleich der Dex induzierten Apoptosereduktion an Wildtyp- und S1P ₃ ^{-/-} -Fibroblasten	96
3.4	Beteiligung des PI3K- und PKB/Akt-Signalweges am zytoprotektivem Effekt von Dex	97
3.4.1	Einfluss verschiedener Inhibitoren intrazellulärer Signalwege auf den anti-apoptotischen Effekt von Dex	97
3.4.2	Desensitivierung der Akt-Kinase	99
3.4.3	Regulation der Akt-Kinase durch Dex auf mRNA-Ebene	100
3.4.4	Induktion der Akt Proteinexpression durch Dex und die Bedeutung des Lipidmediators S1P	101
3.4.5	Veränderung der Dex-induzierten PKB/Akt-Regulation in Wildtyp- und S1P ₃ ^{-/-} -Fibroblasten	103
3.5	Beteiligung von Bcl _{XL} am anti-apoptotischen Effekt von Dex	105
3.5.1	Analyse der Beeinflussung von Bcl _{XL} durch Dex mittels RT-PCR	105
3.5.2	Veränderung der Expression des Proteins Bcl _{XL} der Bcl-2-Familie in Anwesenheit von Dex	105
3.5.3	Beeinflussung der Dex-induzierten Bcl _{XL} -Proteinsynthese durch den PI3K-Hemmstoff LY294002	106
3.5.4	Bestimmung des Bcl _{XL} -Proteins in Wildtyp- und S1P ₃ ^{-/-} -Fibroblasten in Anwesenheit von Dex	107
3.6	Fluoreszenzmikroskopische Analyse des transmembranären, mitochondrialen Potentials mittels JC-1 in Gegenwart von Dex	108

3.7	Beteiligung der Caspasen 3 und 7 am zytoprotektiven Effekt von Dex in humanen Fibroblasten	110
3.7.1	Analyse der Bildung von Caspase 3 in Gegenwart von Dex mittels PhiPhiLuxG1D2	110
3.7.2	Quantitative Bestimmung der Bildung von Caspase 3/7 in Gegenwart von Dex und TNF α /Act	112
4	Diskussion	113
4.1	Regulation des PCD durch GC	114
4.2	Regulation von Sphingolipiden und der SphK1 durch Dex	115
4.2.1	Beeinflussung intrazellulärer Ceramidspiegel durch Dex	116
4.2.2	Regulation der intrazellulären Sphingosinspiegel durch Dex	117
4.2.3	Regulation intrazellulärer S1P-Spiegel durch Dex	118
4.2.4	Beteiligung der SphK1 am anti-apoptotischen Effekt von Dex	118
4.3	Bedeutung des ABC-Transporters ABCC1 für den anti-apoptotischen Effekt von Dex in Fibroblasten	121
4.3.1	Teilnahme des ABCC1 am anti-apoptotischen Effekt von Dex	122
4.4	Identifizierung des S1P ₃ -Rezeptorsubtyps als essentieller Mediator des Dex-induzierten Effekts	124
4.5	Beteiligung des PI3K- und PKB/Akt-Signalweges am zytoprotektivem Effekt von Dex	127
4.5.1	Rolle der PI3K für den anti-apoptotischen Effekt von Dex	127
4.5.2	Die essentielle Bedeutung der Akt-Kinase für den zytoprotektiven Effekt von Dex	128
4.6	Beteiligung des Proteins Bcl _{XL} der Bcl-2-Familie am anti-apoptotischen Effekt von Dex	131
4.7	Beeinflussung des transmembranären, mitochondrialen Membranpotentials humaner Fibroblasten in Gegenwart von Dex	134
4.8	Beteiligung der Caspasen 3 und 7 am zytoprotektiven Effekt von Dex in humanen Fibroblasten	136
4.9	Bedeutung des anti-apoptotischen Effekts von Dex in humanen Fibroblasten	137

5	Zusammenfassung	140
5.1	Zusammenfassung	141
5.2	Abstract	144
6	Abkürzungsverzeichnis	147
7	Literaturverzeichnis	152

1. Einleitung

1.1 Glukokortikoide

Nach der ersten Identifizierung und Isolation von Glukokortikoiden (engl. glucocorticoid, GC) aus der Nebennierenrinde durch Edward C. Kendall und Tadeus Reichstein in den 1930er- und 1940er-Jahren, gelang es erstmalig Philipp Hench das entzündliche Geschehen bei Patienten mit rheumatoider Arthritis durch die Gabe von Kortison positiv zu beeinflussen (de Fremery, 1937; Hench P, 1949; Mason HL, 1936). Kurz darauf zeigte sich aber, dass die Anwendung von GC in der Therapie von entzündlichen Erkrankungen einige schwerwiegende und teilweise sogar therapielimitierende Nebenwirkungen, wie die Entwicklung einer erniedrigten Glucosetoleranz, mit sich bringt. Daraufhin begann die Suche nach geeigneten Alternativen, welche unter anderem in der strukturellen Modifikation von Kortisol und der Entwicklung seiner synthetisch veränderten Analoga Prednison, Prednisolon und auch Dexamethason (Dex) im Jahre 1958 mündete (Schwenk, 1949; Villa et al., 1958).

Mittlerweile scheint der Wirkmechanismus, wie GC zelluläre Funktionen beeinflussen können, weitgehend aufgeklärt zu sein. GC vermitteln ihre Wirkungen über drei verschiedene Arten von Signalwegen. Welcher dieser Mechanismen aktiviert wird, wird unter anderem durch die jeweilige Dosierung des Arzneistoffs bestimmt. In sehr geringen Konzentrationen wurde hauptsächlich das Auftreten von genomischen Effekten beschrieben, wohingegen mit steigender Dosierung der GC auch spezifische und unspezifische nicht-genomische Wirkungen beobachtet wurden (Buttgereit, 2000).

1.1.1 Der Wirkmechanismus von Glukokortikoiden

Die genomischen Wirkungen von GC können dabei wie folgt beschrieben werden: zu Beginn der Einwirkung von GC auf eine Zelle kommt es zur Passage der Plasmamembran aufgrund der guten lipidlöslichen Eigenschaften dieser Arzneistoffe. Daraufhin erfolgt die Bindung an den ubiquitär exprimierten, zytosolischen Glukokortikoidrezeptor (GR) (Buttgereit et al., 1998). Vom GR sind zwei Isoformen bekannt, GR α und GR β , welche unterschiedliche Funktionen in der Zelle wahrnehmen. GR α vermittelt durch Bindung des Kortikoids die klassischen Effekte der GC und steuert die Transkriptionsaktivität seiner Zielgene. GR β hingegen, ist

nicht dazu in der Lage mit GC zu interagieren. Die hauptsächliche Funktion von GR β besteht in der Bildung von Heterodimeren mit GR α und seiner daraus resultierenden Inaktivierung (Rhen and Cidlowski, 2005).

In seiner inaktiven Form liegt der GR α mit mehreren Proteinen assoziiert vor. Einige von ihnen gehören zur Gruppe der Hitzeschockproteine (HSP), wovon HSP90, HSP70 und HSP56 als Liganden des GR α identifiziert werden konnten (Bertorelli et al., 1998). Diese dreidimensionale Struktur ermöglicht es dem GR α zum einem GC zu binden, andererseits verhindert sie auch unkontrollierte Interaktionen von GC mit der DNA. Die Ligation des GC zum GR-Komplex beinhaltet dabei eine Konformationsänderung des Moleküls, welche die Abdissoziation der HSPs bewirkt (Prigent et al., 2004). Anschließend erfolgt die Translokation des Steroidrezeptorkomplexes als Homodimer und Monomer in den Zellkern, wo Interaktionen mit der DNA (sogenannten „glucocorticoid responsive elements“, (GRE)) oder auch direkte Proteininteraktionen mit Transkriptionsfaktoren wie dem Aktivatorprotein 1 (AP-1) die Folge sind (Tissing et al., 2003). Auf diese Weise kommt es dann zu einer vermehrten Transaktivierung bestimmter Zielgene, welche zum Beispiel für das Protein Mitogen Activated Protein Kinase Phosphatase-1 oder auch den Inhibitor κ B (I κ B) codieren. Zusätzlich erfolgt eine indirekt negative Regulation von Transkriptionsfaktoren wie dem Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) oder auch spezifischen Interleukinen (IL) durch GR-Proteininteraktionen (Transrepression) (Barnes, 2006; Buttgereit et al., 1995; Goulding and Guyre, 1993). In diesem Zusammenhang stellt somit die Beeinflussung der Aktivität des „nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells“ (Nf κ B) durch einerseits einer verstärkten Synthese von I κ B und andererseits durch die direkte Inhibierung von Nf κ B durch den aktiven GR-Komplex selbst, einen wichtigen Punkt in der Wirkung von GC dar (Barnes and Karin, 1997).

Bereits seit den 1950-Jahren konnten neben den genomischen Wirkungen von GC auch innerhalb kürzester Zeit vermittelte Wirkungen mit der Anwendung von GC in Verbindung gebracht werden (Gray, 1951). Dies stellte eine deutliche Diskrepanz zum postulierten Wirkmechanismus der GC dar und wurde daher erst in der letzten Zeit näher untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass diese schnellen Wirkungen von GC, welche innerhalb einer Stunde oder teilweise sogar innerhalb weniger Minuten eintreten können, tatsächlich nicht auf genomischen Wirkungen basieren (van der Laan and Meijer, 2008). In diesem Zusammenhang gelang es in

den letzten Jahren, die rapiden Effekte von GC auf die Aktivierung von membranständigen GR zurückzuführen (Roy and Rai, 2009). Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass GC auch über eine Beeinflussung der physikochemischen Eigenschaften von Membranen, wie zum Beispiel dem transmembranären Transport von Ionen, und von membran-assoziierten Rezeptoren innerhalb kürzester Zeit zelluläre Funktionen beeinflussen können (Buttgereit et al., 1993).

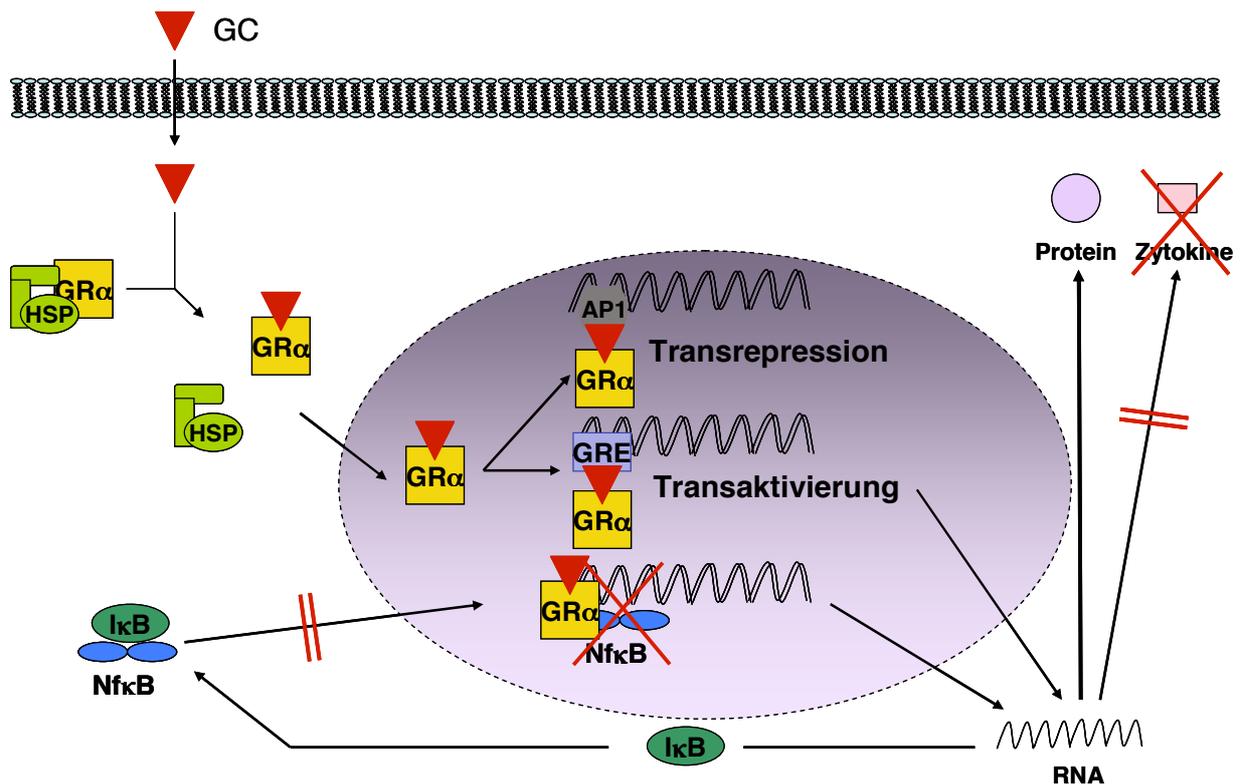


Abb. 1: Der genomische Wirkmechanismus von GC. Nach der Passage der Zellmembran bildet das GC unter Abdissoziation der HSPs den GC-GR-Komplex. Dieser bewirkt dann im Zellkern die Transrepression des AP1, die Transaktivierung von Zielgenen (IκB) über die Bindung an GREs oder die direkte Inhibition des NfκB. Zusätzlich mündet die vermehrte Synthese des IκB in einer verminderten Aktivität des NfκB. Insgesamt kommt es so zu einer Regulation der Synthese von Zielproteinen und Zytokinen.

1.1.2 Glukokortikoide als Arzneistoffe

Seit ihrer ersten Entdeckung sind topisch und systemisch angewandte GC für den heutigen Arzneimittelschatz unverzichtbar geworden. So repräsentieren sie, aufgrund ihrer stark anti-entzündlichen und immunsuppressiven Eigenschaften eine der am häufigsten verwendeten Arzneistoffklassen (Rhen and Cidlowski, 2005). Zusätzlich stellen sie ebenso wichtige Therapeutika für die Begleitmedikation von Tumorerkrankungen dar. Dort wird vor allem Dex häufig wegen seines stark anti-

emetischen Potenzials bei der Behandlung des Zytostatika-induzierten Erbrechens eingesetzt (Ng and Della-Fiorentina, 2009). Jedoch zeigte sich, dass der Einsatz von Dex im Rahmen einer Chemotherapie nicht nur Vorteile aufweist, sondern auch zur Entwicklung einer erhöhten Resistenz gegen die gewählten Chemotherapeutika oder die Bestrahlung von Tumorgeweben führen kann (Mariotta et al., 1999).

Die systemische Applikation von GC birgt zusätzlich weitere Risiken: so ist die Anwendung oraler GC häufig mit der Entwicklung von Symptomen verbunden, welche dem Cushing Syndrom ähneln (Shibli-Rahhal et al., 2006). Ein wichtiger Nebeneffekt sowohl für die orale, als auch für die topische Therapie mit GC, besteht in der Vermittlung negativer Wirkungen auf die Haut. Hier konnte die Entwicklung von Teleangiektasen, aufgrund einer stimulierenden Wirkung der GC auf Mikrogefäßendothelzellen mit einer daraus resultierenden Dilatation von Gefäßen und Arteriolen, beobachtet werden (Hettmannsperger et al., 1993). Zusätzlich zeigte sich, dass das verstärkte Auftreten einer gestörten Hautbarrierefunktion und die Entstehung von Striae mit einer GC-Therapie assoziiert sein kann (Kao et al., 2003; Nigam, 1989). Insbesondere die Anwendung hochpotenter systemischer oder topisch applizierbarer GC kann dabei mit der Entwicklung einer zunehmenden Hautatrophie verbunden sein (Autio et al., 1994; Hengge et al., 2006).

Die Entwicklung einer GC-induzierten Hautatrophie umschließt den essentiellen Substanzverlust der Haut, verbunden mit einer reduzierten Elastizität und dem verminderten Schutz der Haut gegenüber äußeren Einflüssen. Dies verleiht der Haut ein pergamentartiges Aussehen (Hengge et al., 2006). Histopathologisch gesehen kommt es bei der Entwicklung einer Hautatrophie zur Ausdünnung der Epidermis, welche mit einer reduzierten Größe der Keratinozyten und einer verminderten Anzahl an Fibroblasten verbunden ist. Zusätzlich tragen die Neuordnung des dermalen Fasernetzwerkes der Haut und die Verminderung des Gehaltes an dermalen Lipiden zur Entwicklung einer gestörten Barrierefunktion der Haut bei.

GC bewirken dabei eine nachhaltige Beeinflussung sowohl der Epidermis als auch der Dermis, die über die Basalmembran miteinander in Verbindung stehen (Schoepe et al., 2006). Die Epidermis ist hauptsächlich aus Keratinozyten aufgebaut. Diese Zellen haben ihren Ursprung in stark proliferierenden Zellen der Basalmembran, welche durch Proliferation die Bildung von Tochterzellen ermöglichen, die unter Ausdifferenzierung in die oberen Schichten der Epidermis vordringen. Nach dem Tod der Keratinozyten kommt es dann zur Ausbildung des Stratum Corneums, welches in

eine lipidreiche, extrazelluläre Matrix (ECM) eingebettet ist und der Haut mechanische Stabilität verleiht (Wysocki, 1999). Die ECM ist aufgrund ihres Gehaltes an freien Fettsäuren, Cholesterol und auch Ceramiden der entscheidende Faktor für die Barrierefunktion der Haut (Elias and Brown, 1978; Feingold et al., 1990; Schurer and Elias, 1991). Die Dermis hingegen besteht hauptsächlich aus Fibroblasten, deren Hauptfunktion in der Produktion und im Transport von Komponenten der ECM besteht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Produktion von Kollagen essentiell für die Ausbildung einer elastischen und mechanisch belastbaren Haut ist (Wysocki, 1999). In Bezug auf die Entwicklung der GC-induzierten Hautatrophie stellen jedoch sowohl Keratinozyten, als auch Fibroblasten die Zielzellen einer GC-Therapie und der damit verbundenen Nebenwirkungen dar (Wach et al., 1998).

Viele Untersuchungen zur Entstehung der GC-induzierten Hautatrophie zeigten in Bezug auf Keratinozyten nicht nur eine verminderte Zellgröße, sondern auch eine reduzierte Proliferationsrate (Delforno et al., 1978; Kolbe et al., 2001; Lange et al., 2000). Zusätzlich zu diesem anti-proliferativen Effekt von GC auf Keratinozyten spielen auch eine erhöhte Apoptoserate verbunden mit einer stark reduzierten Mitoseaktivität der Zellen eine Rolle für die Entstehung der Hautatrophie (Fisher and Maibach, 1971; Hammer et al., 2004; Zendequi et al., 1988). Die Folge ist eine starke Ausdünnung der Haut, verbunden mit einem hohen transepidermalen Wasserverlust. Dieser spiegelt im Allgemeinen den Verlust der Barrierefunktion der Haut wieder (Booth et al., 1982; Kao et al., 2003; Kolbe et al., 2001). Die Analyse der Auswirkungen einer GC-Therapie auf dermale Fibroblasten zeigte vor allem Eingriffe in die Synthese von ECM-Proteinen. So zeichneten sich für den Verlust von Stabilität und Elastizität der Haut vor allem ein Verlust an Kollagen, Proteoglykan und Elastin verantwortlich (Cutroneo et al., 1981). Diese Wirkungen gehen auf einen stark anti-proliferativen Effekt der Steroide auf Fibroblasten zurück (Lange et al., 2000). Zusätzlich zeigte sich, dass diese anti-proliferative Wirkung genau wie bei der Wirkung von GC auf Keratinozyten mit einer verminderten Mitoserate verbunden ist (Hein et al., 1994). Interessanterweise begründet die Therapie mit GC allerdings nicht wie zu erwarten eine gesteigerte Apoptoserate der Fibroblasten. Hier konnte ganz im Gegenteil eine Hemmung des programmierten Zelltods (engl. programmed cell death, PCD) beobachtet werden (Hammer et al., 2004). Diese Eigenschaft von GC in Abhängigkeit vom jeweiligen Zelltyp sowohl zytoprotektive Eigenschaften zu vermitteln, als auch zu einer erhöhten Apoptoserate beizutragen, gehört zu den

neueren Untersuchungsfeldern auf dem Gebiet der GC-Forschung. Hervorzuheben ist ferner, dass die Vermittlung von pro- und anti-apoptotischen Signalen durch GC meist über die Aktivierung oder Hemmung der gleichen Signalwege erfolgt. Vor diesem Hintergrund hat die Ausbildung von Resistenzen gegen Tumortherapeutika zu einem genauen Hinterfragen der Gabe von GC in Kombination mit Chemotherapeutika geführt (Moutsatsou and Papavassiliou, 2008). Zwar konnte extensiv nachgewiesen werden, dass GC zu einer erhöhten Apoptoserate bestimmter Tumorzellen im Rahmen der Chemotherapie beitragen, allerdings gibt es mittlerweile auch viele Anhaltspunkte dafür, dass Tumorzellen, insbesondere Hautzellen, durch die Gabe von GC gegenüber Chemotherapeutika resistent werden können. Zusätzlich zeigt sich auch, dass die Anwendung von GC mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Tumorerkrankungen einhergeht (Dietrich et al., 2009; Herr and Pfitzenmaier, 2006; Moutsatsou and Papavassiliou, 2008).

1.2 Der programmierte Zelltod

Der PCD ist ein wichtiger Signalweg zur Regulation der Koexistenz von mehreren Zellen innerhalb eines Gewebes. Dabei ist der PCD insbesondere bei der Steuerung vielfältiger biologischer Prozesse, wie der Morphogenese, der Aufrechterhaltung der Gewebekomöostase und der Elimination schädlicher Zellen von Bedeutung. Eine Fehlfunktion des PCD hingegen ist meist mit der Entwicklung verschiedener Erkrankungen, insbesondere mit der Entstehung von Malignomen verbunden. Die zunehmende Prävalenz der verschiedensten Neoplasien verdeutlicht dabei die Bedeutung von Kenntnissen über den Ablauf des PCD für die Therapie von malignen Neubildungen.

Mittlerweile gibt es einige Systeme zur Beschreibung der verschiedenen Arten des PCD, wobei das in den folgenden Ausführungen beschriebene Modell die höchste Akzeptanz genießt und die drei hauptsächlich morphologisch unterscheidbaren Arten des PCD näher beschreibt. Es beinhaltet die Unterteilung des PCD in das Auftreten von Autophagie, Nekrose und Apoptose (Krysko et al., 2008; Sun and Peng, 2009). Der Prozess der Autophagie bezeichnet meist eine Antwort der Zelle auf das Ausbleiben von Nahrungsfaktoren mit dem Ziel der Aufrechterhaltung essentieller Stoffwechselwege in der Zelle (Noda et al., 2009; Van Limbergen et al., 2009). Unter dem Begriff Nekrose hingegen versteht man den meist unkontrolliert verlaufenden

Untergang von Zellverbänden oder ganzen Gewebestrukturen aufgrund von mechanischem und physikochemischem Stress (Fink and Cookson, 2005). Die genaue Kenntnis der Apoptose ist für das Verständnis der untersuchten Wirkungen des GC Dex von besonderer Bedeutung und wird im Folgenden ausgiebig erläutert.

1.2.1 Apoptose

Der Begriff Apoptose (von griechisch „apo“ weg und „ptosis“ Fall) wurde im Jahre 1972 geprägt, als ein Forscherteam der Universität von Aberdeen dem gleichen morphologischen Aussehen sterbender Zellen, aufgrund diverser Stimuli den Begriff Apoptose zuordnete (Kerr et al., 1972). Im Detail sind apoptotische Zellen durch eine starke Abrundung der Zellen (gleichbedeutend mit einem Verlust der Adhäsionsfähigkeit) und eine deutliche Reduktion des Zellvolumens gekennzeichnet. Zusätzlich zeigen apoptotische Zellen die Bildung von Vesikeln, auch „blebbing“ genannt, assoziiert mit der Kondensation von Chromatin sowie der Fragmentierung von DNA. Schließlich kommt es zur Zerstückelung der Zelle in kleine membrangebundene sogenannte „apoptotic-bodies“, welche im Nachfolgenden durch benachbarte Zellen phagozytiert werden. Es stellte sich schließlich heraus, dass diese Prozesse auf die Aktivierung eines definierten „Suizidprogramms“ zur Auslösung eines kontrollierten und definierten Zelltodes zurückgeführt werden können (Kerr et al., 1972).

Was damals noch als „biologisches Phänomen“ beschrieben wurde, stand in den darauf folgenden Jahren im Mittelpunkt der Erforschung und Behandlung von neoplastischen Erkrankungen. Vor diesem Hintergrund konnte die Bedeutung der Apoptose bereits in der embryonalen Entwicklung von Geweben und zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase etabliert werden (Haanen and Vermes, 1996; Meier et al., 2000). Schon 1972 gelang es Kerr et al. zu zeigen, dass der PCD durch Apoptose in geregelte, hintereinander ablaufende Vorgänge eingeteilt werden kann. Dabei kommt es in einem ersten Schritt zur Erkennung des apoptotischen Signals durch zelluläre Sonden und zur Aktivierung verschiedener zum Tode führender Signalwege. In einem weiteren Schritt erfolgt dann die Elimination der toten Zelle durch das umliegende Gewebe (Kerr et al., 1972).

Man unterscheidet verschiedene Signalwege, die durch pro-apoptotische Agenzien ausgelöst werden können. Von besonderer Bedeutung sind dabei der Rezeptor-

Ligand-vermittelte Signalweg, sowie auch ein Prozess welcher von einer Beteiligung der Mitochondrien zur Auslösung des Zelltods ausgeht.

1.2.1.1 Der extrinsische Signalweg zur Auslösung der Apoptose

Der extrinsische Signalweg zur Auslösung von Apoptose erfordert die Bindung eines Liganden an spezifische, oberflächenständige Rezeptoren (Todesrezeptoren). Einige bereits gut untersuchte Liganden der Todesrezeptoren sind der Fas-Ligand (FasL) und TNF α (Saikumar et al., 1999). Während dem FasL der Rezeptor Fas zugeordnet wird, konnte für TNF α die Bindung an den Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 1 (TNFR1) bestimmt werden. Beide Rezeptoren gehören aufgrund ihrer cysteinreichen und extrazellulär lokalisierten Ligandenbindungsstellen zur Superfamilie der TNF-Rezeptoren (Smith et al., 1994). Eine genaue Analyse des strukturellen Aufbaus ergab, dass lediglich Fas sowie der TNFR1 über eine zu 28% homologe, zytoplasmatische Domäne verfügen (Chinnaiyan and Dixit, 1996). Diese Domäne ist für die Signaltransduktion im Bereich der Apoptose essentiell und wird auch Todesdomäne (engl. death domain, DD) genannt (Boldin et al., 1995). Durch einige weiterführende Experimente in Hefezellen konnte schließlich die Existenz verschiedener, intrazellulärer Adapterproteine nachgewiesen werden, welche mit den DD interagieren können. Dabei sind insbesondere das TNFR1 assoziierte Todesdomänenprotein (TRADD) und das Fas assoziierte Protein mit Todesdomäne (FADD) von Bedeutung (Chinnaiyan et al., 1995; Stanger et al., 1995). Diese bilden nämlich zusammen mit dem TNFR1 und der Procaspase 8 (Definition Caspase siehe 1.2.2) den „death inducing signaling complex“ (DISC) (Micheau and Tschopp, 2003). Innerhalb des DISC erfolgt anschließend die proteolytische Spaltung der Procaspase 8 in ihre aktive Form (Caspase 8). In Abhängigkeit der Menge an gebildeter Caspase 8 kommt es, wenn höhere Spiegel an Caspase 8 in der Zelle gebildet werden, unter Beteiligung weiterer Caspasen zum Tod Zelle. Sind im Zytosol nur kleinere Mengen an Caspase 8 zu registrieren, wird das Todessignal durch eine Interaktion mit den Proteinen der B-Zell Lymphom 2 (Bcl-2)-Familie verstärkt. Dies geschieht durch die Spaltung von Bid (Bcl-2-interacting domain death agonist) zu t-Bid (truncated Bid), welches durch eine Interaktion mit den pro-apoptotischen Proteinen Bax (Bcl-2 assoziiertes Protein) und Bak (Bcl-2 homologer Antagonist/Killer) der Bcl-2-Familie

zur Auslösung des PCD beiträgt (Schutze et al., 2008). Dieser Prozess repräsentiert zudem die Schnittstelle zwischen intrinsischem und extrinsischem Apoptosesignalweg.

1.2.1.2 Der intrinsische Signalweg zur Auslösung der Apoptose

Bestimmte zytotoxische Agenzien, wie zum Beispiel Stickstoffmonoxid (NO) oder auch die Einwirkung von Strahlung auf eine Zelle, sind ebenfalls zur Induktion der Apoptose befähigt. Interessanterweise kommt es hier nicht zur Aktivierung von Rezeptor-Ligand-gesteuerten Mechanismen, sondern zu einer feinen Regulation mitochondrialer Proteine, insbesondere dem Cytochrom C (Cyt C) (Bosca and Hortelano, 1999; Mathieu et al., 1999). Dieses Protein befindet sich an der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran (Hirsch et al., 1997). Dort ist es für den intrazellulären Transport von Ionen innerhalb einer Zelle zur Synthese von ATP verantwortlich. Während des PCD wird jedoch das Cyt C in das Zytosol der Zelle freigesetzt. Dieser Prozess wird dabei eng durch die Proteine der Bcl-2-Familie reguliert (Gogvadze et al., 2006). Diese umschließt eine Gruppe von Proteinen, denen entweder eine zytoprotektive oder pro-apoptotische Funktion innerhalb der Zelle zugeordnet werden konnte. Sie sind dadurch gekennzeichnet, dass sie alle mehrere, jedoch mindestens eine, sequenzähnliche Bcl-2 Homologie- (BH) Domäne enthalten und für die heterodimeren Interaktionen der Bcl-2-Familienvorteiler untereinander von Bedeutung sind (Chittenden et al., 1995). Die meisten anti-apoptotischen Proteine beinhalten dabei die BH-Domänen 1-4, wohingegen die pro-apoptotischen Vertreter je nach ihrer Funktion und der Anzahl der BH-Domänen in zwei Gruppen aufgeteilt werden können. Die Proteine Bak, Bax und Bid beinhalten dabei die BH-Domänen 1-3 und sind auch als pro-apoptotische Multidomänenproteine oder Effektormultidomänenproteine bekannt. Die verbleibenden pro-apoptotischen Proteine beinhalten nur die dritte BH-Domäne (BH3-only-Proteine) (Strasser, 2005). Einige wichtige Vertreter sind dabei der p53-hochregulierte Modulator der Apoptose (Puma), oder auch der Bcl-2 interagierende Mediator des Zelltods (Bim). Diese agieren auf höheren Stufen der Signalwege als Vermittler der zellulären Zerstörung. Sie können durch verschiedene, schädliche Stimuli, wie zum Beispiel die Zerstörung von DNA, ein Absinken der Wachstumsfaktorkonzentration oder einer Aktivierung von Onkogenen, initiiert

werden. Dabei kommt es nicht nur zu einer verstärkten Expression der BH3-only Proteine, sondern auch durch Dephosphorylierungsreaktionen oder die Spaltung mittels Caspase 8 zur ihrer Aktivierung (Li et al., 1998; Zha et al., 1996). Das zahlenmäßige Verhältnis zwischen pro-apoptotischen und zytoprotektiven Bcl-2-Familienproteinen bestimmt dabei, ob eine Zelle abstirbt oder am Leben erhalten wird. Für den Fall der Apoptose kommt es dabei durch ein Zusammenspiel der pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak der Bcl-2-Familie, das in einer erhöhten Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (engl. mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP) mündet, zur Auslösung des PCD. Demgegenüber können die anti-apoptotischen Vertreter der Bcl-2-Familie durch eine Förderung (pro-apoptotisch) oder Hemmung (zytoprotektiv) der Homo-Oligomerisierung von Bax und Bak, die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran beeinflussen und kontrollieren somit die Auslösung der Apoptose. Dabei konnte eine Aktivierung und auch die verstärkte Expression der zytoprotektiven Proteine Bcl-2, Myeloid Cell Leukemia-1 (Mcl-1), Bcl-2-like 1 (Bcl_{XL}), und Bcl-2-Related Protein A1 (Bfl-1) mit einer Hemmung des PCD in Verbindung gebracht werden. Die Bildung einer permeablen Durchlasspore ist hingegen zusätzlich mit dem Anstieg des transmembranären, mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ verbunden und wird grundlegend durch eine Interaktion der beiden Arten von Bcl-2-Familienproteinen reguliert (Brunelle and Letai, 2009; Ly et al., 2003).

In einem nächsten Schritt auf dem Signalweg der Apoptose kommt es dann zur Freisetzung von Proteinen aus dem intermembranären Bereich des Mitochondriums in das Zytosol. Vor allem das Cytochrom C oder auch der Apoptose-induzierende Faktor (AIF) spielen hierbei eine Rolle. Der AIF trägt dabei nach Translokation in den Nukleus der Zelle ohne die Aktivierung von Caspasen zur Defragmentierung der DNA bei. Nun erfolgt die Bildung des sogenannten Apoptosoms, welches aus Cytochrom C, der Procaspase 9 und dem „apoptotic peptidase activating factor 1“ (APAF 1) aufgebaut ist. Dieser Prozess zieht die Aktivierung weiterer Caspasen nach sich (Wang, 2001). Dabei handelt es sich im Falle der Apoptose um kaskadenartig aktivierbare Proteasen, welche durch Spaltung oder gezielte Inaktivierung von Proteinen für die meisten Veränderungen der apoptotischen Zelle verantwortlich sind. Der Name Caspase rührt daher von ihrer Funktion her mittels einer Cystein-haltigen Seitenkette spezifisch Aspartat-haltige Proteinsubstrate zu spalten (cysteinabhängige

aspartatspezifische Protease) (Alnemri et al., 1996; Fuentes-Prior and Salvesen, 2004). Von der Gruppe der Caspasen konnten bisher 15 Mitglieder identifiziert werden, wovon 11 im Menschen exprimiert werden. Zudem kann man die Familie je nach Aufbau und Funktion der Caspasen in zwei Gruppen einteilen: Caspasen, welche entweder eine initiierende Funktion haben (Initiatorcaspasen) oder die Aktivierung einer weitreichenden Signalkaskade unter Beteiligung verschiedener Caspasen bewirken (Effektorcaspasen). Zu den Initiatorcaspasen werden die Caspasen 8, 9 und 10 gezählt, während die Caspasen 3, 6 und 7 auch als Effektorcaspasen bezeichnet werden (Pop and Salvesen, 2009). Da es sich bei allen Caspasen um Zymogene handelt, steht vor der Wahrnehmung ihrer proteolytischen Funktion in der Zelle ihre Aktivierung. Diese kann in Abhängigkeit von der jeweiligen Caspase in einer Dimerisierung oder auch der Spaltung der katalytischen Domäne bestehen (Riedl and Salvesen, 2007). Die durch das Apoptosom (intrazellulärer Signalweg der Apoptose) oder DISC (extrazellulärer Signalweg der Apoptose) angestoßene Signalkaskade von Caspasen mündet schließlich zusammen mit der Aktivierung des AIF in der Zerstörung der Zelle (Chen and Wang, 2002).

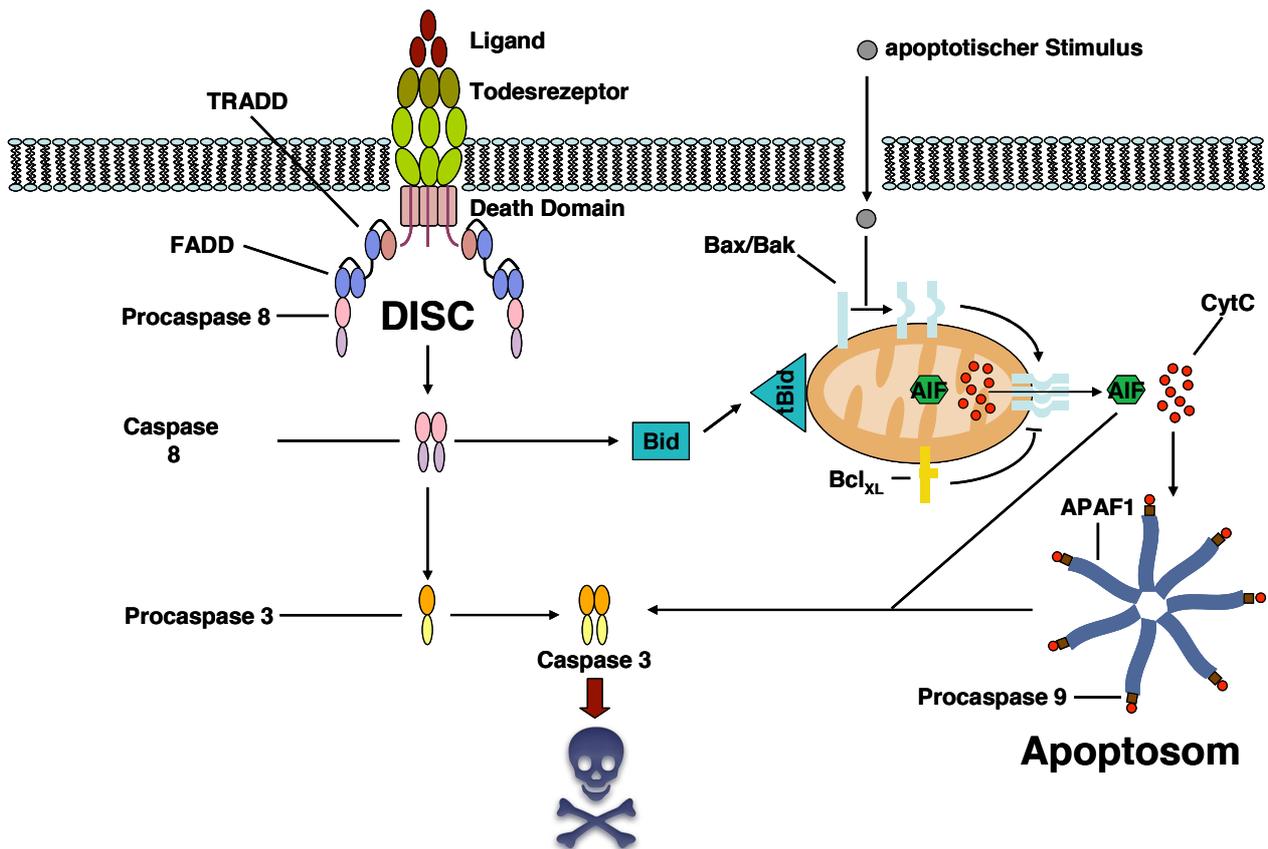


Abb. 2: Mediation der Apoptose durch extrinsische und intrinsische Signalwege. Zur Vermittlung des extrinsischen Apoptosesignalweges kommt es nach der Bindung eines Liganden an den Todesrezeptor zur Rekrutierung von TRADD, FADD und der Procaspase 8 an den Rezeptor und somit zur Ausbildung des DISC. Nach Spaltung der Procaspase 8 zur Caspase 8 erfolgt entsprechend der Menge an gebildeter Caspase 8 entweder die indirekte Aktivierung der Caspase 3 über die Spaltung von Bid zu t-Bid mit der folgenden Interaktion mit mitochondrialen Proteinen oder die direkte Aktivierung der Caspase 3. Die Auslösung des intrinsischen Signalweges der Apoptose hingegen, beinhaltet die Aktivierung der Homooligomerisierung von Bax und Bak zu einer permeablen Durchlasspore und die folgende Freisetzung des AIF und des Cyt C in das Zytosol. Dabei kommt es dann unter Ausbildung des Apoptosoms zur Aktivierung der Caspase 3 und somit zur Auslösung des PCD.

1.2.2 Bedeutung der Apoptose in der Entstehung von Erkrankungen unter besonderer Berücksichtigung der Haut

Im menschlichen Körper werden jeden Tag ca. 60 Billionen Zellen neu gebildet. Daher ist es von großer Bedeutung, dass multizelluläre Organismen auch dazu in der Lage sind, defekte oder alte Zellen zu eliminieren. Es herrscht also ein fein reguliertes Gleichgewicht zwischen Zelltod und der Neubildung von Zellen (Cotter, 2009). Dabei spielen vor allem die oben erläuterten Prozesse des PCD eine Rolle. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sich ein Defekt in der Durchführung der Apoptose oder auch in den apoptose-regulierenden, zellulären Signalwegen in der Entstehung schwerer Erkrankungen, insbesondere in der Entstehung von Tumoren,

manifestieren kann. In diesem Zusammenhang konnte unter anderem eine Fehlfunktion des Tumorsuppressorproteins p53 für die Entstehung unsterblicher Zellen verantwortlich gemacht werden. Normalerweise reguliert p53 als Transkriptionsfaktor nach DNA-Schädigung die Expression von Genen, welche an der Kontrolle des Zellzyklus, an der Induktion der Apoptose (des PCD) oder an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Weitere Untersuchungen zur Entstehung von entarteten Krebszellen zeigten, dass auch eine fehlgesteuerte Einwirkung des NfκB oder des Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweges (siehe Kapitel 1.3.3.) zur Entstehung von Neoplasien beitragen können. Die genaue Kenntnis dieser Signalwege eröffnet allerdings auch die Möglichkeit zur Entwicklung neuer Targets im Bereich der Chemotherapie. Die Therapie von neoplastischen Erkrankungen ist allerdings sehr häufig durch die Entstehung einer Resistenz des Tumors gegenüber dem Chemotherapeutikum gekennzeichnet. Dabei spielt die Ausbildung von erworbenen oder natürlichen Resistenzen gegen das Chemotherapeutikum für das nicht ausreichende Sterben der Zellen und somit für das Nicht-Anschlagen der Therapie eine besondere Rolle. Folglich ist es von besonderem Interesse als Basis zur Entwicklung neuer Chemotherapeutika, die Mechanismen, welche zum Sterben und Leben einer Zelle beitragen, genau zu charakterisieren. Auf diese Art und Weise können neue Arzneistoffe entwickelt werden und es ist möglich die Entstehung von Resistenzen zu vermindern oder auch zu umgehen.

Auch für die Entwicklung einiger dermalen Erkrankungen konnte ein Defekt des PCD als Ursache beschrieben werden (Bos and Spuls, 2008; Gilhar et al., 2006). Eine verminderte Rate an apoptotischen Zellen kann dabei auch durch eine Mutation oder Deletion des Tumorsuppressorproteins p53 oder einer reduzierten Expression der Todesrezeptoren in der Haut begründet sein. Dies kann dann auch zur Entstehung einer der heutzutage zahlenmäßig am häufigsten vorkommenden Formen von malignen Erkrankungen, dem Hautkrebs, kommen. Dabei konnte die Entwicklung von drei verschiedenen Hautkrebsformen beschrieben werden, nämlich des Basalzellkarzinoms, des Plattenepithelzellkarzinoms und des malignen Melanoms. Von diesen drei Hautkrebsarten handelt es sich beim malignen Melanom zwar nicht um die am häufigsten auftretende Form des Krebses, dafür um die am häufigsten tödlich verlaufende Form (Mortalität 20-25%) (Jemal et al., 2006). Dies kann auf die Neigung des malignen Melanoms zur Metastasierung zurückgeführt werden (Liotta and Stetler-Stevenson, 1991). Eine detaillierte Analyse der Pathophysiologie der

beteiligten Hautzellen ergab zudem, dass nicht nur von Melanomzellen gebildete Wachstumsfaktoren, Proteasen und Adhäsionsmoleküle für die Invasion der Melanomzellen in andere Gewebe von Bedeutung sind. Zusätzlich konnte etabliert werden, dass den in der Haut ansässigen Bindegewebszellen, nämlich Fibroblasten und Endothelzellen, eine essentielle Bedeutung in der Regulation der Metastasierung des malignen Melanoms zukommt (Fidler, 1995). Außerdem konnte gezeigt werden, dass zur Metastasierung einer Zelle die Überwindung der ECM erforderlich ist. Dieser Prozess setzt allerdings voraus, dass die jeweilige Zelle zum Abbau der Kollagene I und IV befähigt ist. Im Fall des malignen Melanoms konnten Fibroblasten als essentielle Donoren der zum Abbau des Kollagen I benötigten Matrixmetalloproteinase (MMP) 1 identifiziert werden (Benbow et al., 1999). Zusätzlich konnte eine erhöhte Expression dieses ECM-Bestandteiles und die Anwesenheit von Fibroblasten in der Mikroumgebung des Tumors mit einer erhöhten Progredienz für das Auftreten des malignen Melanoms in Verbindung gebracht werden (Wandel et al., 2000; Wandel et al., 2002). Daher ist es von Interesse die genauen Einflussfaktoren, welche zum Leben und Sterben von Fibroblasten beitragen, im Hinblick auf eine optimierte Therapie des malignen Melanoms zu charakterisieren.

1.3 Sphingolipide

Alle eukaryotischen Zellen sind von einer Membran umgeben, welche aus einer Lipidbilayerstruktur aufgebaut ist. Dabei konnten als Lipidhauptbestandteile jeder Membran Glycerolipide, Sphingolipide und Sterole identifiziert werden, deren biochemische und biophysische Eigenschaften je nach Funktion variieren (Lahiri and Futerman, 2007). Ursprünglich ging man davon aus, dass viele dieser Membranbestandteile lediglich zum Schutz der Zelle vor mechanischen und chemischen Einflüssen in der Lipiddoppelschicht der Zellmembran vorhanden waren. Heute allerdings weiß man, dass viele dieser Membranlipide biologisch aktiv sind und zusätzlich an vielen Signalwegen in der Zelle beteiligt sind. Eine genaue Untersuchung der Funktion und Beteiligung dieser Lipide an der zellulären Transduktion von Signalkaskaden ist sowohl für das Verständnis physiologischer Vorgänge aber auch für die Entstehung von Erkrankungen von Bedeutung. Die Gruppe der Sphingolipide steht dabei im Zentrum der aktuellen Forschung. Obwohl

diese Lipide ein hohes Maß an struktureller Vielfalt und Komplexität aufweisen, verfügen die einzelnen Signallipide über das Molekül Sphingosin als gemeinsamen Grundbaustein. Einige Sphingolipide regulieren sogar als Lipidmediatoren viele physiologische Reaktionen in der Zelle, so zum Beispiel Ceramid, Sphingosin und Sphingosin-1-Phosphat (S1P). Diese sind unter anderem dazu befähigt die Proliferation, die Differenzierung, die Beweglichkeit, das Wachstum oder auch die Apoptose einer Zelle zu regulieren. Im letztgenannten Funktionsbereich spielen vor allem Ceramid und S1P eine wichtige Rolle, da sie, wenn es um die Auslösung der Apoptose oder das Überleben einer Zelle geht, entgegengesetzte Signalwege aktivieren können (Lahiri and Futerman, 2007).

1.3.1 Ceramid, Sphingosin und S1P

Die biochemischen Signalwege für die Synthese und den Abbau von Sphingolipiden sind mittlerweile gut untersucht worden (Abb. 3). Als essentielle Zellorganelle konnten hierbei das endoplasmatische Retikulum (ER) sowie auch der Golgiapparat und Lysosomen für den Metabolismus von Sphingolipiden in der Zelle identifiziert werden. Die Bildung der bedeutsamen Lipidmediatoren Ceramid, Sphingosin und S1P kann dabei auf die Kondensation von Serin und Palmitoyl-CoA durch die Serinpalmitoyltransferase zurück geführt werden (Hannun et al., 2001). Nach der Reduktion zu Dihydrosphingosin erfolgt eine N-Acylierung mit der Bildung von Dihydroceramiden durch die Dihydroceramid-Synthase. Daraufhin wird unter Mitwirkung der Dihydroceramid-Desaturase eine trans-4,5 Doppelbindung in das Molekül eingeführt und es entstehen Ceramide. Diese können dann je nach Folgeenzym weiter zu Glykosphingolipiden, zu Ceramid-1-phosphat oder durch die Sphingomyelin-Synthase zu dem Membranlipid Sphingomyelin umgesetzt werden (Bajjalieh et al., 1989; Jeckel et al., 1992). Alternativ können Ceramide auch durch den Abbau von Sphingomyelin über Sphingomyelinasen gebildet werden (Zeidan and Hannun, 2009). Weiterhin besteht die Möglichkeit Ceramide unter Katalyse von Ceramidasen (siehe 1.3.1.1) in Sphingosin umzuwandeln (Xu et al., 2006). Dieser Schritt ist Teil eines Gleichgewichtes zwischen Ceramid und Sphingosin, welcher in der Gegenrichtung durch die Ceramidsynthase katalysiert wird (Laviad et al., 2008). So entstandenes Sphingosin kann nun durch Phosphorylierung mittels der Sphingosinkinase (SphK, siehe auch 1.3.1.2.) in den Lipidmediator S1P

umgewandelt werden. Diese Transformation wird allerdings auch durch die Aktivität der S1Pase mitreguliert, welche die Umwandlung von S1P in Sphingosin fördert. Zusätzlich zu dieser Reaktion wurde zum Abbau von S1P auch eine Umwandlung in Hexadecanal und Ethanolamin-Phosphat durch die S1P-Lyase postuliert (Stoffel and Assmann, 1970).

1.3.1.1 Der Sphingolipid-Rheostat

Entsprechend ihrer Hauptfunktion zur Regulation des PCD stellen Ceramide die am besten untersuchte Sphingolipidart dar. Viele Studien belegen dabei, dass extrazelluläre Signale zu einer Induktion intrazellulärer Ceramidlevel führen können und so die Auslösung der Apoptose bewirken. Einige bekannte Stimuli des PCD durch Ceramide sind unter anderem ionisierende Strahlung, oxidativer Stress, die Einwirkung von Vitamin D3, Daunorubicin, $TNF\alpha$ oder auch Zytokine und die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) (Gulbins and Li, 2006; Mathias et al., 1998). Die erhöhten Ceramidspiegel in der Zelle können dabei entweder auf eine gesteigerte de novo Synthese des Lipidmediators, vermittelt durch die Serinpalmitoyltransferase und die Ceramidsynthase, oder auch auf einige andere Mechanismen, wie die Hydrolyse von Sphingomyelin oder auch eine Hemmung der Ceramidhydrolyse, zurückgeführt werden (Lucci et al., 1999). Eine weitere Möglichkeit zur Beeinflussung intrazellulärer Ceramidspiegel besteht in dem verstärkten Abbau der Ceramide durch Ceramidasen zu Sphingosin (Nikolova-Karakashian and Merrill, 2000). Zum aktuellen Zeitpunkt konnten fünf verschiedene Subtypen von Ceramidasen identifiziert werden, welche nach dem für ihre Funktion optimalen pH benannt wurden. Sphingosin ist ebenso wie Ceramid an der Regulation der Apoptose beteiligt und als Inhibitor des Zellwachstums bekannt (Menaldino et al., 2003). Zusätzlich zeigte sich, dass zwischen Ceramid und Sphingosin ein enzymreguliertes Gleichgewicht herrscht, welches durch äußere Faktoren beeinflusst werden kann. Eine genaue Charakterisierung dieses Gleichgewichts stellte zudem heraus, dass Sphingosin auch ohne eine vorherige Umwandlung zu Ceramid zur Auslösung des PCD befähigt ist (Ohta et al., 1995). Ob dabei Sphingosin ohne die Aktivierung weiterer pro-apoptotischer Signalwege zur Auslösung des PCD befähigt ist, ist allerdings noch unklar. In diesem Zusammenhang wird eine Aktivierung der Proteinkinase C als Teil des apoptotischen Signalmechanismus zur Auslösung des PCD diskutiert (Mao and

Obeid, 2008). Neben seiner Eigenschaft als Apoptose-auslösendes Lipid, spielt Sphingosin eine wichtige Rolle als Edukt zur Synthese des Lipidmediators S1P, welcher nachgewiesenermaßen zytoprotektive Eigenschaften vermitteln kann.

Die Regulation des Sphingolipid-Rheostats trägt also essentiell zur Entscheidung über Leben und Tod einer Zelle bei.

1.3.1.2 Sphingosinkinasen

Während erhöhte Sphingosinspiegel in der Zelle eng mit der Auslösung der Apoptose verbunden sind, ist eine Reduktion der intrazellulären Sphingosinspiegel hingegen eng mit dem Überleben der Zelle verbunden (Maceyka et al., 2002; Maceyka et al., 2005). Vor diesem Hintergrund gelang es, aus der Klasse der Lipidkinasen die zwei Isoenzyme der Sphingosinkinase (SphK), SphK1 und SphK2 zu identifizieren (Maceyka et al., 2005). Sie bewirken eine Phosphorylierung des Sphingosins an der primären OH-Funktion und generieren so den Lipidmediator S1P. Obwohl die beiden Isoenzyme ein und dieselbe Reaktion innerhalb der Zelle katalysieren, vermitteln sie doch verschiedene Wirkungen im Bereich der Zellphysiologie (Maceyka et al., 2005). Dies kann einerseits durch eine unterschiedliche Kinetik oder auch aufgrund ihrer verschiedenen Expression als Antwort auf diverse Stimuli begründet sein. Zusätzlich spielt die Lokalisation der beiden Isoenzyme eine Rolle. Während die SphK1 vorwiegend in Lunge, Milz und Blut exprimiert wird, konnte die SphK2 bevorzugt in Herz, Gehirn und Leber gefunden werden (Alemany et al., 2007).

Eine Aktivierung der SphK1 resultiert in der Bildung des Lipidmediators S1P, welcher eng mit der Induktion zytoprotektiver Signalwege verbunden ist. Dieser Prozess konnte auf die Beteiligung diverser Wachstumsfaktoren und Überlebenssignale zurück geführt werden (Meyer zu Heringdorf et al., 2001; Olivera and Spiegel, 1993; Young et al., 2000).

Im Gegensatz zu ihrer Schwesterkinase ist die SphK2 weitaus weniger gut untersucht worden. Jüngste Erkenntnisse weisen allerdings auf eine Beteiligung der SphK2 an der Regulation von S1P-abhängigen Prozessen im Nukleus hin. Vor diesem Hintergrund gelang es Hait et al. zu zeigen, dass im Zellkern durch die SphK2 gebildetes S1P zur Regulation der Histondeacetylase beitragen kann (Hait et al., 2009). Weiterhin konnte die Induktion der SphK2 in der Zelle nicht zu einem

erhöhten Schutz vor Apoptose beitragen, sondern resultierte ganz im Gegenteil meist in der Auslösung des PCD (Maceyka et al., 2005).

1.3.1.3 S1P-Rezeptoren und das „Inside-Out“-Signalverhalten von S1P

Noch zu Beginn der Charakterisierung der mannigfaltigen Wirkungen von S1P glaubte man, der Lipidmediator vermittele seine Effekte über intrazelluläre Signalwege (Zhang et al., 1991). Heute jedoch, über 25 Jahre später, geht man davon aus, dass das Sphingolipid S1P sowohl intra- als auch extrazellulär die Physiologie der Zelle beeinflussen kann. Vor diesem Hintergrund konnte gezeigt werden, dass S1P zu einer Aktivierung extrazellulär lokalisierter GPCR führen kann. Diese wurden zunächst auch als Edg-Rezeptoren (endothel differentiation gene) bezeichnet (Takabe et al., 2008). Der im Jahre 1990 zugeteilte Name geht auf die Eigenschaft des ersten Vertreters der Edg-Rezeptorfamilie, Edg1, zurück, den Differenzierungsprozess von Endothelzellen zu induzieren (Hla and Maciag, 1990). Die Bezeichnung Edg trifft dabei aber nur auf den ersten Vertreter dieser Rezeptorgruppe zu und hat keine Bedeutung für die Funktion der anderen sogenannten Edg-Rezeptoren. Ein Zusammenhang zwischen der Funktion oder einem gemeinsamen Liganden der Edg-Rezeptoren konnte erst viel später nachgewiesen werden, als S1P als hochaffiner Ligand für den Edg1-Rezeptoren identifiziert werden konnte (Lee et al., 1998). Nach den aktuellen Empfehlungen der International Union of Pharmacology (IUPHAR) wird ein Rezeptor stets nach dem Liganden mit der höchsten Affinität benannt. So erfolgte schließlich die Umbenennung der ehemaligen Edg-Rezeptoren nach ihrem Liganden S1P in der Reihenfolge ihrer Entdeckung: S1P₁ (Edg1), S1P₂ (Edg5), S1P₃ (Edg3), S1P₄ (Edg6), S1P₅ (Edg8) (Radeff-Huang et al., 2004). Zusätzlich wurden außer den bereits genannten Rezeptoren noch drei weitere Edg-Rezeptoren entdeckt, bei deren Hauptliganden es sich allerdings um Lysophosphatidsäure (LPA) handelt und welche folglich den Namen LPA-Rezeptoren tragen.

Bisher sind fünf ubiquitär aber in Abhängigkeit vom Zelltyp verschieden stark exprimierte Rezeptorsubtypen, namentlich S1P₁₋₅, bekannt, welche nach Interaktion mit spezifischen G-Proteinen zur Vermittlung intrazellulärer Signale führen (Spiegel and Milstien, 2002). Zusätzlich zu den „klassischen“ S1P-Rezeptoren sind noch drei weitere GPCR bekannt, welche zwar auch durch S1P aktivierbar sind, allerdings nur

eine 40%ige Homologie zu den S1P-Rezeptoren aufweisen. Es konnte dabei festgestellt werden, dass diese Rezeptoren, GPR3, GPR6 und GPR12, zur Regulation der intrazellulären Calciumfreisetzung befähigt sind (Uhlenbrock et al., 2002).

Die verschiedenen S1P-Rezeptoren werden unterschiedlich stark in den einzelnen Geweben exprimiert. Während die S1P-Rezeptorsubtypen S1P₁₋₃ ubiquitär vorkommen, wird der S1P₄ nur in hämatopoetischen Geweben, sowie auf Zellen des Immunsystems exprimiert. Der S1P₅ konnte vor allem in Gehirn und Milz nachgewiesen werden (Anliker and Chun, 2004). S1P-Rezeptoren vermitteln ihre Wirkungen über die Aktivierung von G_i-, G_q- und/oder G_{12/13}- Proteinen. Dabei fällt auf, dass der S1P₁-Rezeptorsubtyp eine besondere Stellung unter den S1P-Rezeptoren einnimmt, da der S1P₁ anscheinend nur an inhibitorische G-Proteine gekoppelt ist. Dennoch vermittelt dieser Rezeptor wichtige Wirkungen, wie zum Beispiel die proliferationsbegünstigende Aktivierung der extrazellulär signal-regulierten Kinase (ERK) oder auch die anti-apoptotische Phosphorylierung von Akt, sowie die Rac-regulierte Migration von Zellen (Liu et al., 1999; Matloubian et al., 2004). Die Aktivierung des S1P₂-Rezeptorsubtyps hingegen beinhaltet die Vermittlung von Signalen über G_i-, G_q- und G_{12/13}-Proteine. Dabei kommt es unter anderem zur Induktion der Phospholipase C, einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration oder auch zur Aktivierung der ERK. Interessanterweise vermittelt der S1P₂ dem S1P₁ entgegengesetzte Wirkungen. So zeigte sich, dass die S1P₂-regulierte Aktivierung von Rho bzw. Hemmung von Rac mit einer verminderten Rate an migrierenden Zellen verbunden ist (Sugimoto et al., 2003). Ähnlich wie der S1P₂ vermittelt der S1P₃-Rezeptorsubtyp einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, die Induktion von Rho und Rac oder auch die Aktivierung der Phospholipase C (PLC), Akt und der NO-Synthase über G_i-, G_q- und G_{12/13}-Proteine (Nofer et al., 2004). Vor diesem Hintergrund kommt dem S1P₃ eine wichtige Bedeutung für die Vermittlung anti-apoptotischer Wirkungen zu. Allerdings konnte zusätzlich in Abhängigkeit vom jeweiligen Zelltyp eine gemeinsame Beteiligung des S1P₂ und des S1P₃-Rezeptorsubtyps im Bereich der Zytoprotektion beobachtet werden (Wendler and Rivkees, 2006). Über die S1P-Rezeptorsubtypen S1P₄ und S1P₅ ist jedoch weitaus weniger bekannt. Im Gegensatz zu den bisher erwähnten Rezeptoren erfolgt die Signaltransduktion beim S1P₄ lediglich über G_i- und G_{12/13}-Proteine und ermöglicht so physiologische Wirkungen wie die Aktivierung von ERK,

der PLC oder auch eines gesteigerten Calciuminfluxes in die Zelle (Graler et al., 2003; Inagaki et al., 2005; Van Brocklyn et al., 2000). Zudem konnte eine Bedeutung des S1P₄ für das Zellwachstum und die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen herausgestellt werden (Wang et al., 2005). Eine Analyse der Wirkungen des S1P₅-Rezeptorsubtyps, welcher genau wie der S1P₄, an G_i- und G_{12/13}-Proteine koppelt, zeigte hingegen eine stete Hemmung der ERK und eine Aktivierung des zytoprotektiven Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweges (Jaillard et al., 2005). Aus den bisherigen Findungen geht hervor, dass S1P in Bezug auf seine Wirkungen einen funktionellen Synergismus oder auch Antagonismus in Abhängigkeit des jeweils beteiligten Rezeptorsubtyps aufweist: Während der S1P₁ durch eine Induktion von Rac die Migration von Zellen bewirken kann, resultiert die Aktivierung des S1P₂ in einer Hemmung von Rac, verbunden mit einer verminderten Rate an migrierenden Zellen. Ebenso konnte ein funktioneller Antagonismus zwischen dem S1P₅ und anderen S1P-Rezeptoren in Bezug auf die Regulation der Proliferation gefunden werden. Insgesamt geht aus der vorliegenden Literatur hervor, dass S1P über eine Aktivierung seiner fünf verschiedenen Rezeptoren vielfältige Wirkungen in der Zelle vermitteln kann. Darüber hinaus konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass auch die Regulation der Apoptose durch den Lipidmediator ein rezeptorvermittelter Prozess ist und zelltypspezifisch unterschiedlich ausgeprägt sein kann.

Neben der extrazellulären, rezeptorvermittelten Regulation physiologischer Wirkungen gelang es aber, auch intrazelluläre Wirkungen des S1P ohne vorherige Beteiligung von S1P-Rezeptoren zu identifizieren. So konnten die Mobilisierung von Calcium oder auch die Regulation von Proliferation und Apoptose durch intrazellulär agierendes S1P beobachtet werden (Spiegel and Milstien, 2000). Zusätzlich gibt es einige Hinweise darauf, dass S1P auch von Zellen auf autokrine oder parakrine Weise in den Extrazellularraum sekretiert werden kann, wo es anschließend zur Mediation extrazellulärer Wirkungen kommt. Dieses sogenannte „Inside-Out“-Signalverhalten des S1P konnte bisher unter anderem am migratorischen Verhalten von Fibroblasten in Gegenwart von Platelet-derived growth factor (PDGF) und an der chemotaktischen Anziehung von Mastzellen gegenüber Antigenen belegt werden (Hobson et al., 2001; Jolly et al., 2004). Eine genauere Analyse des Mechanismus ergab, dass PDGF nicht nur zu einer Induktion der SphK1 und der daraus resultierenden Steigerung der intrazellulären S1P-Bildung führte, sondern auch über

eine Aktivierung des extrazellulären S1P₁-Rezeptors eine vermehrte Migration von Fibroblasten bewirkte (Hobson et al., 2001; Rosenfeldt et al., 2001). Neben dieser Beobachtung fällt ins Auge, dass die S1P-Spiegel im Blut und in Körperflüssigkeiten im Vergleich zur Konzentration von S1P im Gewebe sehr hoch sind, und dass die Existenz eines Mechanismus zum Austausch von S1P zwischen Blut/Körperflüssigkeit und dem jeweiligen Gewebe daher als gesichert gilt. In diesem Zusammenhang konnten bereits einige Blutzellen, wie Erythrozyten, Thrombozyten, neutrophile Granulozyten, und mononukleäre Zellen sowie auch Astrozyten als S1P-freisetzende Zellen identifiziert werden (Kim et al., 2009). Ursprünglich ging man davon aus, dass die beteiligten Zellen selbst mittels Sekretion von S1P am Export des Lysophospholipids beteiligt sein könnten. Da der Lipidmediator S1P aber eine polare Kopfgruppe aufweist, erscheint eine Passage des Sphingolipids durch die hydrophobe Zellmembran ohne Beteiligung eines Transportmechanismus unwahrscheinlich. Obwohl der Mechanismus zur Freisetzung von S1P aus Zellen bisher nicht vollständig aufgeklärt werden konnte, geben einige Studien Hinweise auf die Beteiligung von „ATP-binding cassette“ (ABC)-Transportern am „Inside-Out“-Signalverhalten des Lipidmediators (Kobayashi et al., 2009; Lee et al., 2007; Mitra et al., 2006; Sato et al., 2007). Die angeführten Studien waren zunächst auf die Untersuchung des Phänomens der Resistenzentwicklung von Zellen gegenüber Chemotherapeutika, auch multidrug resistance (MDR) genannt, ausgelegt, ergaben aber gleichzeitig einige wegweisende Ergebnisse zur Aufklärung des Mechanismus der S1P-Freisetzung aus Zellen. So identifizierten die Forscher neben einigen amphiphilen Arzneistoffen auch ABC-Transporter als entscheidende Strukturen zum Transport von Lipiden aus dem Zellinneren an die äußere Seite der Zellmembran (van Meer and Lisman, 2002).

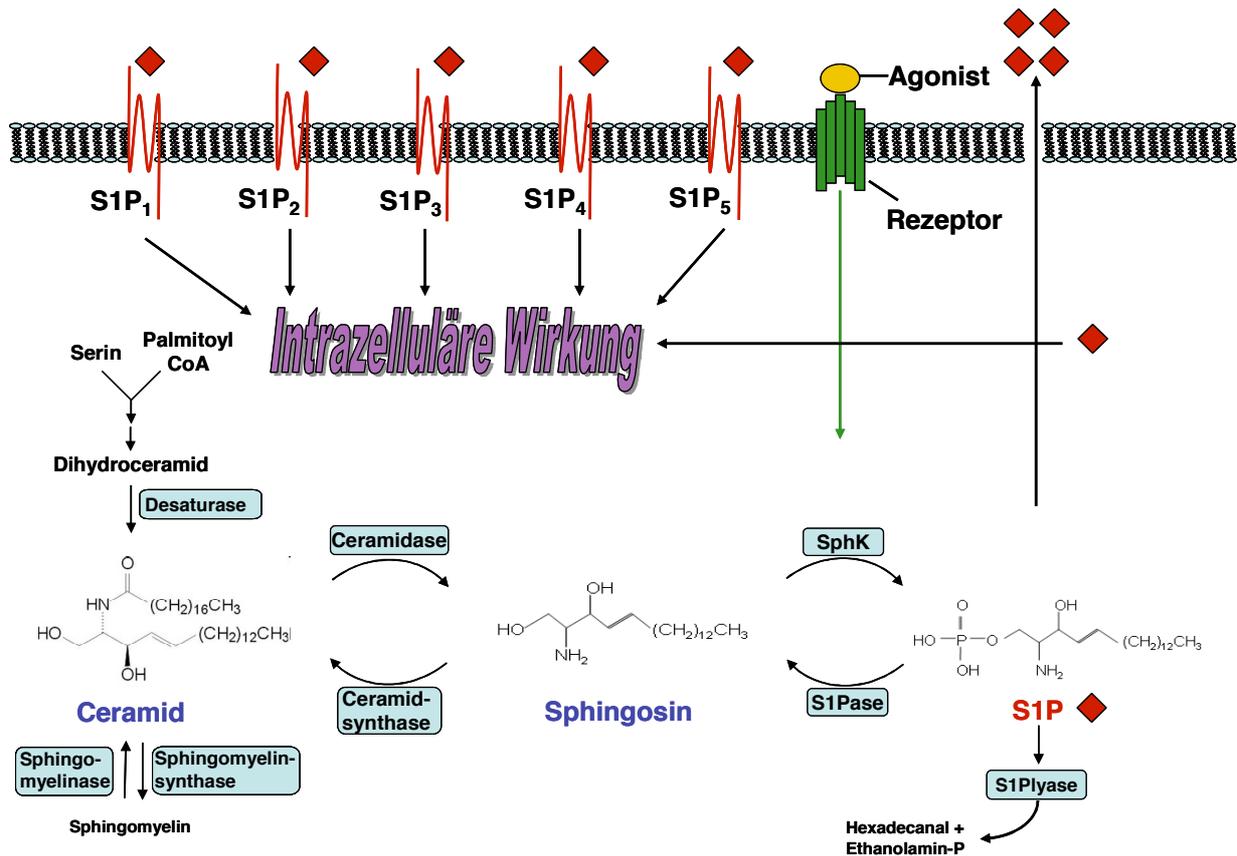


Abb. 3: Synthese und Wirkungen des Lipidmediators S1P. Die Synthese der Sphingolipide kann auf die Kondensation von Serin und Palmitoyl-CoA zurückgeführt werden. In weiteren Schritten kommt es unter Beteiligung mehrerer Enzyme, unter anderem der Desaturase, zur Bildung von Ceramid. Dieses steht einerseits mit den Enzymen Sphingomyelinsynthase und Sphingomyelinase im Gleichgewicht. Andererseits können Ceramide über die Ceramidase zu Sphingosin (Rückreaktion über Ceramidsynthase und weiter noch über die SphK zu S1P (Rückreaktion über die S1Pase) umgewandelt werden. Der Lipidmediator S1P kann nun entweder durch die S1Plyase abgebaut werden, oder fungiert als intrazellulärer oder extrazellulärer Mediator verschiedener Wirkungen. Die extrazellulären Funktionen können durch den Export von S1P aus der Zelle und die anschließende Aktivierung von bisher 5 bekannten S1P-Rezeptoren vermittelt werden.

1.3.2 ABC-Transporter

Diese Superfamilie der ABC-Transporter repräsentiert eine Gruppe von integralen Membranproteinen, welche aktiv diverse Substrate über die Lipiddoppelschicht der Plasmamembran oder die Membran von Zellorganellen hinwegtransportieren können und somit an vielen Prozessen der Zelle beteiligt sind (Higgins, 1992). Ein funktionelles Charakteristikum besteht dabei darin, dass die transmembranäre Bewegung von Molekülen durch ABC-Transporter nicht nur an die Hydrolyse von ATP gekoppelt ist, sondern sowohl einwärts- als auch auswärtsgerichtet stattfinden kann (Holland and Blight, 1999). Als mögliche Zielstrukturen für ABC-Transporter konnte eine Vielzahl von Molekülen mit sehr variablem chemischem Aufbau identifiziert werden. Zu den bekanntesten Substraten für den transmembranären

Transport durch ABC-Transporter gehören dabei anorganische Ionen, organische Bestandteile von Zellen, Glutathion, Gallensäuren, einige Lipide und auch Proteine (Holland and Blight, 1999). Allerdings zählen auch viele Arzneistoffe und neuerdings auch S1P zu den Targets von ABC-Transportern (Kobayashi et al., 2009; Linnet and Ejsing, 2008).

ABC-Transporter bestehen im Allgemeinen aus zwei transmembranären Domänen. Im Detail konnten mehrere α -helikäre Strukturen und zwei zytoplasmatische, nukleotidbindende Untereinheiten zur Hydrolyse von ATP (der „ATP-Bindungskassette“) identifiziert werden (Biemans-Oldehinkel et al., 2006). Sobald die Verankerung des Substrates an die transmembranären Domänen erfolgt ist, kommt es in einem zweistufigen Prozess zunächst durch die Aktivierung der nukleotidbindenden Domänen zur Rekrutierung und Spaltung der ersten ATP-Einheit. Damit ist gleichzeitig eine Konformationsänderung des Transporters verbunden, welcher durch die Bildung einer Pore die Freisetzung des Substrates in den Extrazellularraum bzw. an die äußere Seite der Membran mit anschließender Diffusion des Substrates in das Medium, bewirkt (Biemans-Oldehinkel et al., 2006). Folglich kommt es zur Hydrolyse eines zweiten Moleküls ATP, welches die Reorganisation des Transporters in seinen Ausgangszustand bewirkt und so die Bindung eines weiteren Substrates ermöglicht (Sauna and Ambudkar, 2000).

Insgesamt unterscheidet man zur Zeit sieben verschiedene Subgruppen der ABC-Transporter-Superfamilie, welche alphabetisch von ABCA bis ABCG eingeteilt werden (Dean et al., 2001). Davon konnten bisher lediglich Vertreter der Subfamilien ABCA, ABCB und ABCC für den Export von Phospholipiden (ABCB1), Phosphatidylcholin (ABCB4) und einigen Analoga von Glucosylceramid und Sphingomyelin (ABCC1) identifiziert werden (Raggers et al., 1999; van Helvoort et al., 1996). Einige weiterführende Untersuchungen in Bezug auf den Lipidmediator S1P ergaben dabei vorwiegend eine Beteiligung der Transporter ABCA1 und ABCC1, jedoch kann gleichzeitig eine Beteiligung von weiteren ABC-Transportern am Export von S1P aus der Zelle nicht ausgeschlossen werden.

Der erste identifizierte ABC-Transporter, codiert durch das Gen ABCB1, war lange Zeit unter dem Namen „multidrug-resistance protein“ (MDR)-1 oder auch dem Synonym P-Glykoprotein (PGP) bekannt. Diese Bezeichnungen werden der Eigenschaft einiger ABC-Transporter geschuldet, an der Entwicklung von Resistenzen gegenüber Zytostatika, MDR, beteiligt zu sein (Kartner et al., 1985).

Mittlerweile konnten die Mechanismen, welche zur Entstehung einer MDR, beitragen benannt werden. Zu ihnen zählen einerseits eine verminderte Aufnahme des Therapeutikums in die Zellen, die Induktion von DNA-Reparaturmechanismen, die Aktivierung detoxifizierender Systeme, eine Reduzierung der pro-apoptotischen Signale in der Zelle und auch der verstärkte Efflux der Chemotherapeutika aus der Zelle in den Extrazellularraum unter Einwirkung von ABC-Transportern. In diesem Zusammenhang konnte beschrieben werden, dass die Überexprimierung spezifischer ABC-Transporter eng mit erniedrigten Spiegeln des Chemotherapeutikums und somit auch mit einem verminderten Therapieerfolg verbunden ist (Gottesman et al., 2002). Interessanterweise kann die Entwicklung einer MDR allerdings auch mit einem veränderten Gleichgewicht der Lysophospholipide Ceramid, Sphingosin und S1P in der Zelle verbunden sein: Hier konnten verminderte Ceramidspiegel und eine verstärkte Bildung des Lipidmediators S1P identifiziert werden (Saddoughi et al., 2008). Zusätzlich konnte etabliert werden, dass die Ausbildung der MDR in einigen Brustkrebszelllinien einerseits eng mit der Umformung von Ceramid zu Glykosylceramiden aber gleichzeitig auch mit einer erhöhten Aktivität des ABCB1 verbunden ist (Gouaze-Andersson et al., 2007). Vor diesem Hintergrund ist es von besonderem Interesse die Rolle der ABC-Transporter im Zusammenspiel mit bioaktiven Phospholipiden wie S1P zu charakterisieren und so mögliche Targets für die Entwicklung neuer Arzneistoffe oder auch für die Reduktion von Resistenzen zu identifizieren.

1.3.3 Der PI3K/Akt-Signalweg

1.3.3.1 Die Lipidkinase Akt

Der PI3K/Akt-Signalweg spielt eine wichtige Rolle, wenn es um die Regulation der Proliferation und die Steuerung der Apoptose geht. Darüber hinaus konnte bisher gut etabliert werden, dass dieser für Mutationen sehr anfällige Signalweg häufig auch an einer Fehlsteuerung des Apoptoseprogramms einer Zelle beteiligt ist und somit zur Entstehung von Tumorerkrankungen beitragen kann (Hennessey et al., 2005).

Zur Familie der PI3K gehören viele Lipidkinasen und auch Serin/Threoninkinasen, welche mitunter eine große Anzahl von Phosphatidylinositolkinasen beinhaltet. Diese ermöglichen die Phosphorylierung der 3'-OH-Funktion des Inositolrings von

Inositolphospholipiden in der Zelle (Fruman et al., 1998). Die Familie der PI3K kann man dabei in drei verschiedene Klassen einteilen. Die Klasse IA der PI3K ist dabei am besten untersucht worden und besteht aus der katalytischen Untereinheit p110, sowie der inhibitorisch-regulatorischen Untereinheit p85 (Pene et al., 2002). Nach der Bindung und gleichzeitigen Aktivierung von p85 durch eine Vielzahl von Proteinen, unter ihnen Rezeptortyrosinkinasen, oder auch intrazelluläre Proteine wie die Proteinkinase C, Rac und Rho, kommt es zur Aktivierung von p110 und der anschließenden Weiterleitung des Signals (Wymann and Pirola, 1998). Obwohl beide Subgruppen der Klasse I PI3K über eine intensive Proteinkinaseaktivität verfügen, unterscheidet sich die Klasse IB der PI3K von der Klasse IA durch eine variable Zusammensetzung der funktionellen Untereinheiten (p110G als katalytische Untereinheit und p101 als regulatorische Subform), welche sich auch in Bezug auf die identifizierten Aktivatoren dieser Klasse von PI3K auswirkt. Die Klasse IB der PI3K kann nämlich im Gegensatz zu ihren Schwesterkinasen direkt durch GPCR oder auch indirekt durch einige andere Rezeptoren aktiviert werden (Kok et al., 2009). Außerdem existieren noch zwei weitere Ausprägungen von PI3K, die monomeren Klasse II PI3K und die heterodimeren Klasse III PI3K, welchen allerdings eine weniger bedeutende Rolle in der Regulation von physiologischen Prozessen innerhalb der Zelle zukommen (Oudit et al., 2004).

Im Falle der Aktivierung einer PI3K kommt es zur Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), sodass Phosphatidyl-3,4,5-Triphosphat (PIP₃) gebildet wird. PIP₃ agiert innerhalb der Zelle als second messenger, welcher bevorzugt an Pleckstrin-Homologie (PH)-Domänen und an einige andere lipidbindende Domänen von Targets des PI3K/Akt-Signalwegs bindet (Fruman et al., 1998). Die PH-Domäne stellt dabei den bevorzugten Bindungspartner von PIP₃ dar, obwohl nur eine kleine Untereinheit der PH-Domäne erkannt wird. Als mögliche Zielproteine von PIP₃ kann es sich um Proteinkinasen, wie Akt oder auch um Adapterproteine und Regulatoren von kleinen GTPasen, welchen beispielsweise die Kontrolle über Zellwachstum, Proliferation und Migration obliegt, handeln. Anschließend erfolgt die Translokation des Zielproteins an die Membran (Carnero et al., 2008; Vanhaesebroeck et al., 2001; Wymann et al., 2003). Einige detaillierte, genetische Screenings in Modellorganismen identifizierten dabei die Serin/Threoninkinase Akt als den vorherrschenden Mediator von Funktionen, welche auf eine PI3K-Tätigkeit zurückgeführt werden können (Hennessey et al., 2005).

1.3.3.2 Die Serin/Threoninkinase Akt

Auch bekannt als Proteinkinase B, besitzt die Akt-Kinase eine herausragende Stellung für die Regulation von vielen physiologischen Prozessen, wie zum Beispiel dem Metabolismus, dem Fortschreiten des Zellzyklus und der Migration (New et al., 2007). Neben ihrer Eigenschaft, die Transkription von Proteinen zu beeinflussen, kommt der Akt-Kinase auch eine wichtige Bedeutung im Bereich der Regulation von Proliferation und Apoptose zu. Eine Aktivierung von Akt konnte nämlich mit einem verstärkten Zellwachstum und dem verstärkten Schutz von Zellen vor dem PCD in Verbindung gebracht werden. In diesem Zusammenhang zeigte sich aber auch, dass eine Überexprimierung von Akt als Mediator von Zellwachstum und Zytoprotektion mit an der Entstehung von Tumorerkrankungen beteiligt sein kann. Daher ist es von Bedeutung, die genauen Signalwege an denen Akt beteiligt ist, zu hinterfragen.

Die Serin-/Threoninkinase Akt wird der „AGC“-Superfamilie von Proteinkinasen zugeordnet. Diesen Kinasen ist gemeinsam, dass sie alle über eine strukturell sehr ähnliche katalytische Domäne verfügen. Die genaue Analyse der Akt-Kinase ergab, dass es sich hierbei um eine Gruppe von drei gleichwertigen Isoenzymen, Akt1, Akt2, und Akt3 (gleichzusetzen mit PKB α , PKB β und PKB γ) handelt. Strukturell gesehen verfügen die Isoenzyme neben einer N-terminalen PH-Domäne, zusätzlich noch über eine zentrale katalytische Domäne, sowie ein hydrophobes Motiv am C-Terminus (Scheid and Woodgett, 2003). Weiterhin weist die Akt-Kinase zwei Kinasedomänen im C-terminalen Bereich des Moleküls auf. Die hochaffine Interaktion der PH-Domäne mit PIP3 und einigen anderen Reaktionsfaktoren ermöglicht die Translokation von Akt an die Zytoplasmamembran (Alessi et al., 1997). Hier erfolgt eine Konformationsänderung des Moleküls, welche die Phosphorylierung zweier entscheidender Aminosäuren bewirkt. Dieser Schritt ist auch mit einer Aktivierung von Akt gleich zu setzen (phosphoryliertes Akt, P-Akt). Bei der ersten Aminosäure handelt es sich um Threonin³⁰⁸, welches durch die konstitutiv aktive phosphoinositide dependent Kinase (PDK) 1 phosphoryliert wird. Für die vollständige Aktivierung von Akt durch Phosphorylierung der zweiten Aminosäure, Serin⁴⁷³, ist die Funktion eines weiteren Enzyms, der PDK 2 erforderlich (Fayard et al., 2005). Die genannten Prozesse ermöglichen die Regulation der Aktivität der Akt-Kinase innerhalb der Zelle. Dieser Vorgang wird zusätzlich durch weitere zell- und stimuluspezifische Kinasen unterstützt und resultiert in der Stabilisierung von P-Akt, das nun zur Regulation spezifischer Zielproteine in den Nucleus verlagert wird (New et al., 2007).

Wie die aktuelle Literatur belegt, handelt es sich bei der PI3K um den wohl häufigsten Aktivator der Akt-Kinase. Allerdings gelang es bisher auch PI3K-unabhängige Signalwege zu identifizieren, welche zur Aktivierung von Akt beitragen. In diesem Zusammenhang konnte eine Induktion der Akt-Kinase durch die Proteinkinase A, einige Hitzeschockproteine oder auch der Calcium/Calmodulin-abhängigen Kinase identifiziert werden (Filippa et al., 1999; Konishi et al., 1997; Perez-Garcia et al., 2004).

1.4 Zielstellung

GC gehören aufgrund ihrer starken anti-inflammatorischen und immunsuppressiven Eigenschaften zu den am häufigsten eingesetzten Arzneistoffen in der Therapie von entzündlichen Erkrankungen. Darüber hinaus zeigte sich, dass GC auch ein bisher nicht vollständig aufgeklärtes Potenzial als Antiemetika in der Begleittherapie von Tumorerkrankungen haben. Daher werden GC zum aktuellen Zeitpunkt sowohl topisch als auch systemisch sehr häufig eingesetzt. Allerdings ist die Anwendung von GC durch die Entwicklung einiger teilweise therapielimitierender Nebenwirkungen meist zeitlich begrenzt und kann sogar auch mit der Begünstigung der Entstehung von Tumorerkrankungen und der Resistenz gegen Chemotherapeutika verbunden sein.

Bei der Entwicklung von Resistenzen und auch Nebenwirkungen durch GC konnte nachgewiesen werden, dass Dex in Abhängigkeit vom Zelltyp sowohl zur Auslösung des PCD, als auch zur Mediation zytoprotektiver Reaktionen befähigt ist. Diese Beobachtung zeigte sich auch bei der Untersuchung des Apoptoseverhaltens der Haut in Gegenwart von GC. Im Detail konnte eine pro-apoptotische Wirkung von Dex auf Keratinozyten beobachtet werden, wohingegen die Inkubation mit dem GC in Fibroblasten den Zellen eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegen apoptotische Signale ermöglichte. Diese Wirkung von Dex konnte dabei erstmalig auf die Beteiligung des zytoprotektiven Lipidmediators S1P zurückgeführt werden. Das Phänomen, dass GC in Abhängigkeit vom Zelltyp sowohl zur Induktion des PCD, als auch zu Vermittlung anti-apoptotischer Eigenschaften beitragen können, kann zur Zeit nicht vollständig erklärt werden. Allerdings kommt diesem Sachverhalt bei der Entwicklung von Resistenzen gegen Chemotherapeutika Bedeutung zu.

Vor diesem Hintergrund war es von besonderem Interesse die detaillierten Signalwege, welche am anti-apoptotischen Effekt von Dex in humanen Fibroblasten

beteiligt sind, zu charakterisieren. Da die Wirkung von Dex mit erhöhten intrazellulären Spiegeln des Lipidmediators S1P in Fibroblasten verbunden ist, sollte in einem ersten Schritt die Beeinflussung des Gleichgewichts der Sphingolipide Ceramid, Sphingosin und S1P auch im Hinblick auf die SphK untersucht werden. Zudem konnte etabliert werden, dass S1P seine Wirkungen über membranständige S1P-Rezeptoren vermittelt. Die Wege, über welche intrazellulär gebildetes S1P allerdings die Aktivierung von extrazellulären Rezeptoren bewirken kann, sind allerdings noch wenig untersucht und werden meist auf die Beteiligung von ABC-Transportern zurück geführt. Daher folgte eine Analyse des Exportmechanismus von S1P und der Beteiligung von S1P-Rezeptoren am anti-apoptotischen Effekt von Dex in humanen Fibroblasten. Darüber hinaus war es von Interesse, sich gegebenenfalls anschließende intrazelluläre Signalwege, welche am zytoprotektivem Effekt von Dex in humanen Fibroblasten beteiligt sein könnten, zu analysieren.

Das Promotionsvorhaben lässt sich dabei in folgende Teilabschnitte gliedern:

- Analyse einer möglichen Regulation des Sphingolipid-Rheostats und der SphK1 in humanen Fibroblasten durch Dex
- Charakterisierung des Exportmechanismus von S1P in humanen Fibroblasten
- Identifizierung von S1P-Rezeptoren als mögliche Mediatoren der Dex-induzierten Hemmung des PCD
- Charakterisierung weiterer am anti-apoptotischen Effekt beteiligten intrazellulären Signalwege
- Untersuchung einer Beteiligung von Proteinen der Bcl-2-Familie am anti-apoptotischen Effekt von Dex
- Analyse der Bedeutung von Caspasen für den anti-apoptotischen Effekt von Dex

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Analysenwaage AK 160	Mettler-Toledo, Gießen
Autoklav	Guwina-Hofmann, Berlin
BioDoc Analyze [®]	Whatman, Biometra, Göttingen
Brutschrank BB6220	Heraeus Instruments, Düsseldorf
Elektrophoresekammern	Biometra, Göttingen
ELISA-Reader	Merlin, Bornheim
Entwicklungskassette	Kodak, München
FACS-Calibur (Fluorescence Activated Cell Sorting)	Becton & Dickinson, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop Keyence BZ8000	Keyence, Neu-Isenburg
Lamin Air-Sterilarbeitsbank	Heraeus Instruments, Düsseldorf
LC/ESI-oTOF-MS	Agilent Technologies, Waldborn
LightCycler 480 [®]	Roche Diagnostics, Mannheim
Magnetrührer IKAMAG [®] RCT	Janke & Kunkel, Staufen Merck
Hitachi LaChrom HPLC System	Merck Hitachi, Darmstadt
Mikroplattenreader FLUOstar OPTIMA [®]	BMG, Offenburg
Neubauer-Zählkammer	Zeiss, Jena
pH Meter 766 Calimatec	Knick, Nürnberg
Phasenkontrast-Mikroskop	Zeiss, Jena
Pipetten Eppendorf Reference [®]	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipettboy [®]	Eppendorf, Hamburg
Schüttelmaschine LS10	Gerhardt, Bonn
Schüttler IKA MT-2	Karow, Berlin
Speed [®] Vac plus SC110A	Savant
Spektralphotometer, Gene-Ray	Biometra, Göttingen
Standard Power Pack	Biometra Göttingen
Tank-Blot	Biometra, Göttingen
Thermoblock TB 1	Biometra, Göttingen
Ultraschallbad Sonorex [®] RK 100	Bandelin, Berlin
Vortex	Heidolph, Schwabach

Wasserbad DC3/W26	Haake, Karlsruhe
Wasser Deionisierungsanlage MiliQ	Milipore, Eschborn
Zentrifuge Eppendorf 5415D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments, Düsseldorf

2.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

ABCC1 siRNA	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Acetonitril	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Acrylamid Rotiphorese [®] Gel 40	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Actinomycin D	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Ameisensäure	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Annexin V-FITC	Axxora, Lörrach
Anti-Human- β -Actin-Antikörper	Abcam, Cambridge
Anti-Human-ABCC1-Antikörper Klon MRPm6 monoklonal, zur Immunofluoreszenzanalytik	Abcam, Cambridge
Anti-Human-ABCC1-Antikörper Klon IU2H10 monoklonal zur Proteinanalytik	Abcam, Cambridge
Anti-Human-Bcl _{xL} -Antikörper	New England Biolabs, Frankfurt
Anti-Human-P-Akt-Antikörper	New England Biolabs, Frankfurt
Anti-Human-S1P ₃ -Antikörper, polyklonal	Dianova, Hamburg
Anti-Human-SphK1-Antikörper, polyklonal	Abcam, Cambridge
ApoONE [®] homogenous Caspase 3/7 Assay	Promega, Mannheim
Aprotinin	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Borsäure	VWR, Darmstadt
Bradford Reagenz	Biometra, Göttingen
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Caspase-3 Intracellular Activity Assay Kit I	Merck, Darmstadt
Chloroform	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Coomassieblau (Serva Blue G)	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Cy2-gekoppelter Anti-Maus-IgG-Antikörper	Dianova, Hamburg
Deckgläschen, Durchmesser 18mm	Roth, Karlsruhe

Desoxycholinsäure	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Dexamethason	Sigma Aldrich, Schnelldorf
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Dihydro-S1P	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Dihydro-Sphingosine	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	VWR, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	New England Biolabs, Frankfurt
DNA Größenmarker	New England Biolabs, Frankfurt
Dubleco`s modified Eagle`s medium	
High Glucose 4,5 g/l with L-Glutamine (DMEM)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Einfrierhilfe Mr. Frosty	VWR, Darmstadt
Einmalkanülen (0,8 / 80 mm)	VWR, Darmstadt
Einmalküvetten, reduziert	VWR, Darmstadt
Einmalspritzen (Braun Injekt 20 ml)	VWR, Darmstadt
Eppendorfgefäße Safe-Lock (0,5, 1,5, 2ml)	VWR, Darmstadt
Essigsäure, konzentriert	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Ethanol	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich, Schnelldorf
FACS Clean	Becton & Dickinson, Heidelberg
FACS Flow	Becton & Dickinson, Heidelberg
FACS Rinse	Becton & Dickinson, Heidelberg
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
Filme, Kodak X-Omat, XAR-5	Sigma Aldrich, Berlin
Filmentwickler	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Filmfixierer	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Filterpapiere	
Fluoromount [®]	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Formalin free fixative	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Fugene [®] HD Transfektionsreagenz	Roche Diagnostics, Mannheim
Glycerol	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Glycin	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Glycogen	Sigma Aldrich, Schnelldorf

HRP-gekoppelter Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper	Sigma Aldrich, Schnelldorf
HRP-gekoppelter Anti-Maus-IgG-Antikörper	Sigma Aldrich, Schnelldorf
HRP-gekoppelter Anti-Ziege-IgG-Antikörper	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure (HEPES)	Gibco BRL, Karlsruhe
Intracellular Activity Assay Kit I (PhiPhiLux G1D2)	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Kaliumacetat	GE Healthcare, Freiburg
Kaliumchlorid (KCl ₂)	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Kontroll siRNA B	Santa Cruz, Heidelberg
Kromasil [®] 100-5 RP C18-Säule	CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe
Leupeptin	Sigma Aldrich, Schnelldorf
LightCycler 480 [®] Multiwell Platte 96	Roche Diagnostics, ;Mannheim
LightCycler 480 [®] Sealing Foil	Roche Diagnostics, ;Mannheim
L-Glutamin	Sigma Aldrich, Schnelldorf
LumiGlo [®] Chemilumineszenz Reagenz LY294002	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Magermilchpulver Sucofin [®]	TSI, Zeven
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Methanol	Sigma Aldrich, Schnelldorf
MK571	Sigma Aldrich, Schnelldorf
N-TER [®] -Transfektionsreagenz	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Natriumfluorid	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Natriumorthovanadat (Na ₂ VO ₄)	Sigma Aldrich, Schnelldorf
N-(1-Naphthyl)ethyldiamin	Sigma Aldrich, Schnelldorf
N _ω -Nitro-L-argininmethylesterhydrochlorid (L-NAME)	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Nonidet P-40	Sigma Aldrich, Schnelldorf
N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin (TEMED)	Sigma Aldrich, Schnelldorf

Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Oligodesoxynukleotide (ODN)	TIB Molbiol, Berlin
Optimem	Biochrom, Berlin
Ortho-Phthalaldehyd	Sigma Aldrich, Schnelldorf
P-Akt siRNA	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Parafilm [®] M	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Penicillin	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Pepstatin	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Phosphatgepufferte Salzlösung. Ca ²⁺ , Mg ²⁺ -frei	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Phosphorsäure (H ₃ PO ₄), konzentriert	VWR, Darmstadt
Polyvinyliden-difluorid (PVDF)-Transfermembran	Milipore, Eschborn
Primer	TIB Molbiol, Berlin
Propidiumiodid (PI)	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Proteingrößenmarker	New England Biolabs, Frankfurt
QIAShredder [®]	Quiagen, Foster city, USA
Reagenzgläser Pyrex 16x100 mm mit Deckel	Dunn Laortechnik, Ansbach
RevertAid [™] First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon Roth
Rhodamin Red-X-gekoppelter Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper	Dianova, Hamburg
Rneasy Mini Kit [®]	Quiagen, Foster city, USA
RevertAid [™] First Strand cDNA synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Roth
RP C ₁₈ Nucleosil AB Säule	Machery-Nagel, Düren
Rundboden-Röhrchen, Falcon	VWR, Darmstadt
Salzsäure, konzentriert	VWR, Darmstadt
SB203580	Sigma Aldrich, Schnelldorf
3 x SDS-Probenpuffer	New England Biolabs, Frankfurt
SP600125	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Serumalbumin vom Rind, fettsäurefrei (BSA)	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Serva Blue G (Coomassieblau)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Silikonlösung in Isopropanol	Serva, heidelberg
siRNA-Transfektionsmedium	Santa Cruz, Heidelberg
siRNA-Transfektionsreagenz	Santa Cruz, Heidelberg

siRNA-Verdünnungspuffer	Santa Cruz, Heidelberg
Sphingosin	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Sphingosin-1-Phosphat	Biomol, Hamburg
SphK1 siRNA	Santa Cruz, Heidelberg
Sterilfilter Minisart 0,22 μm	Sartorius, Göttingen
Stickstoff, flüssig	Air Liquide, Berlin
Stickstoffgasflasche	Praxair, Berlin
Streptomycin	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Sulfanilamid	Sigma Aldrich, Schnelldorf
SYBR Green I Master Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
5,5,6,6-Tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanin-Iodid (JC-1)	Biomol, Hamburg
Trichloressigsäure	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Tris Base	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Tris HCl	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Trypsin	Biochrom, Berlin
Tumornekrosefaktor α (TNF α)	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Tween 20	Sigma Aldrich, Schnelldorf
UO126	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Verapamil	Sigma Aldrich, Schnelldorf
WinMDI2.8	FU-Berlin
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	VWR, Darmstadt
Zellkulturplatten 6-Loch, Flachboden, TPP	Biochrom, Berlin
Zellkulturplatten 24-Loch, Flachboden, Falcon	VWR, Darmstadt
Zellkulturschalen TPP, 5 und 10 cm	Biochrom, Berlin
Zellkulturschaber	Biochrom, Berlin
Zentrifugenröhrchen TPP (15 und 50 ml)	Biochrom, Berlin

2.1.3 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

2.1.3.1 Zusammensetzung der 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.

Trypsin-EDTA-Lösung

1,67 mg/ml	Trypsin
0,67 mg/ml	EDTA
gelöst in	PBS

Antibiotikallösung

100 U/ml	Penicillin
100 µg/ml	Streptomycin
gelöst in	PBS

Transportmedium

100 U/ml	Penicillin
100 µg/ml	Streptomycin
gelöst in	DMEM

Stoppmedium

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

Einfriermedium

10 %	DMSO
10 %	FKS
gelöst in	DMEM

2.1.3.2 Zusammensetzung der Kulturmedien

Fibroblastenwachstumsmedium

Humane Fibroblasten		Murine Fibroblasten	
7,5 %	FKS	10 %	FKS
1 %	Antibiotikallösung	1 %	Antibiotikallösung
gelöst in	DMEM	gelöst in	DMEM

Basalmedium

0 %	FKS
1 %	Antibiotikallösung
gelöst in	DMEM

Einfriermedium

10 %	FKS
1 %	Antibiotikallösung
10 %	DMSO
gelöst in	DMEM

2.1.3.3 Lösungen für die Durchflusszytometrie

Annexin-Bindungspuffer (pH 7,4)

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

Der Puffer wurde autoklaviert.

2.1.3.4 Lösungen für die Hochleistungsflüssigkeits-chromatographie (HPLC)

HPLC-Probenpuffer, pH 7,4

70mM	K ₂ HPO ₄
gelöst in	Aqua bidest.
gemischt mit Methanol im Verhältnis 4:1	

Derivatisierungsreagenz

5 mg	Ortho-Phthalaldehyd
100 µl	Ethanol
5 µl	Mercaptoethanol
4,9 ml	Borsäurereagenz

2.1.3.5 Lösungen zur Zellyse

RIPA-Puffer

50 mM	Tris/HCl, pH 7,5
150 mM	NaCl
1%	Nonidat P-40
0,5%	Desoxycholinsäure
0,1%	SDS
1 mM	EDTA
gelöst in	Ca ²⁺ - und Mg ²⁺ - freier PBS-Lösung

die folgenden Phosphatase- und Protease-Inhibitoren wurden zusätzlich hinzugefügt

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

2.1.3.6 Lösungen für die Proteinanalyse

Blockpuffer

5% Magermilchpulver Sucofin®
in TBST

Blotpuffer

14,4 mg/ml Glycin
3,02 mg/ml Tris HCl
in bidestilliertem Wasser

Bradford-Reagenz (5-fach konzentriert)

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

Laufpuffer (pH 8,3)

14,4 mg/ml Glycin
3,02 mg/ml Tris HCl
1 mg/ml SDS
in bidestilliertem Wasser

Sammelgellösung zur Herstellung eines 5 %igen Polyacrylamidgels

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

Sammelgelpuffer (pH 6,8)

0,5 M Tris HCl
48% 1 M-HCl

in bidestilliertem Wasser

Strip-Puffer

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

TBE-Puffer (pH 8)

445 mM Tris
445 mM Borsäure
10 mM EDTA
in bidestilliertem Wasser

TBST-Puffer

2 mM Tris HCl(pH 7,4)
15 mM NaCl
0,05% Tween 20
in bidestilliertem Wasser

Trenngellösung zur Herstellung eines 10 %igen Polyacrylamidgels

10 μ l TEMED
60 μ l Ammoniumpersulfat (0,1 g/ml Aqua bidest.)
3,0 ml Acrylamid Rotiphorese[®] Gel 40
1,2 ml SDS (1 % in Aqua bidest.)
2,4 ml Trenngelpuffer
5,4 ml bidestilliertes Wasser

Trenngelpuffer (pH 8,8)

1,88 M Tris
30 % HCl 1M
in Aqua bidest.

2.1.3.7 Lösungen für fluoreszenzmikroskopische Analysen

1 %ige BSA-Lösung

1 % BSA
gelöst in PBS-Lösung

Primärantikörperlösungen

Primärantikörper verdünnt in 1 %iger BSA-Lösung im Verhältnis 1:75

Sekundärantikörperlösungen

Sekundärantikörper verdünnt in 1 %iger BSA-Lösung im Verhältnis 1:125

DAPI-Stammlösung

100 μ g DAPI
ad 1ml Aqua bidest.

2.1.3.8 Herstellung von Lösungen der Testsubstanzen

S1P: Eine Stammlösung (5×10^{-4} M) des Lipidmediators S1P in Methanol wurde bei -80 °C gelagert. Zur Verbesserung der Lösungseigenschaften des Lysophospholipids, wurde dieses kurz vor seiner Verwendung für 10 Minuten im Ultraschallbad auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die gewünschte Menge an Stammlösung in ein silikonisiertes Glasröhrchen aufgenommen und mit Stickstoff abgedampft. Zur Einstellung der gewünschten Konzentration erfolgte die Zugabe einer entsprechenden Menge von 0,4 %iger BSA/PBS-Lösung, welche zuvor steril filtriert wurde. Zur verbesserten Lösung des S1P wurde das Gemisch für ca. 5 Minuten im Ultraschallbad auf Eis inkubiert und daraufhin zur Stimulation der jeweiligen Zellkultur verwendet.

Dex: Zur Herstellung einer adäquaten Stammlösung wurden 3,924 mg des GC abgewogen und in 1 ml Ethanol (96%) gelöst. Die Lagerung des Gemisches erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C unter Abdichtung des Aufbewahrungsgefäßes mittels Parafilm. Die Herstellung weiterer Verdünnungen aus der Stammlösung für die Stimulation von Zellkulturen erfolgte ebenfalls unter Verwendung von Ethanol (96%).

TNF α : TNF α wurde zu einer Konzentration von 10 μ g/ml in 1 % BSA/PBS-Lösung aufgenommen, aliquotiert und unter Lichtausschluss bei -80 °C gelagert.

Act: Die Lösung des Transkriptionsinhibitors erfolgte mittels PBS zu einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$. Die Lösung wurde anschließend bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

siRNA-Lösung: Die als Lyophilisat gelieferte siRNA wurde nach den Angaben des Herstellers in RNase-freiem Wasser gelöst.

Verapamil: Die Lösung des Calciumantagonisten erfolgte in Ethanol. Dabei wurde eine Konzentration von x mg/ml als Ausgangslösung verwendet.

MK571: Der ABC-Transporter-Inhibitor MK571 wurde in sterilem Aqua bidest. zu einer Konzentration von 10 nMol/l gelöst und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Suramin: Der S1P_{3/5}-Antagonist Suramin wurde in sterilem Aqua bidest. zu einer Konzentration von 1 nMol/l gelöst und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

SB203580: Zur Herstellung einer Stammlösung wurde der p38 mitogen activated protein kinase (MAPK)-Inhibitor in Ethanol zu einer Konzentration von 1 nM gelöst und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

SP600125: Der Inhibitor der c-jun N-terminal kinase (JNK) wurde in Ethanol zu einer Konzentration von 1 nM gelöst und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

UO126: Die Lösung des ERK-Inhibitors erfolgte in DMSO zu einer Konzentration von 1 nM und wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

L-NAME: Zur Inhibierung von NO-Synthasen erfolgte die Lösung von L-NAME in DMSO zu einer Konzentration von 100 nM. Die Lösung wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

LY294002: Die Lösung des Akt-Inhibitors erfolgte unter Zugabe von DMSO zu einer Konzentration von 5 nM und wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

JC-1: Zur Herstellung einer Lösung der Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ JC-1 wurde der Fluoreszenzfarbstoff in DMSO gelöst und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Stammlösungen für die HPLC: S1P (siehe oben), Sphingosin, Dihydrosphingosin und Dihydrosphingosin-1-Phosphat wurden in Methanol zu einer Konzentration von 5×10^{-4} gelöst und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Zur Verbesserung der Lösungseigenschaften der Sphingolipide, wurden diese kurz vor ihrer Verwendung für 10 Minuten im Ultraschallbad auf Eis inkubiert.

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung und Kultivierung von Fibroblasten

2.2.1.1 Gewinnung humaner Fibroblasten

Humane, dermale Fibroblasten wurden aus juveniler Vorhaut, die bei Zirkumzisionen in der kinderchirurgischen Ambulanz der Berliner Ärzte Dr. Jung, Dr. Schildknecht sowie dem St. Joseph-Krankenhaus, Berlin Tempelhof und dem Operationszentrum Birkenwerder anfiel und dem Arbeitskreis nach Genehmigung der Ärztekammer Berlin zur Verfügung gestellt wurde, isoliert. Die Hautstücke wurden nach der Operation in Transportmedium gekühlt bei 4 °C in das Institut gebracht, wo anschließend die Isolation der Zellen erfolgte. Zur Isolierung der Zellen wurde das Transportmedium entfernt und die Haut mit eiskalter PBS-Lösung gewaschen. Es folgte die Inkubation des Hautstückes für 1 h bei 37 °C oder für 12 h über Nacht bei 4 °C in Trypsin-EDTA-Lösung. Auf diese Weise erfolgte die Lockerung und Herauslösung von Zellen aus dem Gewebeverband. Um die Enzymreaktion zu terminieren, wurde zur Haut Stoppmedium hinzugegeben und nach zweimaligem Waschen des Hautstückes mit PBS, die Fibroblastensuspensionen in einem Zentrifugenröhrchen vereinigt. Nun erfolgte die Zentrifugation des Röhrchens bei 4°C über 5 min mit 1000 Umdrehungen. Das Zellpellet wurde nachfolgend in Fibroblastenwachstumsmedium aufgenommen und in 25 cm²-Zellkulturflaschen mit jeweils 5 ml Wachstumsmedium eingesät. Die Kultivierung dieser Vorkultur, welche auch als 0. Passage bezeichnet wurde, erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂. Nach 24 h wurde ein Wechsel des Wachstumsmediums durchgeführt, um nicht anhaftende Zellen und tote Blutzellen zu entfernen. Bei Erreichen eines Konfluenzgrades von etwa 50 bis 70% wurden die Zellen durch Trypsin-EDTA-Zugabe von den Zellkulturflaschen abgelöst und im Verhältnis 1:3 als sogenannte erste Passage neu eingesät. Für alle Experimente wurden Fibroblasten von mindestens drei Spendern vereinigt und bis zur siebten Passage weiterverwendet.

2.2.1.2 Gewinnung muriner Fibroblasten

Die Isolation von murinen Fibroblasten von $S1P_3^{-/-}$ - bzw. Wildtyp-Fibroblasten (Typ Black6) erfolgte direkt aus frisch präparierter Mäusehaut, welche uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. van der Giet, Berlin zur Verfügung gestellt wurde. Die Herstellung und Typisierung der „Knockout“-Mäuse geht auf Dr. Jerold Chun, USA zurück (Ishii 2001). Zur Gewinnung von Fibroblasten wurden die Hautstücke genau wie bei der Isolierung von humanen Zellen auch, für 2 h bei 37 °C und 5% CO₂ in Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert und anschließend mit Stopp-Medium die Enzymreaktion terminiert. Nach zweimaligem Waschen der Hautstücke in PBS erfolgte die Vereinigung der erhaltenen Fibroblastensuspensionen in einem Zentrifugenröhrchen und die anschließende Zentrifugation der Zellen bei 4 °C für 5 Minuten bei 1000 Umdrehungen. Das nun erhaltene Zellpellet wurde in murinem Fibroblastenwachstumsmedium resuspendiert und in kleine Zellkulturflaschen gegeben. Für die sich anschließende Kultivierung der Zellen wurden die Flaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ über Nacht inkubiert und zur Entfernung von toten Zellen und restlichen Blutzellen am folgenden Tag mit frischem Wachstumsmedium versorgt. Nach Erreichen eines Konfluenzgrades von 50 – 70 % wurde die Primärkultur gesplittet und die Zellen bis hin zur siebten Passage weiter kultiviert. Bemerkenswert ist dabei, dass der Phänotyp von humanen Fibroblasten sich deutlich von dem der murinen Fibroblasten unterscheiden lässt. Während humane Fibroblasten eine schmale, längliche Form besitzen, sind murine Wildtyp-Fibroblasten etwas größer und weisen einen sternförmigen Phänotyp auf. $S1P_3^{-/-}$ -Fibroblasten wiederum verfügen über ein eher rundliches Aussehen und sind eher klein. Die murinen Fibroblasten wurden mittels Real-Time PCR typisiert (siehe unten). Dabei wurden die folgenden Primersequenzen verwendet: 5'-CACAGCAAGCAGACCTCCAGA-3', 5'-TGGTGTGCGGCTGTCTAGTCAA-3' und 5'-ATCGATACCGTCGATCGACCT-3'.

2.2.1.3 Quantifizierung und Einsaat von Zellen

Um ein optimales Wachstum der Fibroblasten zu gewährleisten, spielte neben der Wahl eines geeigneten Wachstumsmediums auch die Einsaat einer geeigneten Anzahl an Zellen eine Rolle. Während eine zu niedrige Zelldichte aufgrund fehlender Zell-Zell-Kontakte zu einer verminderten Wachstumsrate der Zellen führt, trägt eine zu hoch gewählte Konzentrierung von Zellen ebenfalls hierzu bei. Für die

Durchführung eines Experimentes und zu Zwecken der Vergleichbarkeit der Versuche untereinander wurde daher zunächst der optimale Konfluenzgrad der Zellen für bestimmt, welcher je nach Versuch variieren konnte. Für die Bestimmung der Zellzahl in der Zellsuspension kam dabei ein Hämozytometer, in diesem Fall die Neugebauer Zählkammer verbessert nach Bürker, zum Einsatz. Nachdem ein Deckgläschen auf der entsprechenden Stelle der Zählkammer unter Ausbildung von Newtonringen positioniert wurde, erfolgten die Befüllung der Zählkammer mit $10 \mu\text{l}$ von 10 ml der Fibroblastensuspension und die sich anschließende Auszählung der einzelnen, großen Quadranten mittels eines Phasenkontrastmikroskops. 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. Eine definierte Anzahl an Zellen wurde sogleich in das vorgelegte und vorgewärmte Medium eingesät.

2.2.1.4 Cryokonservierung und Reaktivierung von Fibroblasten

Die vorübergehende Lagerung von Zellen erfolgte durch die Aufbewahrung bei $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ in flüssigem Stickstoff. Hierzu wurden konfluente Fibroblasten zur Herauslösung aus dem Zellverband mit Trypsin-EDTA vorbehandelt und die Reaktion durch die Zugabe von Stopp-Medium terminiert. Nach Zentrifugation der Zellen bei $300 \times g$ bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 5 Minuten wurden die Zellen mit einer Zelldichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen pro ml Einfriermedium resuspendiert. Jeweils $1,5 \text{ ml}$ dieser Suspension wurden in gekühlte Cryoröhrchen überführt und zunächst für ca. 2 Wochen mittels der Einfrierhilfe Mr. Frosty bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt. Anschließend erfolgte die Überführung in flüssigen Stickstoff.

Zur Reaktivierung wurde das entsprechende Cryoröhrchen nach der Entnahme aus dem Stickstoffbehälter in lauwarmem Wasser unter vorsichtigem Wenden des Röhrchens aufgetaut. Nun erfolgte die sofortige Überführung der Zellsuspension in eine große Zellkulturflasche, die mit auf $37 \text{ }^\circ\text{C}$ temperiertem Medium gefüllt war. Nach der Inkubation der Zellen bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 \% CO_2 über Nacht erfolgte ein Mediumwechsel und die weitere Anzucht der Zellen im Brutschrank bis zum gewünschten Konfluenzgrad.

2.2.2 Durchflusszytometrische Bestimmung apoptotischer Zellen

Durchflusszytometrische Verfahren, auch FACS-Analysen genannt, stellen eine vielfach genutzte Möglichkeit zur Sortierung und Charakterisierung von Zellen nach ihrer Größe und definierten Oberflächeneigenschaften dar. Dabei verursacht die im Zytometer vermessene Zelle durch die Beugung und Streuung eines monochromatischen Laserstrahls – hier ein Argonlaserstrahl, welcher die Zellen mit einer Wellenlänge von 488 nm anregt - eine gewisse Menge an Streulicht in Abhängigkeit ihrer zellulären Eigenschaften. Die Menge an emittiertem Vorwärtsstreulicht (FSC) repräsentiert dabei die Größe einer Zelle, wohingegen das Ausmaß des freigesetzten Seitwärtsstreulichts (SSC) ein Maß für die Granularität der Zelle darstellt. Zur quantitativen Charakterisierung der Zellen nach der Anwesenheit spezifischer Oberflächenmoleküle, oder auch einiger intrazellulärer Proteine, werden die Zielstrukturen durch fluoreszenzgekoppelte Antikörper oder auch fluoreszierende Farbstoffe markiert. In der vorliegenden Arbeit kamen dabei Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-markiertes Annexin V und der Fluoreszenzfarbstoff PI zur Detektion von früh- und spät-apoptotischen, sowie auch nekrotischen Zellen zum Einsatz. Annexin V bindet dabei an Phosphatidylserin, welches bereits in der frühen Phase der Apoptose an die Außenseite der Plasmamembran umgelagert wird und hier auch in der späten Phase der Apoptose zu finden ist. PI hingegen interkaliert zwischen Nukleinsäuren und akkumuliert in der Zelle. Voraussetzung hierfür ist allerdings, dass die Zelle einen spät-apoptotischen oder auch nekrotischen Zustand angenommen hat, da nur dann die Zytoplasmamembran für PI durchlässig wird. Auf diese Weise ergeben sich im Zytometer vier Arten von unterschiedlich gefärbten Zellen: nicht gefärbte Zellen (vital), nur PI aufweisende Zellen (nekrotisch), lediglich mit Annexin V markierte Zellen (früh-apoptotische Zellen) und mit einer Kombination von beiden Farbstoffen gekennzeichnete Zellen (spät-apoptotische Zellen). Während die markierte Zelle das Durchflusszytometer passiert, kommt es zur Anregung der gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe und zur Emission von Licht. Durch die genaue Analyse der Menge an gebildeter Strahlung kann somit auf die Anzahl der Zellen in den genannten vier Stadien zurückgeschlossen werden.

Für die Durchführung eines Versuches wurden 1×10^5 Fibroblasten in die Vertiefungen von 6-Loch-Platten ausgesät und über Nacht in Wachstumsmedium kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte die Umstellung der Zellen auf Basalmedium bis

zu Beginn der folgenden Stimulation. Anschließend wurden die Zellen (Gesamtvolumen 1 ml) mit 10 μl einer $\text{TNF}\alpha$ -Lösung (20 ng/ml mit PBS im Verhältnis 1:5 verdünnt) und 5 μl einer Act-Lösung (100 ng/ml mit PBS im Verhältnis 1:100 verdünnt) für 16 h behandelt. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte auf Eis. Dazu wurde das Zellmedium mit den darin enthaltenen apoptotischen und nekrotischen Zellen abgenommen und in ein Rundbodenröhrchen überführt. Nach Waschen der 6-Loch-Platten-Vertiefungen mit je 500 μl PBS-Lösung und der Überführung in die Rundbodenröhrchen wurden die Zellen mit 250 μl Trypsin-EDTA von der Zellkulturplatte abgelöst und nach Terminierung der Reaktion durch die Zugabe von 500 μl Stoppmedium ebenfalls im Rundbodenröhrchen gesammelt. Es schloss sich ein weiterer Waschschrift mit 500 μl PBS-Lösung pro Vertiefung an. Die vereinigten Zellsuspensionen wurden bei 1000 x g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Nach der Entfernung des Überstandes und der Resuspension der Zellen folgte die Zugabe von 250 μl Annexin-Bindungspuffer und die erneute Zentrifugation unter oben genannten Bedingungen. Nach dem Abgießen der Flüssigkeit wurden die Zellen in 185 μl Annexin-Bindungspuffer resuspendiert. Es folgte die Inkubation der Zellsuspension mit Annexin V-FITC (Endkonzentration 0,5 $\mu\text{g/ml}$) für 10 Minuten unter Ausschluss von Licht. Die Doppelfärbung mit PI erfolgte durch die Zugabe von 10 μl einer PI/PBS-Lösung (Endkonzentration 1 $\mu\text{g/ml}$) in der Dunkelkammer. Nun schloss sich die Vermessung der Zellen im Durchflusszytometer an.

Vor der Messung wurde das Durchflusszytometer auf die jeweilige Zellart eingestellt und eine Kompensation durchgeführt. Dies war erforderlich, da sich die Emissionswellenlängenbereiche der Fluorochrome von Annexin V-FITC und PI überlappen. Annexin V ist an den gelbgrünen Fluoreszenzfarbstoff FITC gekoppelt, welcher ein Absorptionsmaximum von 495 nm besitzt. Der rote Farbstoff PI hingegen zeigt ein Absorptionsmaximum von 536 nm. Dies entspricht dem Anregungswellenlängenbereich des Argonlasers und ermöglicht so die Detektion im Durchflusszytometer. Weiterhin liegt das Fluoreszenzemissionsmaximum des FITC im Bereich von 519 nm und kann somit im Fluoreszenzkanal 1 (FL1: $\lambda = 530$ nm) vermessen werden. Da das Fluoreszenzemissionsmaximum des PI allerdings bei 617 nm liegt, kann das so emittierte Licht im Fluoreszenzkanal 2 (FL2: $\lambda = 585$ nm) detektiert werden. Da aber ein kleiner Teil der FITC-basierten Fluoreszenz auch im FL2 registriert wird, ist es erforderlich die beiden Fluoreszenzkanäle auf die Fluoreszenzfarbstoffe einzustellen. Ohne diesen Abgleich käme es ansonsten zur

Detektion falsch positiver Signale. Zur Grundeinstellung wurden die Zellen zunächst auf ihre Größe (FSC) und Granularität (SSC) hin untersucht und anschließend in einem Dot Plot gegeneinander aufgetragen. Weiterhin wurde die zu analysierende Hauptzellpopulation durch das Legen eines „Gates“ ausgewählt. Für die Einstellung Kompensation der Fluoreszenzkomensation der beiden Farbstoffe, wurde ein Annexin V-FITC (FL1)/PI (FL2) Dot Plot angelegt. In einem nächsten Schritt wurden zur Unterdrückung der unspezifischen (Eigen)-fluoreszenz der Zellen ungefärbte Zellen vermessen. Die resultierende Autofluoreszenz sollte sich bei beiden Detektionswellenlängen im linken unteren Bereich des Dot Plot befinden. Zur Einstellung der Kompensation wurden Zellen entweder mit Annexin V-FITC oder mit PI gefärbt. Bei der anschließenden Messung wurden FL1 und FL2 so eingestellt, dass das Signal des jeweiligen Farbstoffes nur in einem Fluoreszenzkanal detektiert wurde: Nach diesen Grundeinstellungen wurden die Proben vermessen und die genauen Apoptoseraten unter Verwendung der Software WinMDI Version 2.8 ermittelt.

2.2.3 Bestimmung von S1P und Sphingosin mittels HPLC

Bei der HPLC handelt es sich um ein chromatographisches Trennverfahren, welches nicht nur zur Trennung der Einzelbestandteile eines Gemisches beiträgt, sondern auch ihre Quantifizierung erlaubt. Die HPLC wurde daher zur Analyse der zellulären S1P- und Sphingosin-Spiegel verwendet. Die Durchführung der Bestimmung des Sphingolipidgehalts erfolgte dabei nach Methode von Ruwisch et al. (Ruwisch et al., 2001). Diese basiert auf einem zweiphasigen Extraktionsverfahren unter Anwendung verschiedener pH-Bedingungen. Nach dem Aufschluss der Zellen und ihrer Homogenisierung während der Probenvorbereitung wird die Zellsuspension zunächst alkalisiert. Dies bewirkt die Deprotonierung des Sphingolipids, welches sich dann aufgrund seiner hohen Polarität in der wässrigen Phase eines Extraktionsgemisches ansammeln kann. Durch die folgende Ansäuerung des Extraktionsgemisches liegt das Sphingolipid wieder ungeladen vor und akkumuliert nun in der hydrophoben Chloroformphase. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittelgemisches und der Aufnahme in einer definierten Menge Probenpuffer, kann die Testlösung mittels HPLC analysiert werden. Dazu wird kurz vor der Detektion ein Derivatisierungsreagenz zur Ausbildung eines Fluorophors der Sphingolipide

hinzugefügt, welches die Detektion mit einem Fluoreszenzdetektor ermöglicht. Für die Durchführung der Versuche wurde ein HPLC-System der Serie Hitachi La Chrom[®] von Merck mit einer Vor- und Trennsäule aus Kromasil[®] 100-5 RP C18 verschiedener Partikelgrößen und Säulenlängen verwendet. Bei der Durchführung der RP-HPLC wurde ein Gradient zur Elution der Sphingolipide von der Säule benutzt (siehe Tabelle 1). Aufgrund der Eigenschaft von Sphingolipiden an Glasoberflächen anzuhaften, war es zudem erforderlich, während des gesamten Versuchs silikonisierte Glasgefäße zu verwenden.

Tabelle 1 Parameter der HPLC für die Sphingosin-1-phosphat- und Sphingosin-Bestimmung

Parameter	Charakterisierung
Eluent	Methanol, 70 mM Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)
Fahrweise	Gradient (ausgehend von 24 % K ₂ HPO ₄ und 76 % Methanol in kleinen Schritten auf 0% und K ₂ HPO ₄ 100% Methanol)
Flussrate	1,3 ml/Min
Probengeber	Autosampler
Injektionsvolumen	220 µl
Temperatur	Raumtemperatur
Vorsäule	
Partikelgröße, ID, Länge	5 µm, 4 mm, 20 mm
Material	Kromasil [®] 100-5 RP C18 (CS-Chromatographie Service GmbH)
Trennsäule	
Partikelgröße, ID, Länge	5 µm, 6,4 mm, 250 mm
Material	siehe Vorsäule
Zeiten	
Lauf	60 Min
Derivatisierung	15 Min
Detektor	Fluoreszenzdetektor
Exzitation	340 nm
Emission	455 nm

Zur Bestimmung der Mengen an enthaltenem S1P und Sphingosin wurde ein interner Standard aus Dihydro-S1P bzw. Dihydro-Sphingosin verwendet, sowie für jeden Lauf eine Eichgerade des entsprechenden Sphingolipids erstellt. Dazu wurden Stammlösungen von S1P, Dihydro-S1P, Sphingosin und Dihydro-Sphingosin gelöst

zu einer Konzentration von 5×10^{-4} mol/l in Methanol erstellt. Diese Lösungen wurden nun im Verhältnis 1:100 in Methanol verdünnt und aus der S1P- und Sphingosinlösung weitere Dilutionen für die Erstellung der Standardreihe angefertigt.

Für die Durchführung des Versuches wurden 5×10^5 Fibroblasten in Zellkulturschalen (53 mm Durchmesser) ausgesät und am nächsten Tag auf Basalmedium überführt. Nach Stimulation der Zellen mit Dex erfolgten die Entfernung des Stimulationsmediums und das Waschen der Zellen mit PBS-Lösung. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers in 1 ml 0,25 % HCl-haltigem Methanol abgekratzt. Zur Homogenisierung der Zellsuspension wurden die Zellen mit Ultraschall behandelt. Zur anschließenden Extraktion der Sphingolipide wurde die Zellsuspension zusammen mit dem internen Standard (jeweils 40 μ l der 1:100 verdünnten Stammlösung), 900 μ l 1 M NaCl-Lösung, 100 μ l 3 M Na OH und 1 ml Chloroform in silikonisierte Rundbodenröhrchen überführt. Das Gemisch wurde nun für 45 Sekunden gevortext und bei 1500 x g, für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die sphingolipidhaltige, obere, wässrige Phase wurde nun in ein neues Rundbodenröhrchen gegeben und die verbleibende Chloroformphase noch einmal zur vollständigen Extraktion der Sphingolipide mit 500 μ l Methanol, 500 μ l 1 M NaCl-Lösung und 50 μ l 3M NaOH versetzt. Nach erneutem Vortexen und Zentrifugieren schloss sich die saure Extraktion der Sphingolipide an. Dazu wurden die wässrigen Phasen der letzten beiden Schritte vereinigt und mit einem Gemisch aus 100 μ l konzentrierter HCl und 1,5 ml Chloroform behandelt. Es folgten wieder die Schritte des Vortexens und der Zentrifugation. Die organische Phase wurde in einem Rundbodenröhrchen gesammelt. Der erneute Zusatz von 1,5 ml Chloroform und das anschließende Vortexen und Zentrifugieren diente der vollständigen Extraktion der Sphingolipide aus der wässrigen Phase. Diese wurde nun verworfen. Nach Vereinigung der organischen Phasen wurde das Lösungsmittel mit Hilfe des Speed-Vac[®] Plus SC110A der Firma Savant entfernt und der Rückstand in 325 μ l HPLC-Probenpuffer gelöst. Nach einer kurzen Inkubation im Ultraschallbad konnten die Proben der HPLC zugeführt werden.

Hier wurden sie zunächst durch den Autosampler mit dem Derivatisierungsreagenz versetzt und für 15 Minuten inkubiert. 220 μ l des Gemisches konnten nun eingespritzt werden.

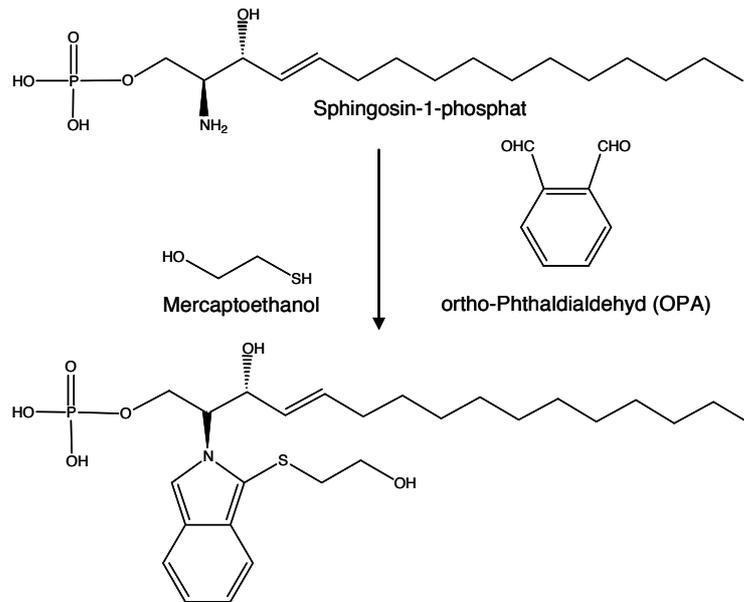


Abb. 4 Derivatisierung des S1P mittels Mercaptoethanol und OPA

2.2.4 Bestimmung von Ceramiden unter Verwendung der Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS)

Bei dem Verfahren der LC-MS wird zunächst die Probenlösung unter Anwendung einer RP C18-Säule mittels HPLC vorgetrennt. Im nächsten Schritt erfolgt die Ionisation des Analyten unter Desolvatisierung der Teilchen. Als Ionenquelle wird dabei das Verfahren der ESI verwendet. Dabei wird die Analytlösung durch eine Metallkapillare geleitet, an deren Spitze eine positive Spannung angelegt wurde. Dies erzeugt ein elektrisches Feld, in welchem sich die Kationen der Analytlösung elektrophoretisch in Richtung Kapillarspitze bewegen und schließlich in Form feinsten Tröpfchen aus der Kapillare austreten. Im Folgenden wird das anhaftende Lösungsmittel des Aerosols verdampft und eine Aufkonzentrierung der Ladung an der Tröpfchenoberfläche erreicht. Der wiederholte spontane Zerfall der Tröpfchen bewirkt letztendlich die Desolvatisierung und Fragmentierung der Moleküle, die nun in Form eines Ionenstrahls dem Massenspektrometer zugeführt werden. Da die Ionen des Ionenstrahls nicht pulsartig erzeugt werden, sondern kontinuierlich dem MS zugeführt werden, wurde ein orthogonales Flugzeitmassenspektrometer (oTOF-MS) eingesetzt. Dabei werden die Ionen durch ein elektrisches Feld beschleunigt. Im Falle des oTOF-MS erfolgt die Beschleunigung der Ionen dabei senkrecht zur vorher eingenommenen Flussrichtung. Nun treten die beschleunigten Ionen in einen luftleeren Raum ein und durchfliegen die feldfreie Strecke. Dabei weisen die Ionen

eine leicht unterschiedliche kinetische Energie auf. Diese wird durch die Anwendung von sogenannten Ionenspiegeln, auch Reflektoren genannt, vereinheitlicht. Der Ionenstrahl wird hier auf ein Linsensystem geführt, das so konstruiert ist, dass die Ionen "gespiegelt" werden und so die Energieunsicherheit verkleinert wird. In Abhängigkeit von ihrer Masse erreichen die geladenen Teilchen dann zu unterschiedlichen Zeiten den Detektor. Auf diese Art und Weise kann nicht nur die Zusammensetzung des Analyten sondern auch die Quantifizierung der einzelnen Bestandteile durchgeführt werden. Zur Durchführung des Versuches wurde ein LC/ESI-oTOF-MS-Gerät der Firma Agilent Technologies (Waldborn) verwendet. Die verwendeten Einstellungen sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Einstellungen für die Durchführung der LC-MS

Parameter	Charakterisierung
Eluent	Acetonitril/Isopropanol 9:1 mit 0,2 % Ameisensäure
Fahrweise	isokratisch
Flussrate	0,5 ml/Min
Probengeber	Autosampler
Injektionsvolumen	10 µl
Temperatur	70 °C
Trennsäule	
Partikelgröße, ID, Länge	5 µm, 2 mm, 70 mm
Material	RP C18 Nucleosil AB Säule (Machery-Nagel, Düren)
Laufzeit	10 Min
MS-Detektor	Kapillarspannung 3,5 kV, Gastemperatur 350 °C, Gasstrom 100 l/Min, Fragmentatorspannung 300 V

Für die Bestimmung der intrazellulären Ceramidspiegel wurde die Bildung des in Abb. 4 aufgeführten sich einheitlich bei allen Ceramiden ergebenden Bruchstücks mit dem Fragmentpeak m/z 264 quantifiziert.

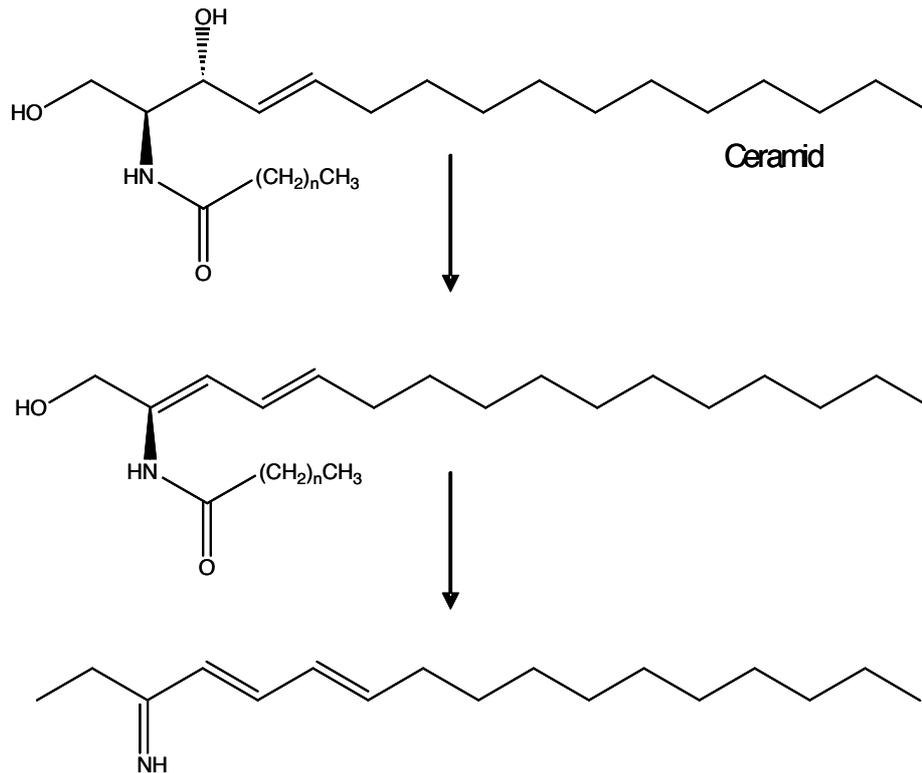


Abb. 5: Darstellung eines charakteristischen Bruchstücks der Ceramide bei der ESI (264 g/Mol)

Für die Quantifizierung des intrazellulären Ceramidgehalts wurden 5×10^4 Fibroblasten in Zellkulturschalen (Durchmesser 53 mm) ausgesät und am nächsten Tag auf Basalmedium umgestellt. Nach der Stimulation mit Dex über einen Zeitraum von 8 h wurden die Zellen mit PBS-Lösung gewaschen. Mit Hilfe eines Zellschabers erfolgte das Abkratzen der Zellbruchstücke in 1 ml 0,25% HCl-haltigem Methanol und die Aufnahme in ein zuvor silikonisiertes Rundbodenröhrchen. Dieses wurde zur Homogenisierung der Suspension mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter Anwendung des Speed-Vac[®] Plus SC110A der Firma Savant entfernt, der Rückstand in 200 μ l einer Ameisensäure/Ethanolmischung (Mischungsverhältnis 1:99,8) aufgenommen und für 10 Minuten im Ultraschallbad inkubiert. Diese Testlösung wurde anschließend zur Bestimmung des Ceramidgehalts dem LC/ESI-oTOF-MS-Gerät zugeführt.

2.2.5 Isolierung von Gesamt t-RNA

Die Isolierung von Gesamt t-RNA aus Fibroblasten erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen RneasyMini Kit[™] nach den Angaben des Herstellers. Bei der

Durchführung dieser Methode werden die hochselektiven Bindungseigenschaften einer Silicagelmembran für RNA genutzt, um die Abtrennung der Gesamt t-RNA der Zelle von anderen Zellbestandteilen zu ermöglichen. Hierzu wurden zunächst 7,5 x 10⁵ Fibroblasten von ihrem Stimulationsmedium befreit und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Lyse und Homogenisierung des Probenmaterials durch die Zugabe eines Guanidinisothyocyanat-haltigen Puffers (RLT-Puffer, inaktiviert Rnasen) und dem Abkratzen der Zellen mit einem Zellschaber. Die entstandene Suspension wurde zur Aufreinigung der Gesamt t-RNA auf eine QuiaShredder-Säule gegeben und anschließend bei 1000 x g für 2 Minuten zentrifugiert. Die nun stattfindende Zugabe einer äquivalenten Menge an Ethanol zum Eluat gewährleistet die Ausbildung optimaler Bindungseigenschaften der RNA an die Silicamembran. In einem nächsten Schritt erfolgte die Einwirkung des Gemisches auf eine Rneasy Mini Säule, welche durch die folgende Zentrifugation bei 1000 x g für 2 Minuten zur Aufreinigung der Gesamt t-RNA beiträgt. Nun erfolgten weitere Aufreinigungsschritte zur Abtrennung von Protein- und Salzverunreinigungen. Dabei wurden die mitgelieferten Puffer (RW1- und RPE-Puffer) jeweils auf die Säule gegeben und durch Zentrifugation bei 1000 x g wieder eluiert und anschließend verworfen. Zur Ablösung der aufgereinigten Gesamt t-RNA von der Säule werden 35 µl RNase freies Wasser auf die Säule gegeben und durch Zentrifugation bei 1000 x g für 1 Minute eluiert. Die Konzentration der nun erhaltenen, wässrigen RNA-Lösung wurde mit Hilfe eines Photometers unter Verwendung eines pH-neutralen, sterilen Tris-HCl-Puffers bestimmt. Dazu wurde eine Quarzküvette für mindestens 1 h mit einer Mischung aus Methanol und konzentrierter Salzsäure vorbehandelt (Zerstörung eventuell anwesender RNAsen). In einem nächsten Schritt erfolgte die Vermessung von 10 µl an RNA-Probe in 490 µl Tris-HCl-Puffers (Verdünnung von 1:50 bzw. 0,02) bei 260 nm und 280 nm im Photometer.

Zur Berechnung des Gehalts an Gesamt t-RNA wurde folgende Formel verwendet:

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

[Gesamt t-RNA]	Konzentration der RNA in µg/ml
$A_{260\text{nm}}$	Absorption bei 260 nm
F	Verdünnungsfaktor

Zur Überprüfung der Reinheit der isolierten Gesamt t-RNA wurde der Quotient der Absorption bei 260 nm und 280 nm gebildet. Um größere Verunreinigungen ausschließen zu können, wurden nur Gesamt t-RNA-Proben verwendet, bei denen die Berechnung dieses Quotienten einen Wert von $> 1,6$ ergab.

2.2.6 Synthese von cDNA mittels reverser Transkription

Zur Erzeugung von einzelsträngiger cDNA aus der hergestellten Gesamt t-RNA wurde das Revert Aid™ First Strand cDNA synthesis Kit der Firma Fermentas verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Methode, bei der die Revert Aid M-MuLV reverse Transkriptase zum Einsatz kommt, welche im Gegensatz zur AMV (Avian Myeloblastosis Virus) reversen Transkriptase eine geringere RNase H Aktivität besitzt. Für die Gewinnung von cDNA wurde zunächst die Lösung der erhaltenen Gesamt t-RNA vorgelegt und mit DEPC-Wasser zu einer Konzentration von 100-200 ng/ μ l verdünnt. Die angefertigten Negativkontrollen enthielten dabei anstatt der RNA ausschließlich DEPC-Wasser. Anschließend wurden pro 1-2 μ g RNA je 1 μ l Oligo(dT)₁₈-Primer ($c = 0,5 \mu$ g/ml) hinzugegeben und nach kurzer Zentrifugation bei 1000 x g für 5 Minuten bei 70 °C inkubiert. Dieser Schritt dient der Denaturierung der Versuchslösung. Nach der Entnahme der Proben aus den Heizblöcken wurden die Proben auf Eis für ca. 5 Minuten abgekühlt, um die Aktivität möglicher RNasen zu senken und eine nicht zu hohe Ausgangstemperatur für die weiteren Vorgänge zu gewährleisten. Oligo(dT)₁₈-Primer haben die Eigenschaft, an die Poly-A-Sequenz der eukaryotischen mRNA zu binden. Dieser Vorgang dient als Ausgangspunkt der Aktivität der reversen Transkriptase. Dazu erfolgte die Zugabe des Reaktionspuffers, zusammengesetzt aus 20 nM Tris-HCl pH8,3, 3,75 mM KCl und 15 mM MgCl₂, sowie des Ribonuclease-Inhibitors RiboLock™ in einer Konzentration von 20 u/ μ l. Weiterhin wurde eine Mischung an verschiedenen Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTP, 10 mM) zugesetzt. Nach gründlicher Mischung der Lösung erfolgte wieder eine kurze Anzentrifugation zur Sammlung des Probeninhalts auf dem Grund des Reaktionsgefäßes. Nun folgte die Inkubation der Proben für 5 Minuten bei 37 °C, um sich der optimalen Arbeitstemperatur der reversen Transkriptase von 42 °C anzunähern. Sogleich wurde auch 1 μ l Revert Aid M-MuLV reverse Transkriptase pro Reaktionsansatz hinzugefügt und nach einer erneuten Abzentrifugation des Gemisches bei 42 °C für 60 Minuten inkubiert. Diese Zeit diente der Synthese von

einzelsträngiger cDNA. Durch das Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 70 °C wurde schließlich die Reaktion terminiert. Die abgekühlten Proben wurden zur Aufbewahrung und späteren Weiterverwendung bei – 80°C eingefroren.

2.2.7 Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der Real-Time PCR handelt es sich um ein Verfahren zur Vervielfältigung und Quantifizierung von Nukleinsäuren. Diese Methode beruht dabei auf der Durchführung einer normalen PCR zur Amplifizierung von DNA und der gleichzeitigen Messung der Menge an gebildeten Nukleinsäuren, also in Echtzeit (real time). Diese Quantifizierung während des Ablaufs der PCR wird durch die Detektion von Fluoreszenzsignalen ermöglicht, die direkt bei der Durchführung der einzelnen Zyklen erfasst werden. Die Fluoreszenzsignale gehen dabei auf die laser-induzierte Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes und DNA-Interkalators SYBR Green I zurück. Daher nimmt die entstandene Fluoreszenz proportional zur Menge an gebildetem PCR-Produkt zu und erlaubt am Ende eines Laufes die Quantifizierung der entstanden Nukleinsäuren in der exponentiellen Phase der PCR. Zur Durchführung der Versuche wurde das Gerät LightCycler 480[®] der Firma Roche Diagnostics verwendet.

Zur Durchführung des Versuchs wurden zunächst geeignete Primer mit Hilfe der Primer Design Software der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) entwickelt (Tabelle 1). Daraufhin wurden die Primer von der Firma TIB Molbiol geliefert und mit DEPC-Wasser zu einer Konzentration von 5 µM gelöst. Die nachfolgenden Arbeitsschritte wurden unter Kühlung durch Eis durchgeführt. Anschließend erfolgte die Herstellung der Reaktionslösung, welche sich pro Ansatz aus 3 µl DEPC-Wasser, 1 µl sowohl des Reverse- als auch des Forward-Primers und 10 µl des SYBR Green I Master Mixes[®] zusammensetzte. Je 15 µl der Reaktionslösung wurden in die ausgewählten Vertiefungen einer LightCycler 480[®] 96-Multiwellplatte gegeben. Anschließend erfolgte die Verdünnung der synthetisierten cDNA (entsprechend 5 µg Gesamt t-RNA) mit DEPC-Wasser im Verhältnis 1:3. Genau 5 µl der cDNA-Lösung wurden den entsprechenden, Reaktionslösung enthaltenden Vertiefungen der LightCycler 480[®] 96-Multiwellplatte hinzugefügt und die Platte dann mit Hilfe der LightCycler 480[®] Sealing Foil verschlossen. Nach Zentrifugation der Platte bei 1000 x g für 2 Minuten bei Raumtemperatur konnte die Platte für die Durchführung der Real-

Time PCR im LightCycler 480[®] nach den Vorgaben des Herstellers verwendet werden. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Initiale Denaturierung für 5 min bei 95 °C, gefolgt von 47 Zyklen mit 10 s bei 95 °C und 7 s bei 55 °C für Hybridisierung und 6 s bei 72 °C für die Elongation. Bei der Real-Time PCR-Analyse wurden stets Doppelbestimmungen der zu testenden cDNA und Negativkontrollen angefertigt. Darüber hinaus war die Verwendung einer definierten immer gleich zusammengesetzten Kalibratorlösung Bestandteil eines jeden Versuches. Dies ermöglicht die bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Versuchsergebnisse. Im Anschluss an die Real-Time PCR erfolgte die Erstellung von Schmelzkurven, um zu analysieren, ob es während der PCR zur Ausbildung von störenden Primerdimeren gekommen ist. Weiterhin ermöglichte die Normalisierung der ermittelten Werte im Verhältnis zu Cyclophilin A als Referenzgen und die Standardisierung der Umsetzung des jeweiligen Gens in der Kalibrator-DNA die Bestimmung der quantitativen mRNA Expression des Zielgens.

Tabelle 3: Sequenzen der verwendeten Primer

Zielgen		Sequenz
SphK1	forward	5`-AGACCTCCTGACCAACT-3`
	reverse	5`-ATACTTCTCACTCTCTAGGTCC-3`
SphK2	forward	5`-CCTGGCTGCTAGAGTTG-3`
	reverse	5`-CCCTCATTGATCAGGCAC-3`
ABCB1	forward	5`-GGCAAGCTGGAGAGAT-3`
	reverse	5`-TAATTACAGCAAGCCTGGAAC-3`
ABCC1	forward	5`-CTCCTGTGGCTGAATCTG-3`
	reverse	5`-CACTTTGATCCCATTGAGAATTT-3`
S1P₁	forward	5`-CGTGTTCACTCTCCTCG-3`
	reverse	5`-CTGATGCAGTTCCAGCC-3`
S1P₂	forward	5`-GTTAGCCAGGATGGTCTT-3`
	reverse	5`-CAACAGAGCGAGACTTCA-3`
S1P₃	forward	5`-CGCTTCAGTGTAACAACG-3`
	reverse	5`-GAGGGTCACACAGCATT-3`
S1P₄	forward	5`-AAGACCAGCCGCGTCTA-3`
	reverse	5`-CCAGGCAGAAGAGGATGT-3`
S1P₅	forward	5`-GGAAATGCAGCCAAAGG-3`
	reverse	5`-CCATTATTTTCATCACCGAGTT-3`

Akt1	forward	5`-TCGCTTCTTTGCCGGTATC-3`
	reverse	5`-CCATGCTGTATCTTGG-3`
Bcl_{XL}	forward	5`-GGGACAGCATATCAGAGC-3`
	reverse	5`-CGATCCGACTCACCAATAC-3`
Cyclophilin A	forward	5`-TTTGCTTAATTCTACACAGTACTTAGAT-3`
	reverse	5`-CTACCCTCAGGTGGTCTT-3`

2.2.8 Methoden zur Analyse der Proteinexpression

Die Bestimmung der Expression eines spezifischen Proteins in Fibroblasten erfolgte unter Anwendung eines dreistufigen Verfahrens. Hierbei wurde zunächst nach dem Aufschluss der Zellen eine Trennung der Proteine nach ihrer Größe anhand einer SDS-Gelelektrophorese durchgeführt. In einem zweiten Schritt erfolgte der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Membran („blotting“) anhand der Western Blot-Technik. Die folgende Visualisierung definierter Proteine erforderte darüber hinaus die Anwendung eines immunologischen Detektionsverfahrens, bei dem Antikörper zielgerichtet an antigene Epitope des auf der Membran fixierten Zielproteins binden. Die Durchführung dieser drei Methoden ermöglicht die Darstellung der Proteinexpression auf einem Film und die anschließende Quantifizierung mit Hilfe eines densitometrischen Auswertungsverfahrens.

2.2.8.1 Zellyse

Eine Voraussetzung für die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts besteht in dem effektiven Aufschluss von Zellen zur Freilegung der Proteine. Dazu wurden 2×10^5 Fibroblasten von ihrem Stimulationsmedium befreit und nach einmaligem Waschen mit PBS mit $50 \mu\text{l}$ RIPA-Puffer behandelt. Während der folgenden Einwirkzeit von 30 Minuten wurden die Zellen auf einem gefrorenen Kühlakku platziert (die Kühlung vermindert die Aktivität von DNasen) und die Zellkulturplatten dabei mit Hilfe eines Schüttlers in Bewegung gehalten. Nun war es erforderlich die analysierten Zellen durch das Abkratzen der Zellen von der Zellkulturplatte unter Verwendung eines Zellschabers weiter zu lysieren, um so zur vollen Freisetzung der Proteine beizutragen. Die erhaltenen Zellysate wurden nun in

Reaktionsgefäße überführt und der enthaltene Zellschrott von den Zielproteinen durch Zentrifugation bei 1300 x g bei 4 °C für 30 Minuten abgetrennt. Die Überstände wurden sogleich in neue Reaktionsgefäße überführt.

2.2.8.2 Proteinbestimmung

Um den Gehalt des aufgereinigten Zelllysates an Proteinen zu bestimmen, erfolgte die Quantifizierung nach Bradford. Hierbei wurde das Bradfordreagenz im Verhältnis 1:5 mit Aqua bidest. verdünnt und je 1 ml in Halbküvetten vorgelegt. Anschließend wurde mittels einer BSA-Lösung bekannter Konzentration (50 µl / 100 µl Aqua bidest.) eine Standardkurve erstellt. Dazu wurde zu der jeweiligen Bradfordlösung eine definierte Menge an BSA-Lösung hinzugefügt und nach Zugabe von 50 µl Lysepuffer die Reagenzmischung mit Hilfe eines Photometers bei 595 nm quantifiziert. Hieraus war es nun möglich eine Standardkurve zu berechnen.

Zur Quantifizierung der Proteinproben wurde analog verfahren: Zu 1 ml Bradfordreagenz wurden 5 µl Proteinlösung und 95 µl Aqua bidest. hinzugefügt und anschließend der Gehalt an Protein mit Hilfe des Photometers und der erstellten Standardkurve ermittelt. Für die weitere Durchführung der Proteinanalyse wurden zwischen 20 µg und 50 µg Protein verwendet.

2.2.8.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um ein biochemisches Verfahren zur Auftrennung von Molekülen im elektrischen Feld. Diese Variante der normalen PAGE basiert auf der Eigenschaft von SDS an denaturierte Proteine zu binden und ihnen dadurch proportional zu ihrer Größe eine definierte Ladung im elektrischen Feld zu verleihen und ermöglicht so die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe in einem Polyacrylamidgel im elektrischen Feld.

Zur Durchführung der SDS-PAGE wurden die Proben und auch ein Größenmarker zunächst mit der Hälfte ihres Volumens einer SDS-Pufferlösung (bestehend aus 3 x SDS Probenpuffer und 10 % DTT) versetzt. Anschließend erfolgte die Erhitzung dieses Gemisches auf 95 °C im Heizblock zur Denaturierung der Proteine und zur Anlagerung des SDS an die Proteine.

Zur Herstellung der Gele für die SDS-PAGE wurden die Elektrophoreseplatten zur Entfernung von anhaftenden Fettspuren und Proteinen mit Alkohol gereinigt und mit Hilfe der Dichtungen und Klammern zu Elektrophoresegelkammern zusammengebaut. Als nächstes wurden 11 ml der frisch zubereiteten Trenngellösung in die Gelbehältnisse hineinpipettiert und mit 1 ml Isopropanol 70 % gegen die Austrocknung des Gels überschichtet. Nach 20 Minuten konnte der Alkohol abgegossen werden und auf das entstandene Trenngel die Sammelgellösung aufgegossen werden. Nun erfolgte auch das Eingliedern von Kämmen in die Sammelgellösung zur Ausbildung von Geltaschen.

Nachdem das Sammelgel, welches zur Vortrennung der Proteine nach ihrer Ladung bzw. dem Molekulargewicht dient, ausgehärtet war, konnten die Klammern und Dichtungen der Elektrophoresegelkammer entfernt werden und die Gelkammern in die Elektrophoresekammer eingefügt werden. Die Kammer wurde daraufhin mit Laufpuffer so befüllt, dass die Gelkammern vollständig von oben und unten mit dem Puffer in Berührung kamen. Nun konnten die angefertigten Proben, sowie die angefertigte Größenmarkerlösung in die Geltaschen des Sammelgels hineinpipettiert werden und die Elektrophorese bei 35 mA / 400 mV unter Kühlung mittels Wasser gestartet werden. Nachdem die Proteinfront die Grenze zwischen Sammel- und Trenngel passiert hatte konnte die Elektrophorese bei 50 mA / 400 mV bis zum Endpunkt des Verfahrens fortgesetzt werden.

2.2.8.4 Western Blot

Zur Übertragung der Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran wurde sich der Methode des „Western Blottings“ bedient. Dabei wird ein senkrecht zur vorherigen PAGE verlaufendes elektrisches Feld auf das Gel angelegt. Dies bewirkt das Wandern der Proteine im elektrischen Feld. Sobald die Proteine an der Membran angelangt sind kommt es zur Ausbildung von hydrophoben Wechselwirkungen der Proteine mit der PVDF-Membran. Nach diesem Vorgang wird noch enthaltenes SDS von der Membran und aus den Proteinen ausgewaschen. Dies erlaubt die Renaturierung der Proteine und ermöglicht diese teilweise dazu, ihrer Sekundär- und Tertiärstrukturen wieder einzunehmen.

Nach der SDS-PAGE wurde das erhaltene Gel vorsichtig auf den Zielgrößenbereich des gesuchten Proteins und des verwendeten Referenzproteins (hier β -Actin)

zurechtgeschnitten und in Blotpuffer für 15 Minuten eingelegt. Nun erfolgte die Aktivierung der zu verwendenden PVDF-Membran durch das 15 Sekunden lange Schwenken in Methanol. Restliche anhaftende Methanolrückstände wurden anschließend durch das Waschen mit Aqua bidest. entfernt. Genauso wie das Polyacrylamidgel, wurde auch die aktivierte Membran in Blotpuffer für 15 Minuten inkubiert. In der Zwischenzeit erfolgte das Zurechtschneiden von Filterpapieren für den folgenden Zusammenbau des Blotsandwiches. Dazu wurde die Sandwichhalterung mit einem dünnen Schwamm, sowie 4 Lagen an mit Blotpuffer getränktem Filterpapier überschichtet und hierauf das zu verarbeitende Gel platziert. In einem nächsten Schritt wurde das Gel mit der aktivierten PVDF-Membran und 4 weiteren Lagen an Blotpuffer-haltigem Filterpapier überschichtet. Nun folgten bis zu drei weitere Sandwicheinheiten und die Auflage eines weiteren dünnen Schwammes und der oberen Sandwichhalterung. Die Halterung wurde daraufhin mit zwei Gummibändern zusammengefügt und in die mit Blotpuffer gefüllte Blotapparatur hineingestellt. Nach dem Anlegen von 100 mA und 400 mV erfolgte das Blotten unter Kühlung der Apparatur mit Wasser.

2.2.8.5 Immunologische Detektion der Proteine

Die Visualisierung des gesuchten Proteins auf der PVDF-Membran erfolgte durch die Anwendung eines immunologischen Detektionsverfahrens. Dabei kommt es zum Einsatz eines spezifischen primären Antikörpers, welcher gegen ein definiertes, antigenes Epitop des Zielproteins gerichtet ist. Danach kommt es zur Bindung eines zweiten, mit einer Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase, HRP) gekoppelten Antikörpers, welcher die Fähigkeit hat, in Anwesenheit von H_2O_2 Licht zu emittieren. Das ausgestrahlte Licht wird sodann auf einem Schwarzweißfilm festgehalten und der Film schließlich nach der Fixierung anhand eines densitometrischen Auswertungsverfahrens analysiert. Die Intensität des ausgestrahlten Lichtes, also auch die Ausbildung der Banden, ist dabei proportional zur enthaltenen Menge des Zielproteins.

Zur immunologischen Detektion des Zielproteins wurde die Membran zunächst mit TBST für 5 Minuten auf dem Schüttler gewaschen und anschließend mit der Blocklösung für 60 Minuten bei 37 °C unter weiterem Umschütteln inkubiert. Nach weiteren Waschschritten mit TBST erfolgte nun die Inkubation der Membran mit einer

definierten Verdünnung des primären Antikörpers in TBST bei Raumtemperatur für 2 h. Nach dem Auswaschen von restlich unspezifisch anhaftendem primären Antikörper mit TBST erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Verdünnung: 1:50 in Blocklösung) für 1 h. In einem nächsten Schritt war es erforderlich, die Membran drei Mal für je 5 Minuten mit TBST von der Sekundärantikörperlösung zu befreien. Die Membran wurde nun in der Dunkelkammer in 10 ml LumoGlo[®]-Lösung für je 45 Sekunden von beiden Seiten geschwenkt und konnte dann in eine vorbereitete Klarsichtfolie hineingefügt werden. Nach dem Ausstreichen restlicher LumoGlo[®]-Lösung mit Hilfe eines Papierhandtuches konnte ein Schwarzweißfilm auf die Klarsichtfolie aufgelegt werden und so das emittierte Licht während einer definierten Belichtungszeit vom Film angenommen werden. Der belichtete Film wurde sogleich in Entwicklerflüssigkeit geschwenkt, bis Banden der gewünschten Intensität sichtbar waren. Nach dem Abwaschen der Entwicklerflüssigkeit in Aqua bidest. erfolgte die Fixierung des Films durch die Einwirkung von Fixierflüssigkeit. Die so hergestellten Filme wurden getrocknet und mit Hilfe eines Scanners digitalisiert.

Die so entstandenen Bilder konnten unter Anwendung des Programms BioDoc Analyse densitometrisch ausgewertet werden.

2.2.9 RNA-Interferenz (RNAi)

Die RNAi ist ein Vorgang in eukaryotischen Zellen zur gezielten Stilllegung der Aktivität von Genen und wird durch kleine doppelsträngige RNA ausgelöst, auch „small interfering“ RNA (siRNA) genannt. siRNA entsteht, indem doppelsträngige RNA von dem sogenannten Dicer, einem RNase-III Homologen, in kleine doppelsträngige RNA Fragmente zerteilt wird. Weiterhin erfolgt die Bindung und Entwindung der siRNA durch den „RNA induced silencing complex“, RISC. Dieser Komplex nutzt den Antisense-Strang zur Bindung an die Ziel-mRNA und bewirkt aufgrund seiner RNase-Aktivität für einzelsträngige RNA (single strain RNA, ssRNA) den Abbau der Ziel-mRNA (Schmidt, 2005).

Eine weitere Methode zur gezielten Downregulation von Zielproteinen besteht in der Anwendung der Antisensetechnologie. Dabei wird die Eigenschaft von Antisenseoligodesoxynukleotiden (ASO), mit der Ziel-mRNA kleine doppelsträngige

RNA zu bilden, genutzt. Diese ist dann nach dem Prinzip der RNAi zur gezielten Stilllegung von Genen befähigt.

2.2.9.1 Antisensetechnologie

Die Basis der gezielten Unterbindung der Synthese eines spezifischen Proteins durch die Anwendung der Antisensetechnologie besteht in der Anwendung definierter ASO. Die jeweilige Sequenz der ASO wurde dabei so gewählt, dass der komplementäre Strang der Initiationsstelle des Zielgens entsprach und somit in einer effektiven Unterbindung der Proteinexpression resultierte. Darüber hinaus kamen sogenannte scrambled-ODNs (scr-ODN) zur Anwendung. Diese verfügen zwar strukturell gesehen über die gleichen Basen wie die ASO, diese sind jedoch in einer zufälligen Reihenfolge angeordnet worden. Dies diente dem Ausschluss von unspezifischen Einflüssen der ODNs auf die Proteinexpression. Die verwendeten ODNs wurden von der Firma TIB Molbiol (Berlin, Deutschland) synthetisiert. Die zugehörigen Sequenzen der verwendeten ASO und scr-ODN können der Tabelle 2 entnommen werden.

Tabelle 4: Sequenzen der verwendeten ASO und scr-ODN

Zielprotein		Sequenz
S1P₁	ASO	5`-GACGCTGGTGGGCCCCAT-3`
	Scr-ODN	5`-ATGGGGCCCACCAGCGTC-3`
S1P₂	ASO	5`-GTTGAGCAGGGAATTCAGGGTGGAGA-3`
	Scr-ODN	5`-CATCACTAGCCACTTGAAGCAGGCCA-3`
S1P₃	ASO	5`-CGGGAGGGCAGTTGCCAT-3`
	Scr-ODN	5`-ATGGCAACTGCCCTCCCG-3`
S1P₄	ASO	5`-GAAGGCCAGCAGGATCATCAGCAC-3`
	Scr-ODN	5`-ACCTAGCCAACCCTCCATGAAGGC-3`
S1P₅	ASO	5`-CAACATGCCACAAAGGCCAGGAG-3`
	Scr-ODN	5`-GCAACAACATAACGGGCCAGCAG-3`

In einem ersten Schritt wurden Fibroblasten (1×10^5 pro 6-Lochplatte) zunächst für 12 h in Fibroblastenwachstumsmedium kultiviert und mit den entsprechenden ODN in einem Gesamtvolumen von 2 ml transfiziert. Zur Herstellung der Transfektionslösung wurden die jeweiligen ASO bzw. scr-ODN in OptiMEM und Fugene HD ($2 \mu\text{g DNA}/3 \mu\text{l}$) zu einer Endkonzentration von 500 nM/l im Well gelöst und diese Mischung nach

einer kurzen Inkubationszeit von 1,5 Minuten zur Bildung des Transfektionskomplexes zum Wachstumsmedium der Zellen hinzugefügt und für 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die transfizierten Zellen zur Vorbereitung auf eine folgende Stimulation auf Basalmedium umgestellt und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.2.9.2 Verwendung von siRNA

Zur Anwendung der RNAi-Technik durch siRNA wurden 1×10^5 Fibroblasten pro Vertiefung in eine 6-Loch-Platte ausgesät und über Nacht anwachsen gelassen. Am nächsten Tag wurde das Wachstumsmedium entfernt und durch 1 ml Transfektionslösung ersetzt. Diese setzte sich zusammen aus der in DEPC-Wasser gelösten siRNA, DEPC-Wasser, dem Verdünnungspuffer des N-TER[®]-Nanopartikeltransfektionssystems[®] der Firma Sigma und dem N-TER[®]-Reagenz. Bei der Anwendung des N-TER[®]-Transfektionssystems kommt es zum Einbau der siRNA in Nanopartikel, welche anschließend durch direkte Wechselwirkungen des Nanopartikels mit Lipiden der Plasmamembran in die Zelle aufgenommen werden können. Hier wird die siRNA aus dem Nanopartikel freigesetzt. Die Anwendung des N-TER[®]-Transfektionssystems ermöglicht den effektiven Transport der siRNA in das Zytoplasma der Zelle und schützt dabei vor möglicher Kompartimentbildung und vermindert auch den Abbau der siRNA. Die verwendeten Konzentrationen wurden so gewählt, dass je nach Versuch eine Endkonzentration von 20 – 40 nMol/l der siRNA erreicht wurde. Neben zielgerichteter siRNA wurde zum Ausschluss möglicher unspezifischer Effekte der siRNA oder anderer Bestandteile der Transfektionslösung auch mit Kontroll siRNA B gearbeitet. Diese siRNA enthält eine zufällige Kombination von Basen, zu denen keine komplementäre mRNA in der Zelle existiert. Die Transfektionslösung wurde nach 6 h durch die Zugabe von Wachstumsmedium (1ml) ergänzt und die Zellen über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag konnte mit der Durchführung des weiteren Versuchs begonnen werden.

Tabelle 5 erläutert die Sequenzen der verwendeten siRNA

Zielprotein		Sequenz
SphK1	sense	5'-GGGCAAGGCCUUGCAGCUC-3'
	anti-sense	5'-GAGCUGCAAGGCCUUGCCC-3'
ABCC1	sense	5'-GUUCCAAGGUGGAUGCGAA-3'
	anti-sense	5'-UUCGCAUCCACCUUGGAAC-3'
Akt	sense	5'-GUGCCAUGAUCUGUAUUUA-3'
	anti-sense	5'-UAAAUACAGAUCAUGGCAC-3'

2.2.10 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Durchführung der indirekten fluoreszenzmikroskopischen Methode wurden 4×10^4 Fibroblasten auf runden, vorher sterilisierten Deckgläschen in 12-Loch-Platten ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 anwachsen gelassen. Am nächsten Tag erfolgte die Umsetzung der Zellen auf Basalmedium für mindestens 16 h. Nun konnte das Medium abgesaugt werden und nach dreimaligem Waschen mit PBS-Lösung erfolgte die Fixierung der Zellen auf den Deckgläschen durch die Inkubation mit einer 4 %igen Formalinlösung bei Raumtemperatur. Es folgten weitere drei Waschschrte mit PBS-Lösung und die Zugabe von 1 %iger BSA-Lösung für 30 Minuten zur Absättigung von unspezifischen Bindungen. Nach der Anfertigung der Primärantikörperlösung wurden $35\ \mu\text{l}$ des Gemisches auf ein Stück Parafilm gegeben, und daraufhin das Deckgläschen aus dem Well mit der zellhaftenden Seite nach unten, unter Vermeidung der Ausbildung von Luftblasen, direkt auf den Flüssigkeitstropfen gegeben. Diese Konstruktion blieb für 1 h erhalten, bis die Deckgläschen wieder in die 12-Loch-Platte überführt wurden und restliche Primärantikörperlösung durch dreimaliges Waschen mit PBS-Lösung entfernt werden konnte. Nach der Herstellung der Sekundärantikörperlösung wurden wieder $35\ \mu\text{l}$ des Gemisches auf ein Stück Parafilm gegeben und das Deckgläschen wie oben beschrieben darauf platziert und unter Lichtausschluss für 1 h inkubiert. Es folgten wieder drei Waschschrte mit PBS-Lösung, allerdings unter Ausschluss von Lichtquellen, und die Zugabe von $10\ \mu\text{l}$ DAPI (Endkonzentration $1\ \mu\text{g/ml}$). Diese Lösung wurde nach 10 Minute durch Waschen mit PBS entfernt. In einem letzten Schritt wurde ein luftblasenfreier Tropfen Fluoromount[®]-Reagenzes auf einen Glasobjektträger gegeben und daraufhin das Deckgläschen mit der zellhaftenden Seite nach unten auf dem Tropfen platziert. Dies diente einerseits der Fixierung des

Deckgläschens auf dem Objektträger und andererseits vermindert die Anwendung des Fluoromount®-Reagenzes ein zu schnelles Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe. Die so hergestellten Präparate konnten nun mittels des Keyence BZ8000-Fluoreszenzmikroskops der Firma Keyence begutachtet werden. Geeignete Aufnahmen der Präparate wurden unter gleichen Belichtungs- und Vergrößerungsbedingungen angefertigt und anschließend digitalisiert.

2.2.11 Messung des transepithelialen, mitochondrialen Potentials $\Delta\psi_m$

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

In einem ersten Schritt wurden 1×10^5 Fibroblasten in einer 6-Loch-Platte ausgesät und nach dem Anwachsen der Zellen auf Basalmedium umgestellt. Nach der Stimulation der Zellen mit $1 \mu\text{M}$ Dex für 8 h und der Zugabe von 100 ng/ml Act und 20 ng/ml TNF α für 16 h konnte der Fluoreszenzfarbstoff JC-1 hinzugefügt werden. Für die Durchführung des Versuches wurde eine Stammlösung des Farbstoffs in DMSO mit einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ erstellt. Nach der Entfernung des Mediums und dem Hinzufügen von 1 ml PBS-Lösung, wurden jeweils 1 μl der Lösung in die Vertiefung einer 6-Loch-Platte (Endkonzentration der JC-1-Lösung $c = 0,1 \mu\text{g/ml}$) gegeben und diese, unter Ausschluss von Licht, für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgten aufgrund der schlechten Löslichkeit von JC-1 in wasserhaltigen Medien mehrere Waschschriffe mit auf $37 \text{ }^\circ\text{C}$ temperierter PBS-Lösung. Die so vorbereitete Probe konnte nun im Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Aussagekräftige Ausschnitte des Präparates wurden unter Auswahl der gleichen Belichtungszeit und Vergrößerungsstufe zudem digitalisiert.

2.2.12 Analyse der Caspase 3-Bildung mit dem Caspase 3 intracellular activity Kit 1

Die Bestimmung der intrazellulären Aktivität der Caspase 3 erfolgte unter Anwendung des Caspase-3 Intracellular Activity Assay Kit I (PhiPhiLux G1D2) der Firma Merck. Dabei handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, welcher intakte Membranen ohne ihre vorherige Permeabilisierung passieren kann. Strukturell gesehen weist der Farbstoff die Peptidsequenz DEVDGI auf, welche als Zielstruktur der Caspase 3 identifiziert werden konnte. Nach dem Kontakt von Farbstoff und Caspase 3 kommt es somit zur Abspaltung der Peptidsequenz vom Molekül und zur Entwicklung einer nachhaltigen Fluoreszenz. Diese konnte anschließend fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden.

Zur Durchführung des Versuches wurden $2,5 \times 10^4$ Fibroblasten in 24-Loch-Platten eingesät und am nächsten Tag für mindestens 16 h auf Basalmedium weiter im Brutschrank inkubiert. Daraufhin erfolgte die Stimulation mit $1 \mu\text{M}$ Dex für 8 h und die Zugabe von 100 ng/ml Act und 20 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ für 16 h. Nach gründlichem Waschen der Zellen mit PBS-Lösung wurden 300 μl Verdünnungspuffer aus dem Kit vorgelegt und zusätzlich 587 μl des auf 37°C vorgewärmten PhiPhiLuxG1D2-Reagenzes zugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten unter Lichtausschluss im Brutschrank erfolgte die Messung der entstandenen Fluoreszenz, repräsentativ für die Caspase 3-Aktivität, mit Hilfe des Keyence BZ8000 Fluoreszenzmikroskops. Repräsentative Ausschnitte der Präparate wurden unter Auswahl der gleichen Belichtungszeit und Vergrößerungsstufe digitalisiert.

2.2.13 Quantifizierung der Aktivität der Caspasen 3/7

Zur quantitativen Analyse der Aktivität der Caspasen 3/7 wurde das ApoONE[®] homogenous Caspase 3/7 Assay der Firma Promega verwendet. Der Versuch basiert dabei auf der Tatsache, dass Caspasen zur Spaltung der Peptidsequenz DEVD (Asp-Glu-Val-Asp) befähigt sind. Das verwendete Kit setzt sich dabei aus einem Puffer zur Permeabilisierung der Zellwand für den Fluoreszenzfarbstoff und dem Farbstoff selbst zusammen. Dieser Farbstoff weist das oben genannte Motiv, im Detail die Struktur Rhodamine-110,bis-(N-CBZL-L-Aspartyl-L-Glutamyl-L-Valyl-L-Asparaginsäure)-amid, auf und befähigt somit die Caspasen 3/7 zur Abspaltung der

Peptidsequenz DEVD. Dies führt dann zur Aktivierung des Moleküls durch die Ausbildung eines Fluorophors. Die Intensität der Fluoreszenz korreliert dabei proportional mit der Menge an aktiver Caspase 3/7.

Für die Durchführung des Versuches wurden 1×10^4 Fibroblasten in einer zur Messung von Fluoreszenz geeigneten, schwarzen 96-Loch-Platte ausgesät und die Zellen über Nacht im Brutschrank anwachsen lassen. Am nächsten Tag erfolgte die Umstellung auf $100 \mu\text{l}$ serumfreies Basalmedium für mindestens 16 h und anschließend die Stimulation der Zellen mit $1 \mu\text{M}$ Dex für 8 h. Nach Zugabe von 100 ng/ml Act und 20 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ für 16 h erfolgte die Zugabe von $100 \mu\text{l}$ des ApoONE[®] homogenous Caspase 3/7-Reagenzes (zusammengesetzt aus $10 \mu\text{l}$ Fluoreszenzfarbstofflösung und $990 \mu\text{l}$ mitgelieferter Pufferlösung). Die 96-Loch-Platte wurde daraufhin unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur für 4 h auf einem Schüttler inkubiert und anschließend die entstandene Fluoreszenz mit dem Mikroplattenlesegerät FLUOStar OPTIMA[®] analysiert. Dabei wurde eine Anregungswellenlänge von 485 nm und eine Emissionswellenlänge von 530 nm verwendet.

2.2.14 Statistik

Die vorgelegten Daten repräsentieren die Mittelwerte von mindestens zweifach durchgeführten Versuchen, unter Verwendung einer für die jeweilige Untersuchung charakteristischen Zufallsvariablen. Zusätzlich zur Bestimmung des Mittelwertes wurde auch die Standardabweichung, also das Ausmaß der Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert herum, angegeben. Damit zusätzlich auch eine Aussage über die Signifikanz der verglichenen Mittelwerte getroffen werden konnte, erfolgte zunächst die Überprüfung der Grundgesamtheit auf Normalverteilung. Hierzu wurde der Shapiro-Wilk-Test verwendet. Eine Voraussetzung für das Vorliegen einer Signifikanz der angegebenen Werte, besteht dabei in dem Vorhandensein von gleichen Varianzen. Daher wurde der F-Test zur Überprüfung dieser Annahme durchgeführt. Erwiesen sich die Varianzen als inhomogen, wurde der Welch-Test zur Signifikanz-Analyse herangezogen

In einem nächsten Schritt erfolgte nun die Analyse der Signifikanzniveaus mit Hilfe des t-Tests. Voraussetzungen hierfür stellen die bereits durchgeführten Tests auf Normalverteilung und die Gleichheit der Varianzen dar. Der t-Test gibt dabei anhand

der Kenntnis der Mittelwerte und den jeweiligen Standardabweichungen eine Irrtumswahrscheinlichkeit dafür an, dass ein gefundener Mittelwertunterschied rein zufällig entstanden ist und keine signifikanten Unterschiede zwischen den verglichenen Messparametern vorliegen. Zusätzlich wurde als Signifikanzniveau eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % festgelegt. Ein Ergebnis war somit signifikant, wenn die Nullhypothese (H_0 : Es besteht kein Unterschied zwischen den Stichproben) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ abgelehnt werden konnte.

3. Ergebnisse

3.1 Bedeutung des Sphingolipid-Rheostats und der SphK1 für den zytoprotektiven Effekt von Dex in humanen Fibroblasten

3.1.1 Untersuchung des intrazellulären Gleichgewichts von Ceramid, Sphingosin und S1P humaner Fibroblasten in Gegenwart von Dex

Bereits in den 1970er-Jahren konnte gezeigt werden, dass GC die Fähigkeit besitzen, den PCD einer Zelle hervorzurufen (Robertson et al., 1978). Hierauf konnte auch schon bald die Eigenschaft der GC, als wichtige Nebenwirkung eine Hautatrophie bei Langzeitanwendung zu bewirken, zurückgeführt werden. Heute ist allerdings bekannt, dass GC nicht nur pro-apoptotische Wirkungen hervorrufen können, sondern interessanterweise in vielen Zelltypen auch zytoprotektive Eigenschaften besitzen. Eine genauere Charakterisierung dieses Phänomens in humanen Fibroblasten ergab, dass Dex zwar einen anti-proliferativen Effekt auf die Zellen ausübt, dieser aber mit einer Hemmung des PCD assoziiert ist. Für die anti-apoptotische Wirkung von Dex kommt darüber hinaus dem Lipidmediator S1P eine bedeutende Rolle zu, da eine Behandlung der Zellen mit dem GC eine verstärkte Bildung des Sphingolipids beinhaltet (Hammer et al., 2004).

Die Entscheidung über die Auslösung des PCD oder dem gesteigerten Schutz einer Zelle vor Apoptose wird mitunter durch das intrazelluläre Gleichgewicht an Ceramid, Sphingosin und S1P, dem sogenannten Sphingolipid-Rheostat, mitbestimmt. Ceramide können in der Zelle aus Serin und PalmitoylCoA-Einheiten über mehrere Schritte aufgebaut werden und sind als prominente Induktoren apoptotischer Prozesse bekannt. Allerdings besteht auch die Möglichkeit den Gehalt einer Zelle an Ceramid durch eine verstärkte Umwandlung zu Sphingosin, welches ebenfalls zur Auslösung der Apoptose befähigt ist, zu beeinflussen. So befinden sich Ceramid und Sphingosin über die Enzyme Ceramidsynthase und Ceramidase in einem fließenden Gleichgewicht miteinander und können je nach Aktivität der Ceramidsynthase und der Ceramidase ineinander umgewandelt werden. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass Sphingosin als Vorstufe des Lipidmediators S1P fungiert (Maceyka et al., 2002; Xu et al., 2006).

Da für den anti-apoptotischen Effekt von Dex in humanen Fibroblasten eine gesteigerte Bildung des S1P diskutiert wird, war es als nächstes von Interesse herauszufinden, inwiefern Dex zu einer Regulation des intrazellulären Gleichgewichts

von Ceramid, Sphingosin und S1P beiträgt. In einem ersten Versuch wurden folglich Fibroblasten mit 1 μM Dex für 0-24 h stimuliert und anschließend mittels einer LC/ESI-MS-Analyse (Ceramid) oder einer HPLC-Analyse (Sphingosin, S1P) die jeweilige Menge an gebildetem Sphingolipid quantifiziert. Wie aus Abb. 4 hervorgeht, bewirkt eine Stimulation von Fibroblasten mit dem GC eine Reduktion der intrazellulären Ceramid- (Abb. 6A) und Sphingosinspiegel (Abb. 6B). Die Analyse des intrazellulären S1P-Gehaltes von Fibroblasten ergab hingegen eine deutliche Induktion der zellulären S1P-Synthese, welche für mindestens 24 h erhalten blieb (Abb. 6C). Wie aus Abb.5 ersichtlich, bewirkt eine Stimulation von Fibroblasten mit Dex eine Reduktion der pro-apoptotischen Vertreter Ceramid und Sphingosin und eine Hochregulation des anti-apoptotischen Lysophospholipids S1P.

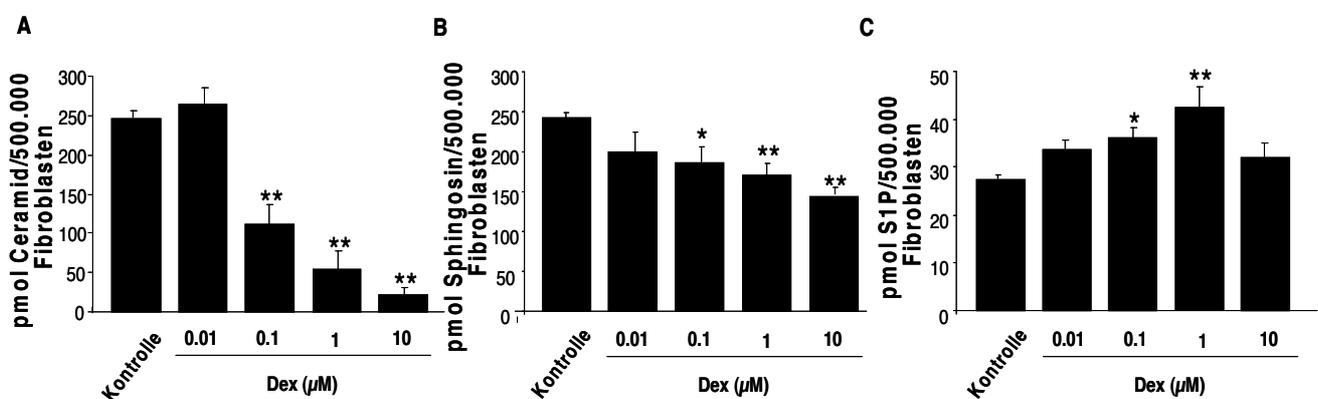


Abb. 6 Beeinflussung der intrazellulären Synthese von Ceramid, Sphingosin und S1P durch Dex. Humane Fibroblasten wurden über einen Zeitraum von 8 h mit Dex stimuliert und anschließend nach Aufschluss der Zellen mittels LC/ESI-MS- oder HPLC-Analyse auf den Gehalt an Ceramid (A), Sphingosin (B) und S1P (C) hin untersucht. Die Graphik zeigt die Mittelwerte \pm SD einer Doppelbestimmung. Der Versuch wurde insgesamt drei Mal durchgeführt, wobei vergleichbare Ergebnisse erhalten wurden. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

3.1.2 Regulation der SphK durch Dex

3.1.2.1 Untersuchung der Isoenzyme SphK1 und SphK2 auf mRNA-Ebene

Ein entscheidender Schritt bei der Bildung von S1P besteht in der Umwandlung von Sphingosin zu S1P, katalysiert durch die SphK. Bei der SphK handelt es sich um eine Gruppe von Isoenzymen, SphK1 und SphK2, welche in der Zelle verschiedene Funktionen wahrnehmen können und auch für Zelltod und Zytrotektion eine wichtige Rolle spielen. Daher war es von Interesse zu untersuchen, ob der anti-apoptotische Effekt von Dex auf eine Aktivierung der SphK zurückzuführen ist.

Hierzu wurde die Expression von SphK mRNA-Transkripten mittels Real-time PCR quantifiziert. Wie aus Abb. 7 ersichtlich, induziert Dex die Bildung von SphK1 mRNA-Transkripten in humanen Fibroblasten. Die Stimulation der Zellen mit 1 μM Dex führte zu einer beginnenden Aktivierung nach 3 h, mit einem detektierbaren Maximum der SphK1 mRNA-Expression nach 8 h. Eine konzentrationsabhängige Analyse ergab einen maximal wirksamen Effekt von Dex auf die Bildung von SphK1 mRNA-Transkripten bei einer Konzentration von 1 μM .

Wie aus Abb. 8 hervorgeht konnte hingegen kein Effekt von Dex auf die Bildung von SphK2 mRNA-Transkripten festgestellt werden.

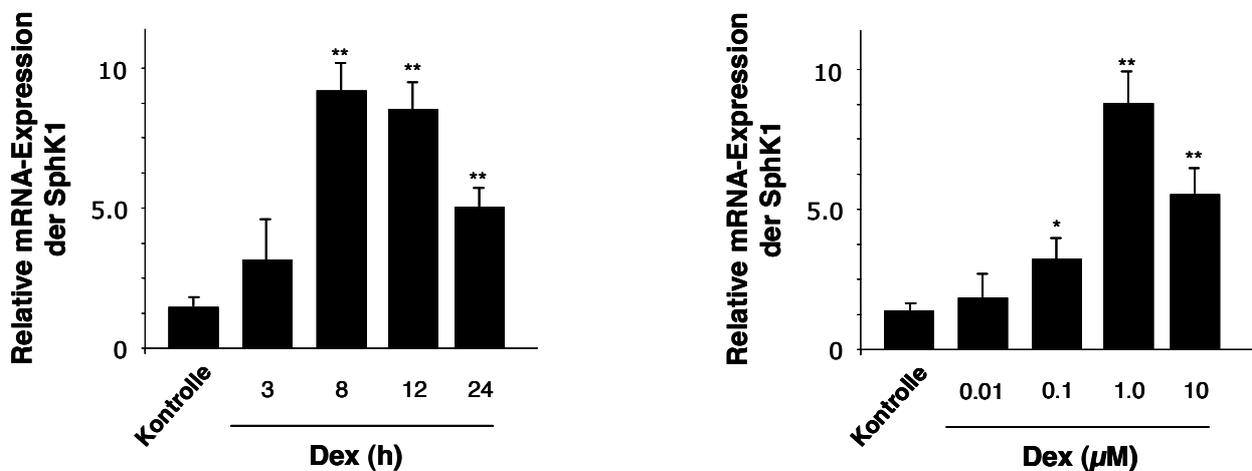


Abb. 7 Aktivierung der SphK1 durch Dex in humanen Fibroblasten. Humane Fibroblasten wurden mit einer Konzentration von 1 μM Dex über einen Zeitraum von 0-24 h bzw. mit Konzentrationen von 0-10 μM Dex für 8 h stimuliert. Die Bildung von SphK1 mRNA-Transkripten wurde mittels einer Real-time PCR Analyse quantifiziert. Die Graphik zeigt die Mittelwerte \pm SD einer Doppelbestimmung. Der Versuch wurde insgesamt drei Mal durchgeführt, wobei vergleichbare Ergebnisse erhalten wurden. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

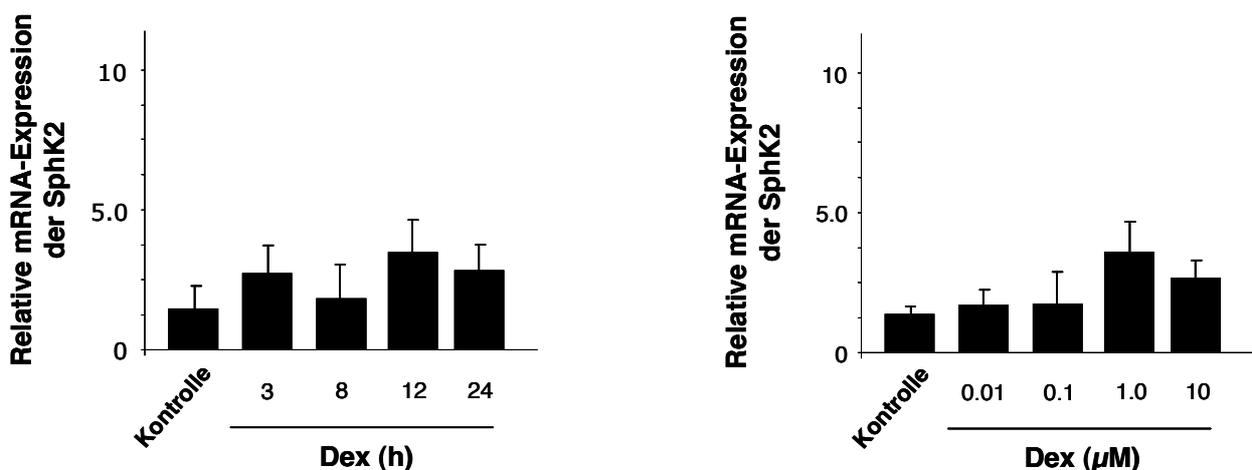


Abb. 8 Beeinflussung der SphK2 mRNA Expression durch Dex. Humane Fibroblasten wurden konzentrations- und zeitabhängig mit Dex stimuliert und anschließend die Bildung der mRNA-Transkripte mittels Real-time PCR analysiert. Die Graphiken zeigen die Mittelwerte \pm SD einer Doppelbestimmung. Der jeweilige Versuch wurde insgesamt drei Mal durchgeführt, wobei vergleichbare Ergebnisse erhalten wurden.

3.1.2.2 Der Einfluss von Dex auf die Proteinexpression der SphK1

Um zu verifizieren, dass Dex nicht nur die Bildung von SphK1 mRNA-Transkripten induziert, sondern auch an der Regulation der Proteinexpression beteiligt ist, wurden humane Fibroblasten mit Dex stimuliert und die Zelllysate auf ihren Gehalt an SphK1 und β -Actin hin untersucht. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Western Blot-Analyse gefolgt von einer densitometrischen Auswertung zur Bestimmung der SphK1-Expression im Vergleich zu β -Actin (Abb. 9). Auf diese Weise konnte ein maximaler Effekt von Dex auf die Expression der SphK1 bei einer Stimulationszeit von 8 h mit 1 μ M Dex nachgewiesen werden.

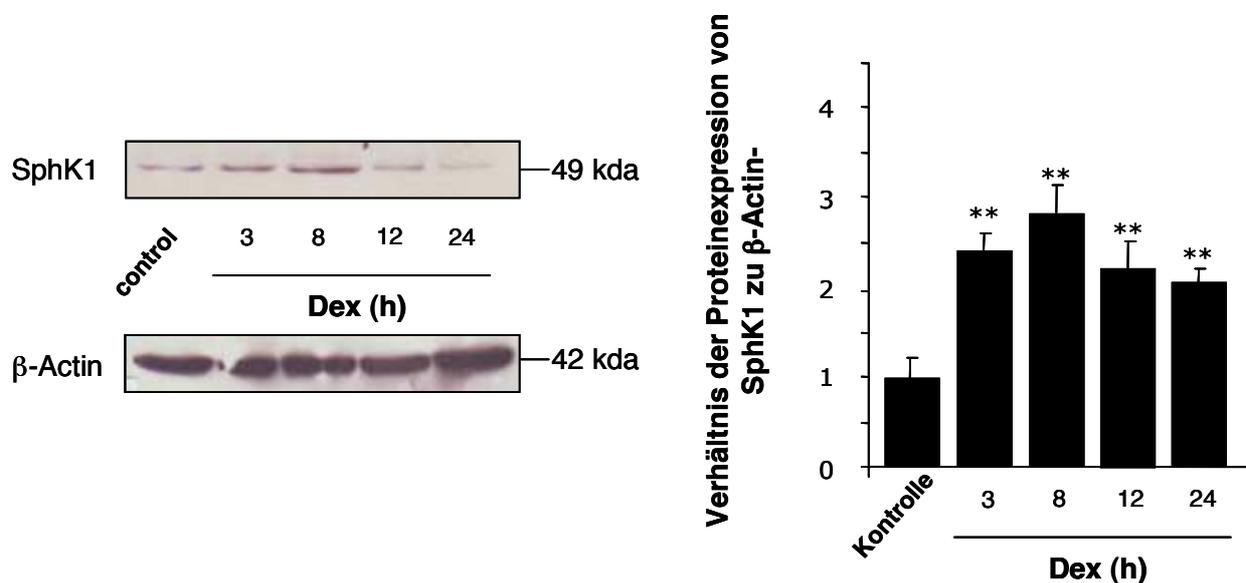


Abb. 9 Regulation der SphK1-Proteinexpression. Humane Fibroblasten wurden mit 1 μ M Dex über einen Zeitraum von 0-24 h stimuliert und mittels Western Blot-Analyse untersucht. Die Auswertung des Expressionsverhältnisses der SphK1 zu β -Actin erfolgte mittels Densitometrie. Die Graphik zeigt die Mittelwerte \pm SD von zwei vergleichbar durchgeführten Versuchen. **p < 0,01

3.1.3 Untersuchungen zum Apoptoseverhalten von Fibroblasten nach Desensitivierung der SphK1 in Gegenwart von Dex

3.1.3.1 Überprüfung der SphK1 siRNA-Effektivität mittels Real-time PCR

Um die Beteiligung der SphK1 am anti-apoptotischen Effekt von Dex in humanen Fibroblasten zu untermauern, erfolgten Untersuchungen der Apoptoserate unter Desensitivierung der SphK1 mittels SphK1 siRNA.

In einem ersten Schritt wurde die gewählte wirksame Arbeitskonzentration zur Desensitivierung der SphK1 mittels siRNA von 20 nM überprüft. Hierzu wurden Fibroblasten mit 20 nM SphK1 siRNA in Gegenwart von Dex behandelt und

anschließend die Bildung der SphK1 mRNA-Transkripte mittels Real-time PCR quantifiziert. Aus Abb. 8 ist ersichtlich, dass die verwendete Konzentration von 20 nM SphK1 siRNA eine Stimulation des Isoenzym durch Dex effektiv inhibiert.

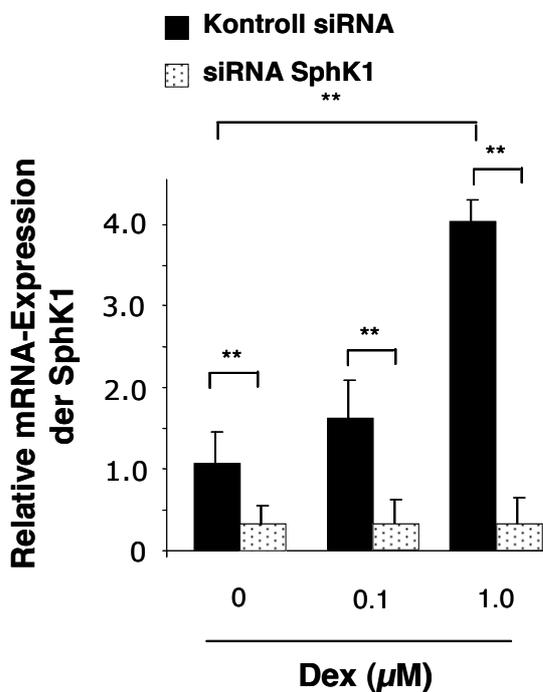


Abb. 10 Desensitivierung der SphK1 durch SphK1 siRNA. Fibroblasten wurden mit 20 nM siRNA oder Kontroll siRNA nach den Vorgaben des Herstellers behandelt und anschließend mit 0,1 oder 1 μM Dex für 8 h stimuliert. Die Bestimmung der mRNA-Transkripte wurde mittels einer Real-time PCR Analyse quantifiziert. Die Graphik zeigt die Mittelwerte ± SD einer Doppelbestimmung. Der Versuch wurde insgesamt drei Mal durchgeführt, wobei vergleichbare Ergebnisse erhalten wurden. **p < 0,01

3.1.3.2 Ermittlung intrazellulärer S1P-Spiegel in Gegenwart von SphK1 siRNA

Weiterhin war es von Interesse zu überprüfen, ob eine Desensitivierung der SphK1 auch gleichzeitig mit einer Reduktion der Dex-induzierten Bildung von intrazellulärem S1P verbunden ist. Hierzu wurden Fibroblasten mit 20 nM SphK1 siRNA oder Kontroll siRNA nach den Vorgaben des Herstellers behandelt und anschließend mit 1 μM Dex über einen Zeitraum von 24 h stimuliert. Die entsprechenden Zelllysate wurden aufbereitet und mittels HPLC auf den Gehalt an S1P hin überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass Dex in Gegenwart von SphK1 siRNA nicht mehr dazu in der Lage war, die Menge an intrazellulär gebildetem S1P zu erhöhen (Abb. 11).

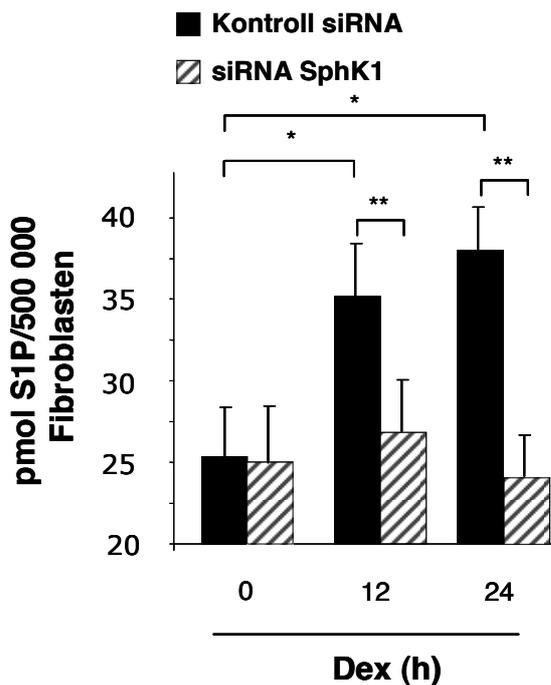


Abb. 11 Beeinflussung intrazellulärer S1P-Spiegel in Gegenwart von SphK1 siRNA durch Dex. Humane Fibroblasten wurden mit 20 nM SphK1 siRNA oder Kontroll siRNA nach den Vorgaben des Herstellers inkubiert und anschließend für 12 h bzw. 24 h mit Dex stimuliert. Die Analyse des intrazellulären S1P-Gehalts erfolgte aus den Zelllysaten mittels HPLC-Analyse. Die Graphik zeigt die Mittelwerte \pm SD einer Doppelbestimmung. Der Versuch wurde insgesamt drei Mal durchgeführt, wobei vergleichbare Ergebnisse erhalten wurden. *p < 0,05, **p < 0,01

3.1.3.3 Darstellung der Induktion der SphK1 durch Dex unter Verwendung von SphK1 siRNA

Als weitere Methode zur Verifizierung der Desensitivierung der SphK1 durch SphK1 siRNA einerseits und gleichzeitig zum zusätzlichen Nachweis der Dex-induzierten Aktivierung der SphK1 dienen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. Hierzu wurden Fibroblasten mit 20 nM SphK1 siRNA oder Kontroll siRNA nach den Angaben des Herstellers behandelt und anschließend mit Dex stimuliert. Wie aus Abb. 12 ersichtlich, zeigte sich in Gegenwart von SphK1 siRNA eine deutlich geringere Intensität an grüner Fluoreszenz (SphK1), welche auf die Ausschaltung der SphK1 zurück zu führen ist. Im Gegenzug dazu konnte eine Induktion der SphK1 durch Dex in Anwesenheit von Kontroll siRNA unverändert nachgewiesen werden.

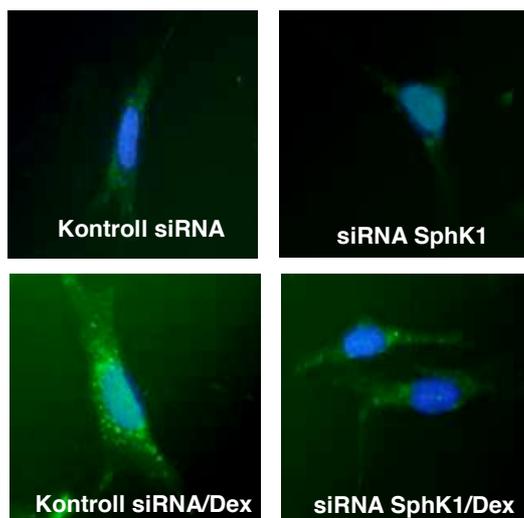


Abb. 12 Visualisierung der Dex-induzierten SphK1-Expression in Anwesenheit von SphK1 siRNA. Humane Fibroblasten wurden mit 20 nM SphK1 siRNA bzw. Kontroll siRNA nach den Angaben des Herstellers für 6 h behandelt und anschließend mit 1 μ M Dex für 8 h stimuliert. Die immunocytochemische Färbung erfolgte nach der Fixierung der Zellen mit einem SphK1-spezifischen Antikörper (grüne Fluoreszenz) und DAPI (blaue Fluoreszenz). Die Bilder veranschaulichen die Dex induzierte Expression der SphK1 in Anwesenheit von SphK1- bzw. Kontroll siRNA.

3.1.3.4 Durchflusszytometrische Analyse zur Bestimmung des Apoptoseverhaltens von mit SphK1 siRNA behandelten Fibroblasten

In einem letzten Schritt sollte nun untersucht werden, ob die Desensitivierung der SphK1 in Fibroblasten nicht nur effektiv zu einer Ausschaltung des Isoenzym und folglich zu einer Verminderung der Dex induzierten intrazellulären S1P-Spiegel führt, sondern auch das Apoptoseverhalten der Zellen beeinflussen kann. Hierzu wurden Fibroblasten mit 20 nM SphK1 siRNA oder Kontroll siRNA für 6 h behandelt und mit 1 μ M Dex für 24 h stimuliert. Die Induktion der Apoptose erfolgte durch Behandlung der Zellen mit $\text{TNF}\alpha$ in Gegenwart des Transkriptionsinhibitors Act. Die Quantifizierung apoptotischer Fibroblasten erfolgte mittels Durchflusszytometrie im Anschluss an eine Färbung der Zellen mit FITC-markiertem Annexin V und PI.

Abb. 13 spiegelt in repräsentativen Dotplots wieder, dass eine Stimulation der Fibroblasten mit $\text{TNF}\alpha$ und Act einen Anstieg der mit Annexin V gefärbten, apoptotischen sowie mit Annexin V und PI gefärbten spät-apoptotischen Zellen um ca. 80 % bewirkt. Hingegen führte eine Vorinkubation der Zellen mit 1 μ M Dex in Gegenwart von Kontroll siRNA zu einer ausgeprägten Reduktion der Anzahl an Annexin V- und PI- gefärbten Zellen. Dieser Effekt wurde unter Einwirkung von SphK1 siRNA stark zurückgedrängt.

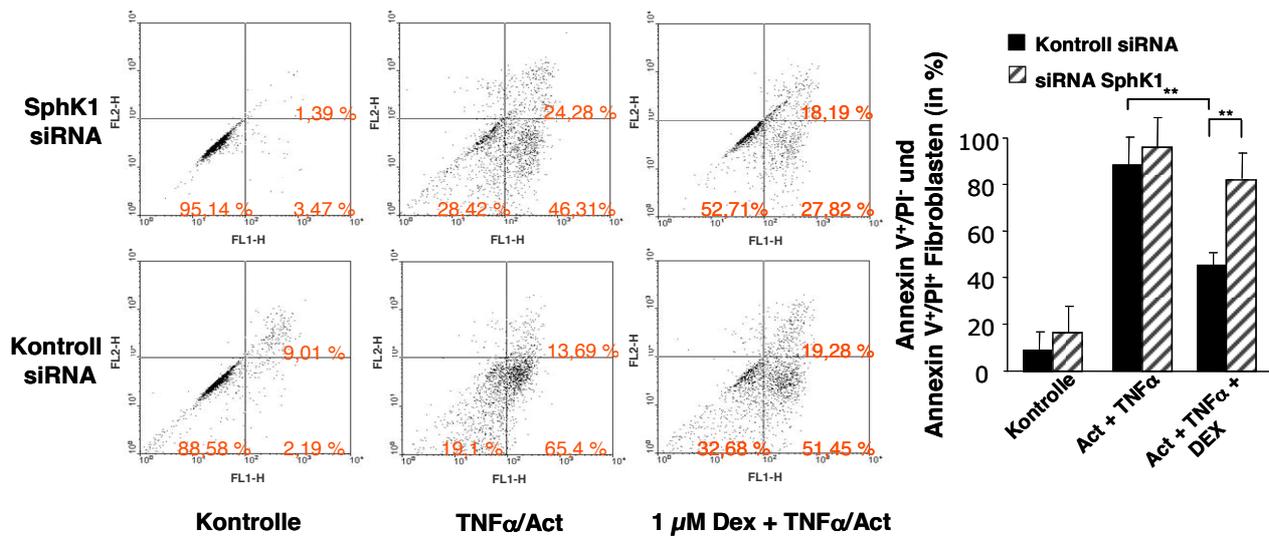


Abb. 13 Aufhebung der anti-apoptotischen Wirkung von Dex durch SphK1 siRNA. Fibroblasten wurden für 6 h mit Kontroll siRNA oder SphK1 siRNA transfiziert und anschließend mit Kontrollvehikeln, TNF α /Act oder nach einer Vorbehandlung mit 1 μ M Dex für 8 h mit TNF α /Act inkubiert. Die Apoptoserate wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Bilder repräsentieren die Dot Plots eines exemplarischen Experiments (FL1-H: Fluoreszenzintensität Annexin V-FITC; FL2-H: Fluoreszenzintensität PI). Die Graphik zeigt die Mittelwerte \pm SD einer Doppelbestimmung. Der Versuch wurde insgesamt drei Mal durchgeführt, wobei vergleichbare Ergebnisse erhalten wurden. **p < 0,01

3.2 Beteiligung des ABCC1 Transporters am anti-apoptotischen Effekt von Dex in Fibroblasten

3.2.1 Darstellung des Expressionsmusters von ABC-Transportern mittels Real-time PCR

Obwohl die Stimulation von humanen Fibroblasten mit Dex in einer Erhöhung der intrazellulären S1P-Spiegel mündet, vermittelt der Lipidmediator S1P die meisten seiner Wirkungen über membranständige S1P-Rezeptoren. Zur Zeit sind fünf S1P-Rezeptorsubtypen bekannt, welche an vielen Wirkungen des Sphingolipids, wie zum Beispiel der Migration, aber auch an pro- und anti-apoptotischen Vorgängen beteiligt sind. Allerdings konnte bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht vollständig geklärt werden, wie intrazellulär gebildetes S1P an im Extrazellularraum lokalisierten Rezeptoren wirken kann. Unlängst wurde in diesem Zusammenhang die Beteiligung der ABC-Transporter ABCC1 und ABCB1 am Export von S1P aus Mastzellen diskutiert (Mitra et al., 2006). Daher war es von Interesse, eine mögliche Beteiligung

der ABC-Transporter am anti-apoptischen Effekt von Dex in humanen Fibroblasten zu untersuchen.

Da bis zum heutigen Zeitpunkt keine Daten zur Expression der ABC-Transporter ABCC1 und ABCB1 in humanen Fibroblasten bekannt sind, wurde zunächst das Expressionsmuster der genannten Transporter in Fibroblasten analysiert. Zur Quantifizierung der mRNA-Transkripte wurden humane Fibroblasten mittels Real-time PCR auf ihren Gehalt an ABCC1- und ABCB1-mRNA hin untersucht. Wie in Abb. 14 ersichtlich, konnten beide ABC-Transporter in humanen Fibroblasten nachgewiesen werden.

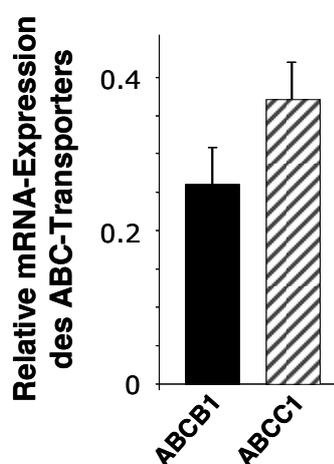


Abb. 14 Quantitative Bestimmung der Expression der ABC-Transporter ABCC1 und ABCB1 in humanen Fibroblasten. Die ABC-Transporter-spezifischen mRNA-Transkripte humaner Fibroblasten wurden mittels Real-time PCR-Analyse auf ihren Gehalt an ABCC1- und ABCB1-mRNA hin untersucht. Die Graphik zeigt die Mittelwerte \pm SD einer Doppelbestimmung. Der Versuch wurde insgesamt drei Mal durchgeführt, wobei vergleichbare Ergebnisse erhalten wurden.

3.2.2 Beeinflussung der Apoptoseinhibition von Dex durch die ABC-Transporter-Hemmstoffe MK571 und Verapamil

Nun sollten die beiden ABC-Transporter hinsichtlich einer Beteiligung am anti-apoptischen Effekt von Dex in humanen Fibroblasten untersucht werden. In diesem Zusammenhang wurden durchflusszytometrische Untersuchungen zur Analyse des Apoptoseverhaltens von Fibroblasten unter Desensitivierung des ABCC1-Transporters mittels MK571 bzw. unter Anwendung des ABCB1-Inhibitors Verapamil angefertigt. Hierzu wurden humane Fibroblasten mit 100 μ M MK571 oder 10 μ M Verapamil über einen Zeitraum von 30 Minuten vorinkubiert und anschließend für 8 h mit Dex behandelt. Die Induktion der Apoptose erfolgte durch Behandlung der Zellen mit $\text{TNF}\alpha$ in Gegenwart des Transkriptioninhibitors Act. Eine Quantifizierung apoptotischer Fibroblasten erfolgte mittels Durchflusszytometrie im Anschluss an eine Färbung der Zellen mit FITC-markiertem Annexin V und PI.

Aus Abb.15 geht hervor, dass eine Stimulation von Fibroblasten mit $\text{TNF}\alpha$ und Act einen Anstieg der mit Annexin V gefärbten, apoptotischen sowie mit Annexin V und PI gefärbten, spät-apoptotischen Population um ca. 70 % bewirkt. Eine Vorinkubation der Zellen hingegen mit $1 \mu\text{M}$ Dex allein oder in Kombination mit $10 \mu\text{M}$ Verapamil führte zu einer ausgeprägten Reduktion der Anzahl an mit Annexin V- und PI-gefärbten Zellen. Dieser Effekt konnte in Gegenwart von $100 \mu\text{M}$ MK571 nicht mehr nachgewiesen werden. Die anti-apoptotische Wirkung von Dex wurde somit, durch die Vorbehandlung der Zellen mit dem ABCC1-Transporter-Hemmstoff MK571, deutlich reduziert.

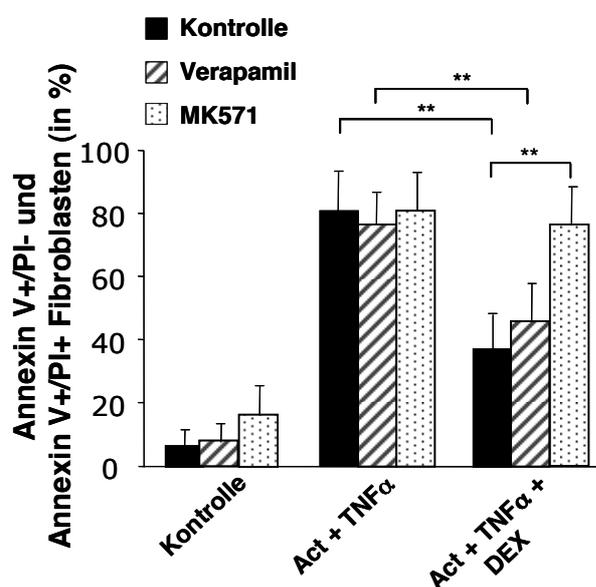


Abb. 15 FACS-Analyse des zytoprotektiven Effekts von Dex in Gegenwart von MK571 und Verapamil. Fibroblasten wurden für 30 Min mit Basalmedium, $100 \mu\text{M}$ MK571 oder $10 \mu\text{M}$ Verapamil vorbehandelt und anschließend mit Kontrollvehikeln, $\text{TNF}\alpha/\text{Act}$ oder nach einer Vorbehandlung mit $1 \mu\text{M}$ Dex für 8 h mit $\text{TNF}\alpha/\text{Act}$ inkubiert. Die Apoptoserate wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Graphik zeigt die Mittelwerte \pm SD einer Doppelbestimmung. Der Versuch wurde insgesamt drei Mal durchgeführt, wobei vergleichbare Ergebnisse erhalten wurden. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

3.2.3 Untersuchung des Effekts von ABCC1 siRNA auf das Apoptoseverhalten humaner Fibroblasten

3.2.3.1 Überprüfung der Effektivität der ABCC1 siRNA mittels Real-time PCR

Um die Beteiligung des ABC-Transporters ABCC1 am zytoprotektiven Effekt von Dex zu verifizieren, wurden weitere Analysen unter Verwendung von ABCC1 siRNA durchgeführt.

Um die Bedeutung des ABCC1 für die Dex-induzierte Apoptosereduktion herauszustellen, war es von Interesse herauszufinden, ob die Desensitivierung des ABCC1 durch spezifische siRNA auch zu einer Akkumulation von S1P in Gegenwart von Dex in der Zelle führt. Hierzu wurden Fibroblasten über einen Zeitraum von 6 h mit 20 nM ABCC1 siRNA behandelt und anschließend mit $1 \mu\text{M}$ Dex für 12 h stimuliert. Die Bestimmung des intrazellulären S1P-Gehaltes erfolgte mittels einer

HPLC-Analyse und ermöglichte die Detektion einer signifikant höheren Menge an detektierbarem S1P in mit ABCC1 siRNA behandelten Fibroblasten im Vergleich zur Verwendung von Kontroll siRNA (Abb. 16).

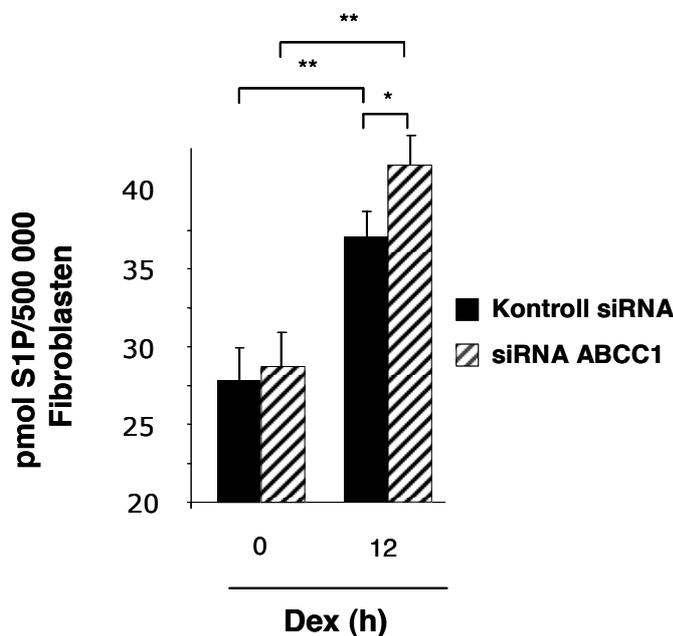


Abb. 16 Beeinflussung der intrazellulären S1P-Spiegel durch ABCC1 siRNA in Gegenwart von Dex. Humane Fibroblasten wurden für 8 h mit 20 nM ABCC1 siRNA oder Kontroll siRNA behandelt und anschließend für 12 h mit 1 μ M Dex stimuliert. Die Untersuchung der Zelllysate hinsichtlich des Gehaltes an S1P erfolgte mit Hilfe einer HPLC-Analyse. Die Graphik zeigt die Mittelwerte \pm SD einer Doppelbestimmung. Der Versuch wurde insgesamt drei Mal durchgeführt, wobei vergleichbare Ergebnisse erhalten wurden.

3.2.3.2 FACS-Analyse zur Bestimmung der Apoptoserate nach Verwendung von ABCC1 siRNA

Als weiteren Versuch zur Untersuchung des Apoptoseverhaltens von ABCC1-defizienten humanen Fibroblasten in Gegenwart von Dex wurden Zellen für 8 h mit 20 nM ABCC1- oder Kontroll siRNA behandelt und mit 1 μ M Dex oder mit einer entsprechenden Menge an Medium stimuliert. Die Induktion der Apoptose erfolgte durch Stimulation der Zellen mit $\text{TNF}\alpha$ in Gegenwart des Transkriptioninhibitors Act. Die Bestimmung apoptotischer Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie im Anschluss an eine Färbung der Zellen mit FITC-markiertem Annexin V und PI.

Abb. 17 veranschaulicht, dass eine Stimulation von Fibroblasten mit $\text{TNF}\alpha$ und Act zu einem Anstieg der mit Annexin V gefärbten, apoptotischen sowie mit Annexin V und PI gefärbten spät-apoptotischen Zellen um ca. 70 % führt. Während eine Vorinkubation der Zellen mit 1 μ M Dex in Gegenwart von Kontroll siRNA zu einer ausgeprägten Reduktion der Anzahl an Annexin V- und PI- gefärbten Zellen führte, wurde dieser Effekt unter Einwirkung von SphK1 siRNA stark reduziert. In mit

Kontroll siRNA behandelten Fibroblasten war weiterhin eine signifikante Reduktion der Apoptoserate nachweisbar.

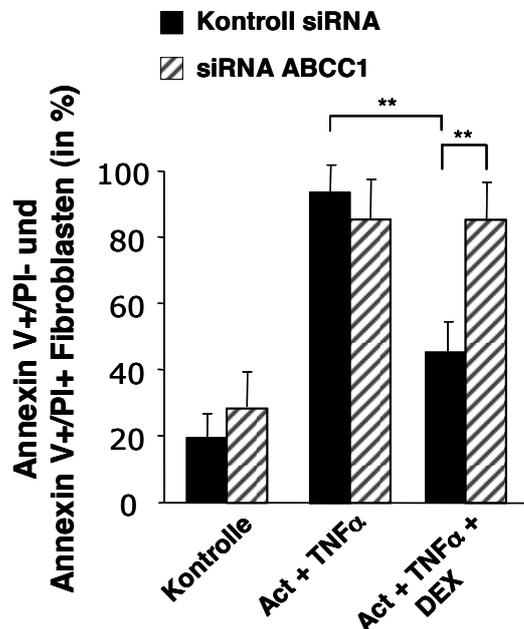


Abb. 17 Hemmung des anti-apoptotischen Effekts von Dex durch ABCC1 siRNA. Humane Fibroblasten wurden für 6 h mit ABCC1 siRNA oder Kontroll siRNA (Endkonzentration 20 nM) behandelt und mit Kontrollvehikeln, TNF α /Act Dex (1 μ M, 8 h) und TNF α /Act inkubiert. Die Bestimmung apoptotischer Zellen erfolgt mittels einer Annexin V-FITC/PI-Doppelfärbung wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben. Die Graphik zeigt die Mittelwerte \pm SD einer Doppelbestimmung. Der Versuch wurde insgesamt drei Mal durchgeführt, wobei vergleichbare Ergebnisse erhalten wurden. **p < 0,01

3.2.4 Regulation von ABCC1 durch Dex

3.2.4.1 Beeinflussung der mRNA-Spiegel von ABCC1 durch Dex

Eine Regulation von ABC-Transportern durch Glucocorticoide konnte bisher an verschiedenen Zelltypen gezeigt werden. In diesem Zusammenhang beobachteten zum Beispiel Martin et al. eine Zunahme an ABCB1-mRNA-Transkripten nach Stimulation von HepG2 oder CACO2-Zellen mit Dex (Martin et al., 2008).

Da auch in humanen Fibroblasten eine verstärkte Expression von ABCC1-mRNA als wahrscheinlich erschien, wurden die Zellen auf die Induzierbarkeit des Gehalts an ABCC1-mRNA-Transkripten durch Dex hin untersucht. Hierfür wurden Zellen in konzentrations- und zeitabhängigen Versuchen mit dem GC stimuliert und anschließend die gebildeten mRNA-Transkripte mittels Real-time PCR quantifiziert. Wie aus Abb. 18 ersichtlich, bewirkt eine Stimulation von humanen Fibroblasten mit Dex tatsächlich eine Steigerung der Bildung von ABCC1-mRNA-Transkripten, mit detektierbaren Maxima bei einer Stimulationszeit von 8 h mit einer Konzentration von 1 μ M Dex.

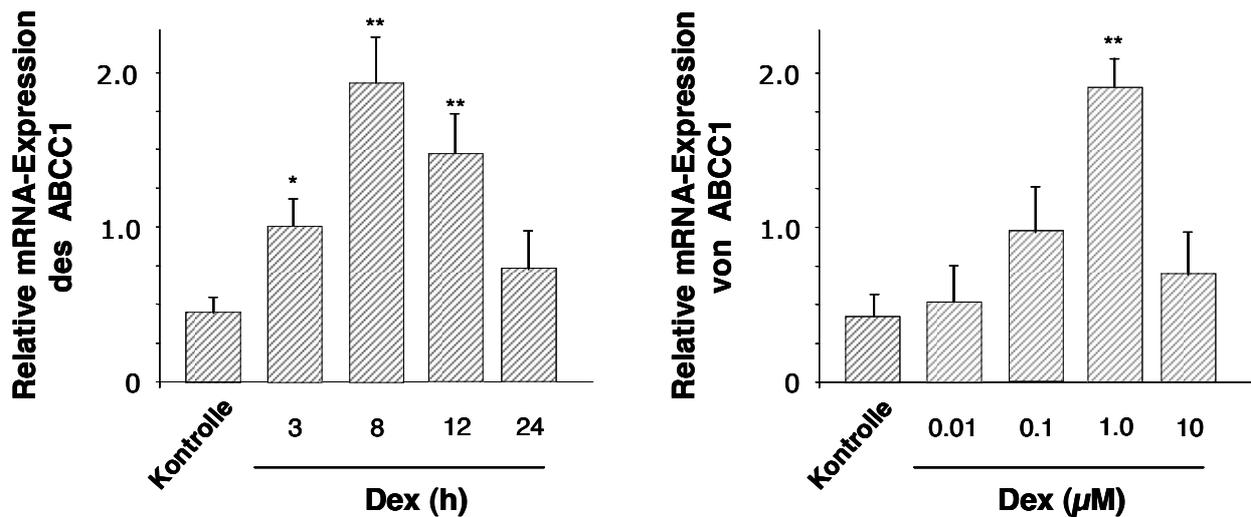


Abb. 18 Induktion des ABCC1 auf mRNA-Ebene durch Dex. Humane Fibroblasten wurden mit 1 µM Dex über einen Zeitraum von 3-24 h (A) oder über einen Zeitraum von 8 h mit verschiedenen Konzentrationen von Dex stimuliert (B). Die Quantifizierung der gebildeten mRNA-Transkripte erfolgte mittels Real-time PCR und in Gegenwart von spezifischen Primern. Die Graphiken zeigen die Mittelwerte ± SD einer Doppelbestimmung. Der jeweilige Versuch wurde insgesamt drei Mal durchgeführt, wobei vergleichbare Ergebnisse erhalten wurden.

*p < 0,05, **p < 0,01

3.2.4.2 Analyse der Proteinexpression des ABC-Transporters ABCC1 in mit Dex stimulierten Fibroblasten

Die nachgewiesene Induktion von ABCC1 mRNA durch Dex wurde nun als Anlass dafür genommen, eine mögliche Regulation des ABC-Transporters auf Protein-Ebene zu untersuchen. Folglich wurden humane Fibroblasten mit verschiedenen Konzentrationen an Dex für 8 h behandelt. Die Detektion des ABCC1-Proteins erfolgte aus den Zelllysaten mittels Western Blot-Analyse unter Anwendung spezifischer Antikörper. Wie erwartet ließ sich eine konzentrationsabhängige Regulation des ABCC1 durch Dex mit einer maximal effektiven Konzentration von 1 µM nachweisen (Abb. 19).

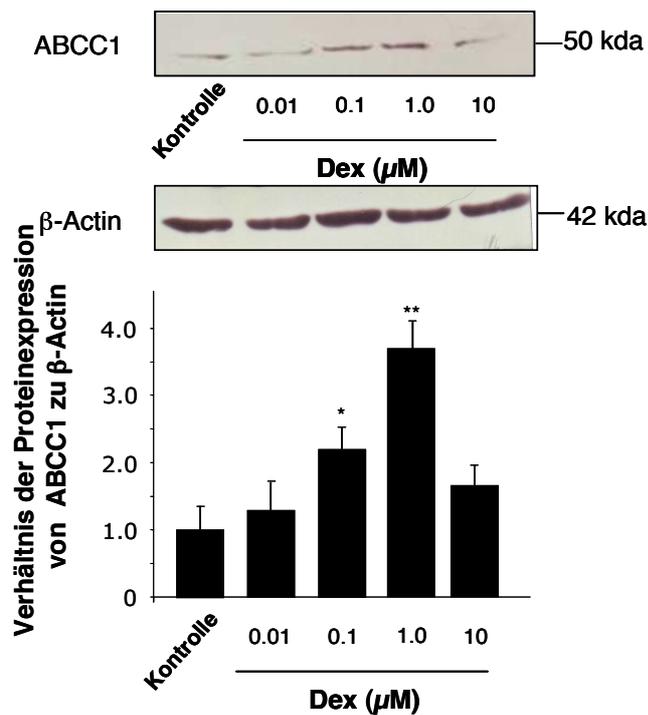


Abb. 19 Induktion des ABCC1-Proteins in humanen Fibroblasten durch Dex. Humane Fibroblasten wurden mit 1 μ M Dex über einen Zeitraum von 3-24 h stimuliert und anschließend lysiert. Die Untersuchung der Zellysate erfolgte mittels Western Blot Analyse unter Verwendung spezifischer Antikörper, wobei der ABCC1-Antikörper ein vom Hersteller spezifisches Spaltprodukt des Transporters erkennt. Die Quantifizierung erfolgte mittels einer densitometrischen Auswertung, in welcher die Expression des ABCC1 im Verhältnis zu β -Actin berechnet wurde. Die Graphik zeigt die Mittelwerte \pm SD von zwei vergleichbar durchgeführten Versuchen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

3.2.4.3 Fluoreszenzmikroskopische Analyse der ABCC1-Regulation durch Dex

Zur weiteren Verifizierung der Induktion des ABCC1 durch Dex erfolgten fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen. Hierzu wurden humane Fibroblasten mit 1 μ M Dex stimuliert und anschließend immunozytochemisch mit einem ABCC1-spezifischem Antikörper und DAPI gefärbt. Die Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop ergab eine deutliche Zunahme an grüner Fluoreszenz, welche die Expression des ABC-Transporters widerspiegelt (Abb. 20).

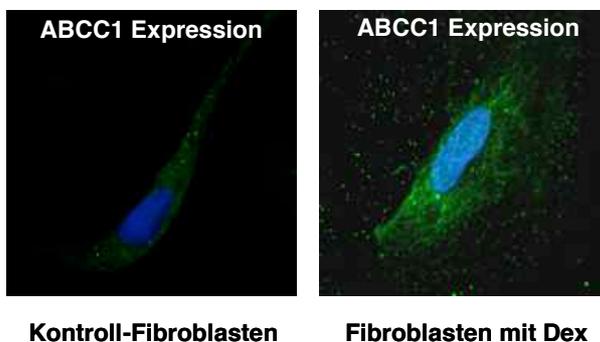


Abb. 20 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der ABCC1-Expression in Gegenwart von Dex. Humane Fibroblasten wurden in Basalmedium oder zusätzlich mit 1 μ M Dex über einen Zeitraum von 8 h inkubiert und anschließend nach Fixierung der Zellen wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben mit einem ABCC1-spezifischem Antikörper und DAPI gefärbt. Die immunozytochemische Analyse erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Keyence.

3.3 Identifizierung von S1P-Rezeptoren als essentielle Mediatoren der Dex-induzierten Hemmung des PCD

3.3.1 Analyse der Expression und Induktion von S1P-Rezeptoren in Gegenwart von Dex

Bereits seit den frühen 1990er-Jahren ist bekannt, dass S1P seine Wirkungen über extrazellulär lokalisierte S1P-Rezeptoren vermitteln kann. Außerdem wurde nicht nur eine Beteiligung von spezifischen S1P-Rezeptorsubtypen am zytoprotektiven Effekt des Lysophospholipids nachgewiesen, sondern auch eine Regulation der Rezeptorsubtypen durch den Lipidmediator etabliert.

Es stellte sich nun die Frage, ob und in welchem Ausmaß S1P-Rezeptorsubtypen in humanen Fibroblasten exprimiert werden. Zur Analyse des Expressionsmusters von S1P-Rezeptoren in humanen Fibroblasten wurden daher Zellen im Hinblick auf ihren Gehalt an, für die fünf verschiedenen Rezeptoren spezifischen mRNA-Transkripten mittels Real-time PCR untersucht. Wie aus Abb.19 ersichtlich, werden alle Rezeptorsubtypen in humanen Fibroblasten exprimiert, jedoch muss die besonders starke Expression an gemessenen S1P₃-mRNA-Transkripten hierbei herausgestellt werden.

Nachdem nun etabliert war, dass alle fünf Rezeptorsubtypen in humanen Fibroblasten exprimiert werden, war es nun in einem zweiten Schritt von Interesse zu analysieren, ob mit einer Stimulation durch Dex auch eine vermehrte Expression eines oder mehrerer S1P-Rezeptorsubtypen verbunden ist. In Anlehnung an die vorherigen Ergebnisse, konnte die ohnehin hohe Expression des S1P₃ durch eine Stimulation mit Dex noch zusätzlich verstärkt werden.

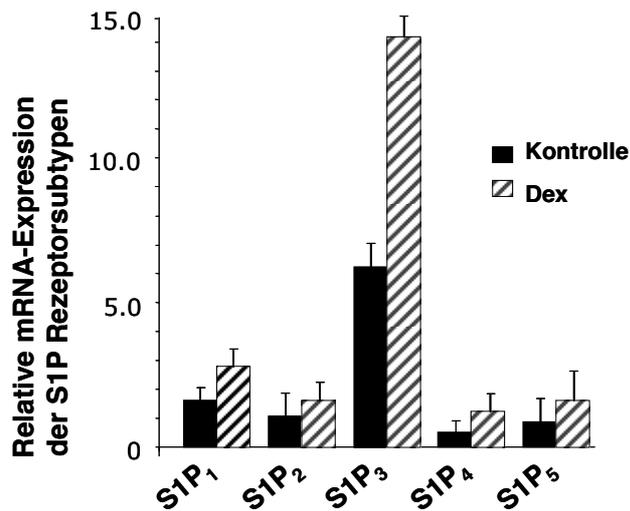


Abb. 21 Analyse des S1P-Rezeptorexpressionsmusters humaner Fibroblasten in Gegenwart von Dex. Humane Fibroblasten wurden mit Kontrollvehikeln oder 1 μ M Dex für 8 h stimuliert und anschließend mittels Real-time PCR-Analyse auf ihren Gehalt an S1P-Rezeptor-spezifischen mRNA-Transkripten hin untersucht. Die Graphik zeigt die Mittelwerte \pm SD einer Doppelbestimmung. Der Versuch wurde insgesamt drei Mal durchgeführt, wobei vergleichbare Ergebnisse erhalten wurden.

3.3.2 FACS-Analyse unter Verwendung von S1P₁₋₅-ASO

Die besondere Stellung des S1P₃-Rezeptorsubtyps für die S1P-vermittelte Mediation von zytoprotektiven Eigenschaften konnte bisher unter anderem in Endothelzellen etabliert werden (Theilmeier et al., 2006). Daher war es von Interesse herauszufinden, ob in humanen Fibroblasten der S1P₃-Rezeptorsubtyp auch am anti-apoptotischen Effekt von Dex beteiligt ist. Die Untersuchung der einzelnen Rezeptorsubtypen wurde zunächst mittels Antisense- und Kontrolloligonukleotiden durchgeführt. Hierzu wurden Zellen mit den ASO für 72 h behandelt und anschließend mit 1 μ M Dex, 10 μ M S1P oder einer entsprechenden Menge Basalmedium stimuliert. Zur Induktion der Apoptose wurden die Zellen mit TNF α in Gegenwart des Transkriptioninhibitors Act stimuliert. Die Bestimmung der Anzahl apoptotischer Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie im Anschluss an eine Färbung der Zellen mit FITC-markiertem Annexin V und PI. Wie aus Abb. 22 hervorgeht, konnte lediglich in mit S1P₃-ASO (Abb. 22E) behandelten Fibroblasten eine starke Reduktion des anti-apoptotischen Effekts von Dex gemessen werden.

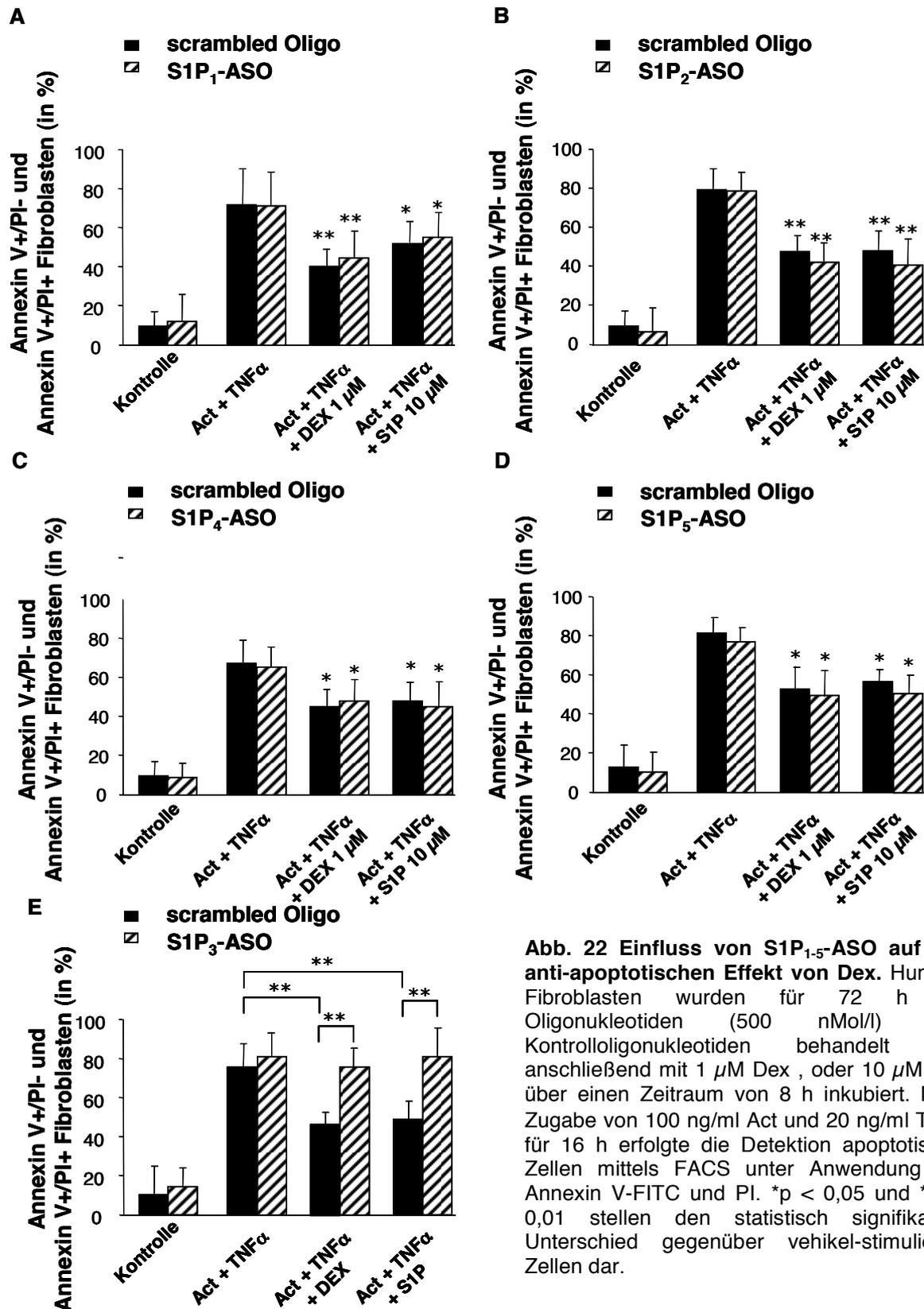


Abb. 22 Einfluss von S1P₁₋₅-ASO auf den anti-apoptischen Effekt von Dex. Humane Fibroblasten wurden für 72 h mit Oligonukleotiden (500 nMol/l) oder Kontrolloligonukleotiden behandelt und anschließend mit 1 μ M Dex, oder 10 μ M S1P über einen Zeitraum von 8 h inkubiert. Nach Zugabe von 100 ng/ml Act und 20 ng/ml TNF α für 16 h erfolgte die Detektion apoptotischer Zellen mittels FACS unter Anwendung von Annexin V-FITC und PI. * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ stellen den statistisch signifikanten Unterschied gegenüber vehikel-stimulierten Zellen dar.

3.3.3 Beeinflussung des anti-apoptotischen Effekts von Dex durch den S1P_{3/5}-Antagonisten Suramin

Zur zusätzlichen Überprüfung einer möglichen Beteiligung des S1P₃ am anti-apoptotischen Effekt von Dex in humanen Fibroblasten, wurde der Hemmstoff Suramin verwendet. Suramin ist dazu in der Lage, viele biologische Prozesse in der Zelle zu beeinflussen und ermöglicht unter anderem eine selektive Hemmung des S1P₃-/S1P₅-Rezeptorsubtyps, indem es zur Entkopplung des S1P₃ und des S1P₅ von ihren zugehörigen G-Proteinen führt (Sandhu et al., 2009). Dieser Funktionsverlust konnte unter Verwendung einer für S1P-Prozesse üblichen Endkonzentration von 10 μ M erreicht werden (Salomone et al., 2003).

Nach Vorinkubation humaner Fibroblasten mit 10 μ M Suramin für 30 Minuten erfolgte die Stimulation der Zellen mit 1 μ M Dex oder 10 μ M S1P für 8 h. Zur Induktion der Apoptose wurden die Zellen mit TNF α in Gegenwart des Transkriptionsinhibitors Act stimuliert. Die Bestimmung apoptotischer Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie im Anschluss an eine Färbung der Zellen mit FITC-markiertem Annexin V und PI. Abb. 23 veranschaulicht, dass der Einsatz von Suramin eine Nivellierung des zytoprotektiven Effekts des GC bewirkt.

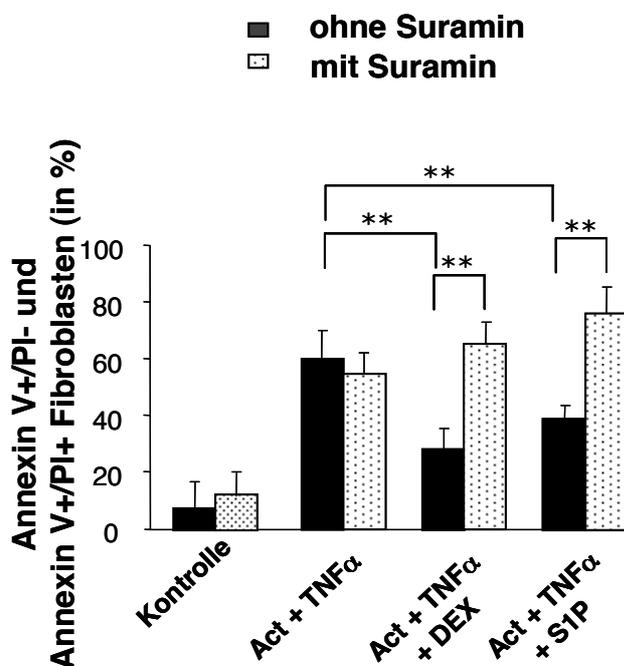


Abb. 23 Aufhebung des anti-apoptotischen Effekts von Dex durch den S1P₃-Inhibitor Suramin. Humane Fibroblasten wurden mit 10 μ M Suramin für 30 Minuten vorinkubiert und anschließend mit 1 μ M Dex oder 10 μ M S1P für 8 h stimuliert. Zur Auslösung der Apoptose wurden die Zellen mit 100 ng/ml Act und 20 ng/ml TNF α behandelt. Die Anzahl apoptotischer Zellen wurde durch eine Doppelfärbung der Zellen mittels Annexin V-FITC und PI und einer anschließenden durchflusszytometrischen Analyse ermittelt. **p < 0,01 stellt den statistisch signifikanten Unterschied gegenüber vehikel-stimulierten Zellen dar.

3.3.4 Vergleich der Dex induzierten Apoptosereduktion an Wildtyp- und S1P₃^{-/-}-Fibroblasten

In einem letzten Schritt sollte nun unter Anwendung von S1P₃^{-/-}- und entsprechenden Wildtyp-Fibroblasten die Beteiligung des S1P₃ am anti-apoptotischen Effekt von Dex in humanen Fibroblasten abgesichert werden. Hierfür wurden S1P₃^{-/-}- und Wildtyp-Fibroblasten aus Mäusehaut wie unter „Material und Methoden“ angegeben isoliert. Die Charakterisierung der S1P₃^{-/-}-Fibroblasten wurde durch eine vergleichende, fluoreszenzmikroskopische Analyse des Bindungsverhaltens eines S1P₃-Antikörpers in S1P₃^{-/-}- und Wildtyp-Fibroblasten bestätigt. Wie aus Abb. 24 ersichtlich konnte eine deutlich rote Fluoreszenz des S1P₃-Antikörpers in Wildtyp-Fibroblasten nachgewiesen werden, während in S1P₃^{-/-}-Fibroblasten eine stark geminderte Fluoreszenz sichtbar wurde.

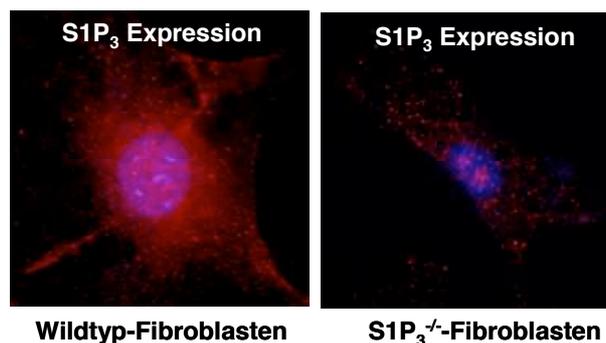


Abb. 24 Analyse der Spezifität des S1P₃-Antikörpers mittels Immunocytochemie. S1P₃^{-/-}- und Wildtyp-Fibroblasten wurden mit S1P₃-Antikörper behandelt und anschließend unter Anwendung eines geeigneten sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörpers in Gegenwart von DAPI (1 µg/ml) visualisiert.

Zur Untersuchung des anti-apoptotischen Effekts von Dex in S1P₃^{-/-}- und Wildtyp-Fibroblasten wurden beide Zellarten jeweils mit 1 µM Dex oder 10 µM S1P für 8 h inkubiert. Zur Induktion der Apoptose wurden die Zellen mit TNF α in Gegenwart des Transkriptioninhibitors Act stimuliert. Die Bestimmung apoptotischer Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie im Anschluss an eine Färbung der Zellen mit FITC-markiertem Annexin V und PI. Aus Abb. 25 geht hervor, dass der anti-apoptotische Effekt von Dex und S1P in S1P₃^{-/-}-Fibroblasten nicht mehr nachweisbar war (Abb. 25A), wohingegen der zytoprotektive Einfluss der beiden Substanzen in Wildtyp-Fibroblasten weiterhin registriert werden konnte (Abb. 25B).

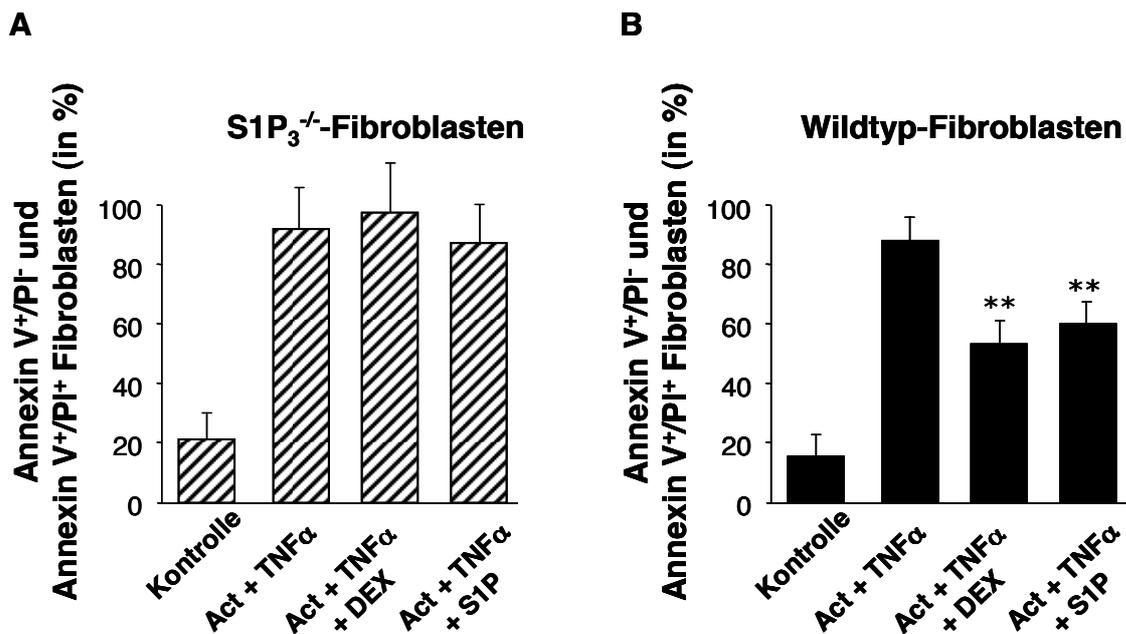


Abb. 25 Durchflusszytometrische Analyse des Effekts von Dex auf S1P₃^{-/-} (A) und Wildtyp-Fibroblasten (B) in Gegenwart von TNF α /Act. S1P₃^{-/-} und Wildtyp-Fibroblasten wurden mit 1 μ M Dex oder 10 μ M S1P für 8 h behandelt. Zur Auslösung der Apoptose wurden die Zellen mit 100 ng/ml Act und 20 ng/ml TNF α behandelt. Die Anzahl apoptotischer Zellen wurde durch eine Doppelfärbung der Zellen mittels Annexin V-FITC/PI und einer anschließenden durchflusszytometrischen Analyse ermittelt. **p < 0,01 stellt den statistisch signifikanten Unterschied gegenüber vehikel-stimulierten Zellen dar.

3.4 Beteiligung des PI3K- und PKB/Akt-Signalweges am zytoprotektivem Effekt von Dex

3.4.1 Einfluss verschiedener Inhibitoren intrazellulärer Signalwege auf den anti-apoptotischen Effekt von Dex

Es ist bekannt, dass zur Vermittlung eines zytoprotektiven Effekts viele intrazelluläre Signalwege zur Verfügung stehen. Unter anderem ist es möglich über die Aktivierung der p38 MAPK, JNK, ERK, PI3K oder über eine erhöhte Produktion von NO das Apoptoseverhalten einer Zelle zu beeinflussen (Herr et al., 2007). Daher war es von Interesse zu untersuchen, ob eine Hemmung der angegebenen Signalwege mit geeigneten Hemmstoffen den anti-apoptotischen Effekt von Dex modulieren kann. Die Inkubation von Fibroblasten mit den Hemmstoffen SB203580 (Inhibition der p38 MAPK), U0126 (Inhibition der ERK), SP600125 (Inhibition der JNK) oder L-NAME (Inhibitor der NO-Synthasen) in geeigneten Konzentrationen zeigten nach Stimulation mit 1 μ M Dex für 24 h und der anschließenden Inkubation mit 100 ng/ml Act und 20 ng/ml TNF α mittels durchflusszytometrischer Analyse keinen Effekt auf

die zytoprotektive Wirkung des GC (Abb. 26A-D). Eine analoge Durchführung des Versuchs zur Bestimmung des Apoptoseverhaltens von Fibroblasten unter Anwendung des PI3K-Inhibitors LY294002 ergab jedoch, dass der anti-apoptotische Effekt von Dex nicht mehr nachzuweisen war und somit eine Beteiligung der PI3K am zytoprotektiven Effekt des GC nachgewiesen werden konnte (Abb. 26E).

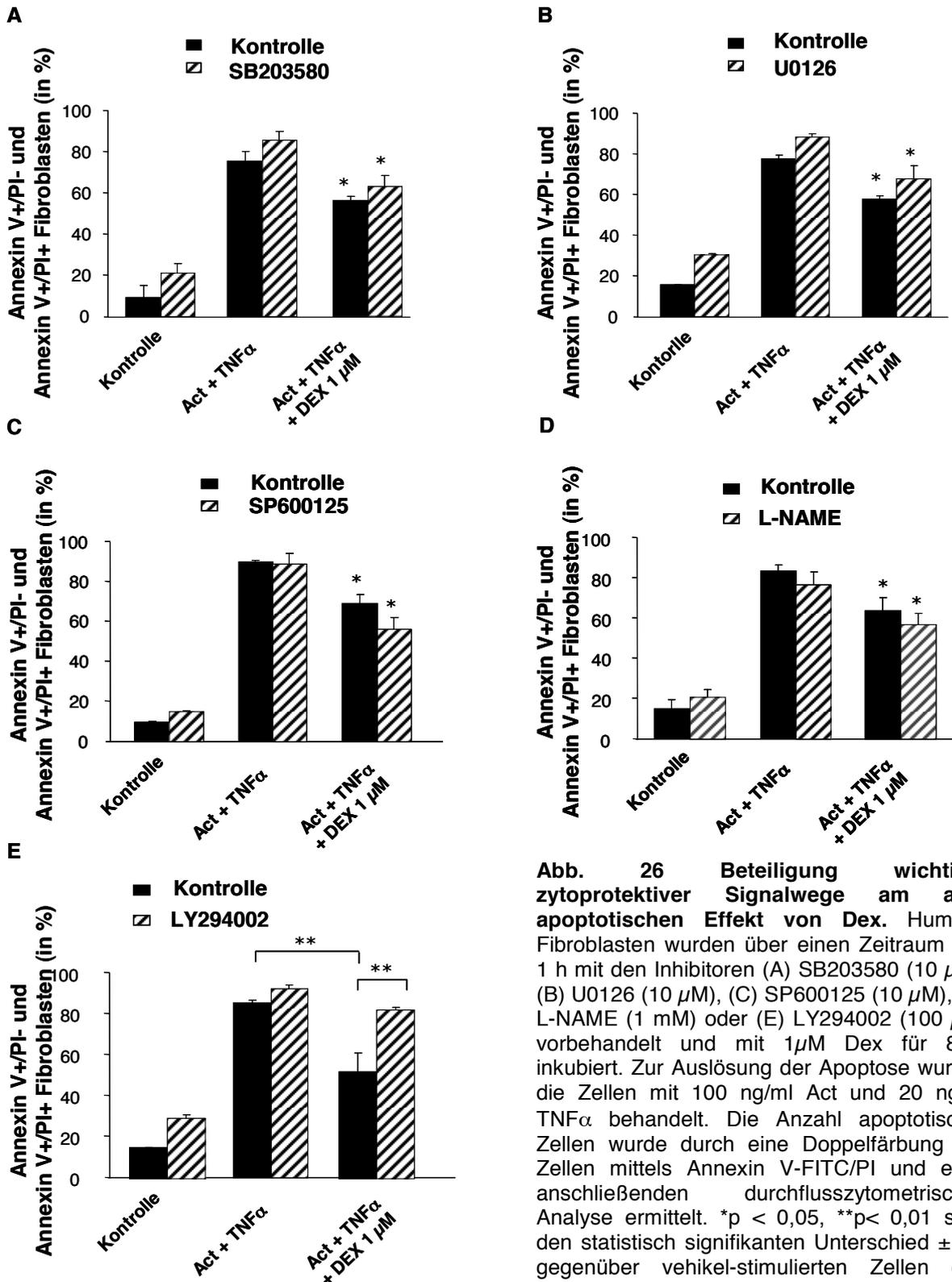


Abb. 26 Beteiligung wichtiger zytoprotektiver Signalwege am anti-apoptotischen Effekt von Dex. Humane Fibroblasten wurden über einen Zeitraum von 1 h mit den Inhibitoren (A) SB203580 (10 μ M), (B) U0126 (10 μ M), (C) SP600125 (10 μ M), (D) L-NAME (1 mM) oder (E) LY294002 (100 μ M) vorbehandelt und mit 1 μ M Dex für 8 h inkubiert. Zur Auslösung der Apoptose wurden die Zellen mit 100 ng/ml Act und 20 ng/ml TNF α behandelt. Die Anzahl apoptotischer Zellen wurde durch eine Doppelfärbung der Zellen mittels Annexin V-FITC/PI und einer anschließenden durchflusszytometrischen Analyse ermittelt. *p < 0,05, **p < 0,01 stellt den statistisch signifikanten Unterschied \pm SD gegenüber vehikel-stimulierten Zellen dar.

3.4.2 Desensitivierung der Akt-Kinase

Die PI3K spielt eine wichtige Rolle für die Aktivierung mitogener Signalwege oder auch für den Schutz einer Zelle vor dem PCD. Darüber hinaus konnte bereits gut etabliert werden, dass die PI3K über die Bildung ihres Produktes PIP3 die Initiation der Proteinkinase B, auch Akt-Kinase genannt, bewirkt. Diesem PI3K/Akt-Signalweg kommt bei der Auslösung der Apoptose oder der Inhibition des PCD ein besonderer Stellenwert zu (Wymann et al., 2003). Die Bedeutung des PI3K/Akt-Signalweges für den anti-apoptotischen Effekt von Dex in humanen Fibroblasten sollte daher im Folgenden untersucht werden.

Wie bereits gezeigt werden konnte, ist die Aktivität der Akt-Kinase mitunter entscheidend für zytoprotektive Zellvorgänge (Park et al., 2009). Daher war es von Interesse zu untersuchen, ob eine Desensitivierung der Akt-Kinase auch Einfluss auf das Dex-induzierte Apoptoseverhalten humaner Fibroblasten aufweist.

Zunächst sollte die Funktionalität, der in den folgenden Versuchen verwendeten Akt siRNA überprüft werden. Zur Bestimmung der maximal effektiven siRNA-Konzentration wurden humane Fibroblasten mit verschiedenen Konzentrationen an Akt siRNA nach den Angaben des Herstellers für 6 h behandelt und anschließend mittels einer Real-time PCR-Analyse die gebildete Menge an Akt mRNA-Transkripten bestimmt. Die Abb. 27 veranschaulicht dabei, dass ab einer Konzentration von 20 nM Akt siRNA die Bildung von Akt mRNA deutlich reduziert wurde und sogar bei einer angewendeten Konzentration von 40 nM Akt siRNA nahezu vollständig aufgehoben werden konnte.

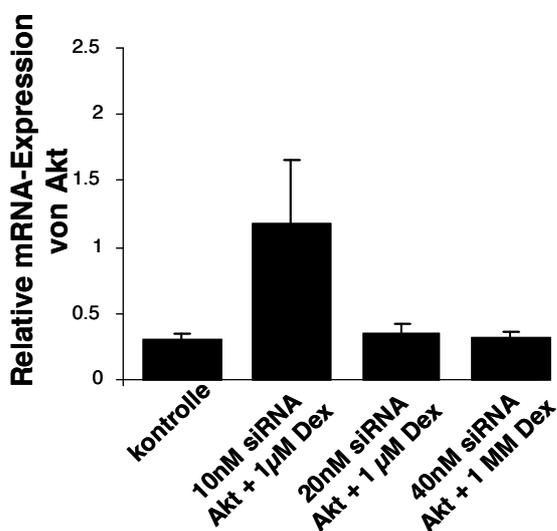


Abb. 27 Ermittlung der effektiven Konzentration an Akt siRNA. Humane Fibroblasten wurden mit Kontrollvehikeln, 10 nM, 20 nM oder 40 nM Akt siRNA nach den Angaben des Herstellers für 6 h vorbehandelt und daraufhin die Menge an gebildeten Akt mRNA-Transkripten mittels Real-time PCR quantifiziert. Die Graphik zeigt die Mittelwerte \pm SD einer Doppelbestimmung. Der Versuch wurde insgesamt drei Mal durchgeführt, wobei vergleichbare Ergebnisse erhalten wurden.

Als nächstes schloss sich eine Analyse des Apoptoseverhaltens humaner Fibroblasten unter Verwendung von Akt siRNA in Gegenwart von Dex an. Wie dem Diagramm der Abb. 28 zu entnehmen ist, konnte das GC in einer durchflusszytometrischen Analyse in mit Kontroll siRNA behandelten Zellen eine starke anti-apoptotische Wirkung hervorrufen. In Anwesenheit von Akt siRNA allerdings, wurde der zytoprotektive Effekt von Dex nahezu vollständig aufgehoben.

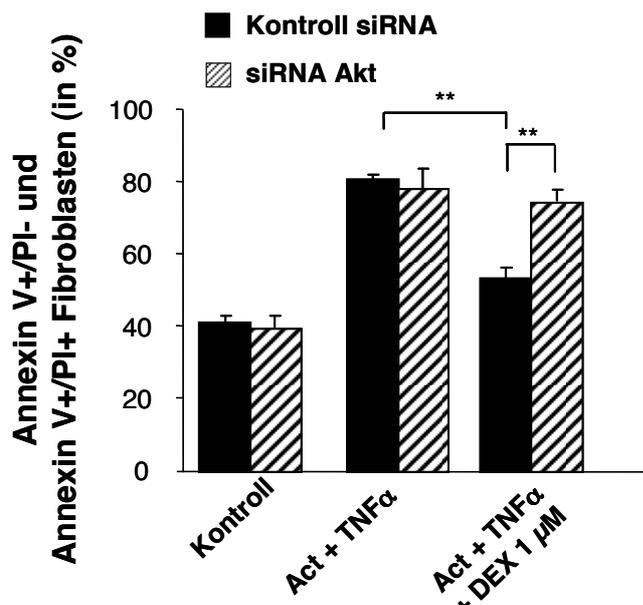


Abb. 28 Beeinflussung des anti-apoptotischen Effekts von Dex durch Akt siRNA. Humane Fibroblasten wurden für 6 h mit Kontroll- oder Akt siRNA (Endkonzentration 40 nM) behandelt und anschließend mit 1 μ M Dex für 7 h inkubiert. Zur Auslösung der Apoptose wurden die Zellen mit 100 ng/ml Act und 20 ng/ml TNF α behandelt. Die Anzahl apoptotischer Zellen wurde durch eine Doppelfärbung der Zellen mittels Annexin V-FITC/PI und einer anschließenden durchflusszytometrischen Analyse ermittelt. **p < 0,01 stellt den statistisch signifikanten Unterschied gegenüber vehikel-stimulierten Zellen dar.

3.4.3 Regulation der Akt-Kinase durch Dex auf mRNA-Ebene

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Akt nicht nur eine Schlüsselfunktion zur Inhibierung der Apoptose wahrnimmt, sondern die Proteinkinase auch gleichzeitig durch verschiedene Stimulanzen induziert werden kann (Fujio et al., 1999; Xilouri and Papazafiri, 2008). Daher war es von Interesse zu untersuchen, ob der Proteinkinase nicht nur eine entscheidende Funktion für den anti-apoptotischen Effekt von Dex zukommt, sondern auch eine Regulation der Akt-Kinase durch Dex möglich ist. Aus diesem Grund wurden Fibroblasten konzentrations- und zeitabhängig mit dem GC stimuliert und die Bildung der Akt mRNA-Transkripte mittels Real-time PCR quantifiziert. Abb. 29 veranschaulicht, dass eine Stimulation von Fibroblasten mit dem GC zu einer deutlichen Induktion der Bildung von Akt-mRNA-Transkripten mit maximal nachweisbaren Effekten bei einer Konzentration von 1 μ M Dex für 8 h führt.

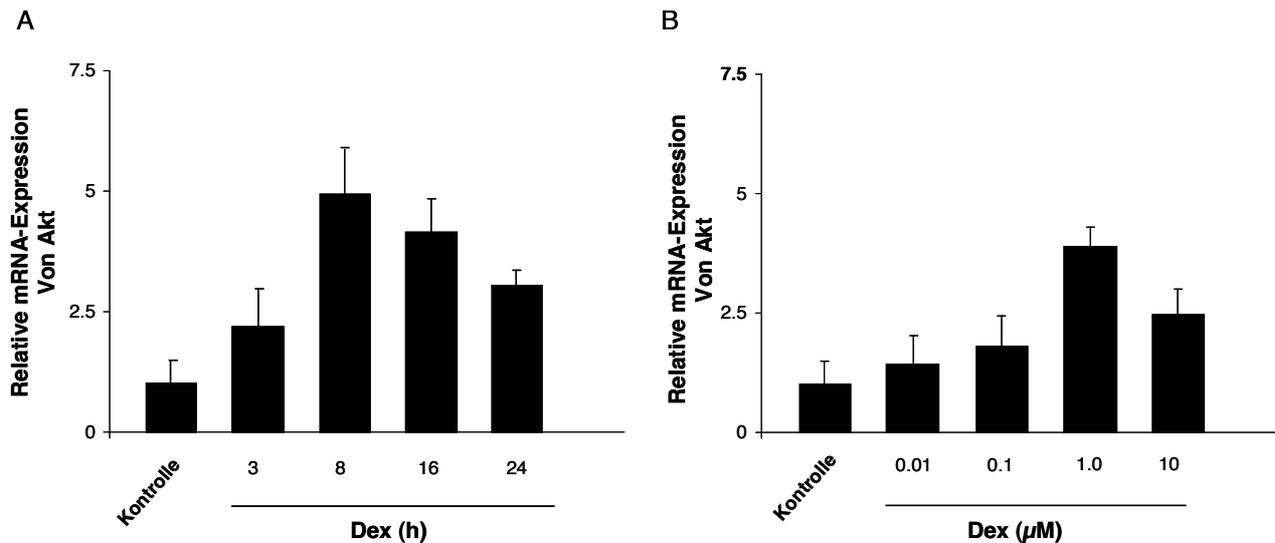


Abb. 29 Regulation der Akt mRNA durch Dex. Humane Fibroblasten wurden über einen Zeitraum von 0-24 h mit einer Konzentration von 1 µM Dex (A) oder mit einer Konzentration von 0-10 µM Dex für 8 h vorinkubiert. Die Quantifizierung der gebildeten mRNA-Transkripte erfolgten in Gegenwart von spezifischen Primern mittels Real-time PCR. Die Graphiken zeigen die Mittelwerte ± SD einer Doppelbestimmung. Der jeweilige Versuch wurde insgesamt drei Mal durchgeführt, wobei vergleichbare Ergebnisse erhalten wurden. *p < 0,05, **p < 0,01

3.4.4 Induktion der Akt Proteinexpression durch Dex und die Bedeutung des Lipidmediators S1P

Da nun bereits gezeigt werden konnte, dass Dex eine Induktion der Akt-Kinase auf mRNA-Ebene bewirkt, sollte in einem nächsten Schritt untersucht werden, ob damit auch eine verstärkte Expression des aktivierten Akt-Proteins, nämlich P-Akt, verbunden ist. Dazu wurden Fibroblasten mit Dex nach einem konzentrations- und zeitabhängigem Muster stimuliert und die Menge an gebildetem P-Akt-Protein aus den Zelllysaten mittels einer Western Blot-Analyse bestimmt. Wie zu erwarten, bewirkte die Simulation von Fibroblasten mit Dex eine deutliche Steigerung der P-Akt-Expression mit einem maximal detektierbarem Effekt des GC bei einer Konzentration von 1 µM und 1 h bzw. 16 h Inkubationszeit (Abb. 30).

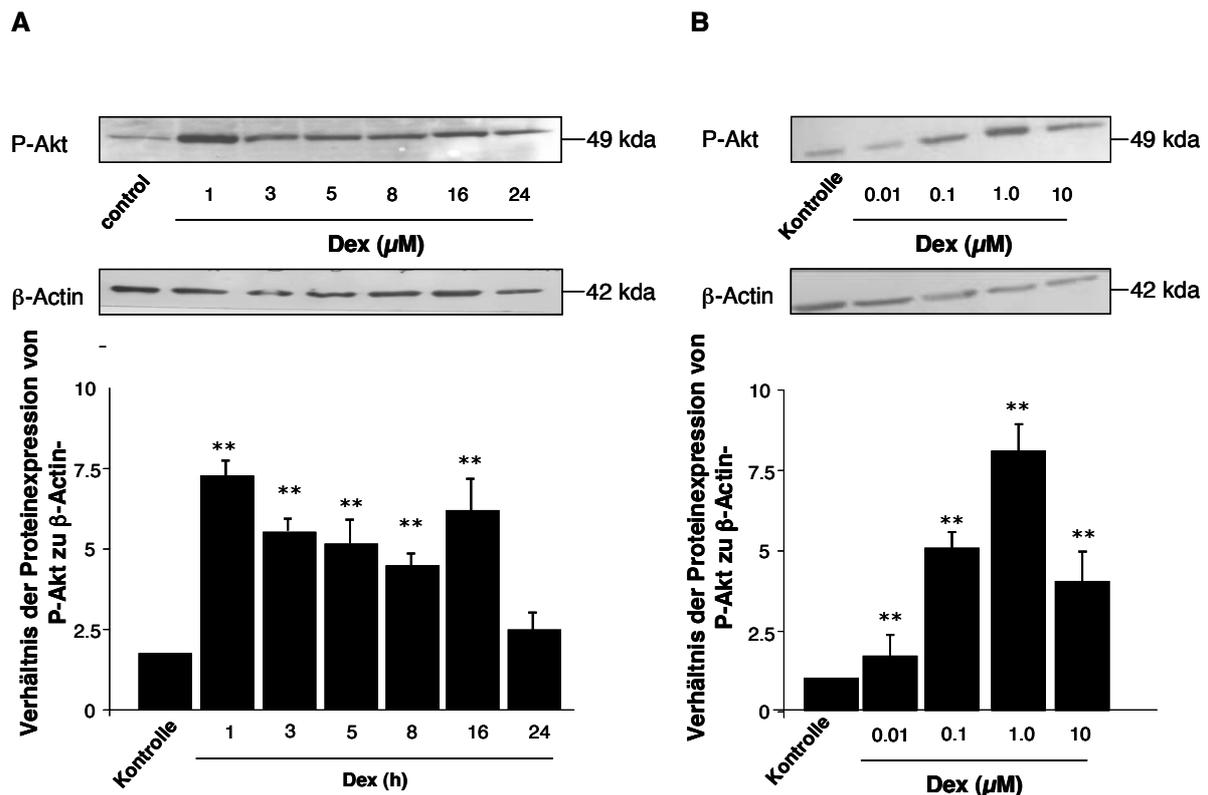


Abb. 30 Regulation der Akt-Proteinexpression durch Dex. Humane Fibroblasten wurden über einen Zeitraum von 0-24 h mit 1 μM Dex (A) oder einer Konzentration von 0-10 μM Dex über einen Zeitraum von 8 h (B) inkubiert. Die Untersuchung der Zellysate erfolgte mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung spezifischer Antikörper, wobei der P-Akt-Antikörper die vom Hersteller angegebene Phosphorylierungsstelle an der Aminosäure Ser⁴⁷³ erkennt (A). Die Quantifizierung erfolgte mittels einer densitometrischen Auswertung, in welcher die Expression von P-Akt im Verhältnis zu β -Actin bestimmt wurde. Die Graphiken zeigen die Mittelwerte \pm SD von je zwei vergleichbar durchgeführten Versuchen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Um die Beteiligung der Akt-Kinase am anti-apoptotischen Effekt von Dex genauer zu analysieren, schlossen sich als nächstes Untersuchungen der Akt-Proteinexpression in Gegenwart des Lipidmediators S1P an. Die zu Grunde liegende Überlegung für diesen Versuch bestand darin, dass Dex in einem ersten Schritt, wie bereits ausgeführt, zu einer verstärkten Bildung des Lysophospholipids beiträgt. Dieses wird dann unter Beteiligung des ABC-Transporters ABCC1 in den Extrazellularraum transportiert und kann dort den S1P₃-Rezeptorsubtyp aktivieren und über die PI3K zu einer gesteigerten Expression der aktiven Akt-Kinase führen. Damit aber eindeutig nachgewiesen werden kann, dass die Regulation des Akt-Proteins über die Dex-induzierte S1P-Bildung hervorgerufen wird, sollte die zeitliche Phosphorylierung der Akt-Kinase (P-Akt) durch S1P untersucht und mit der Aktivierung von P-Akt durch Dex verglichen werden. Wie aus Abb. 31 hervorgeht, bewirkt die Stimulation von

Fibroblasten mit dem Lipidmediator S1P eine Aktivierung der Akt-Kinase, welche mit dem Effekt von Dex vergleichbar ist.

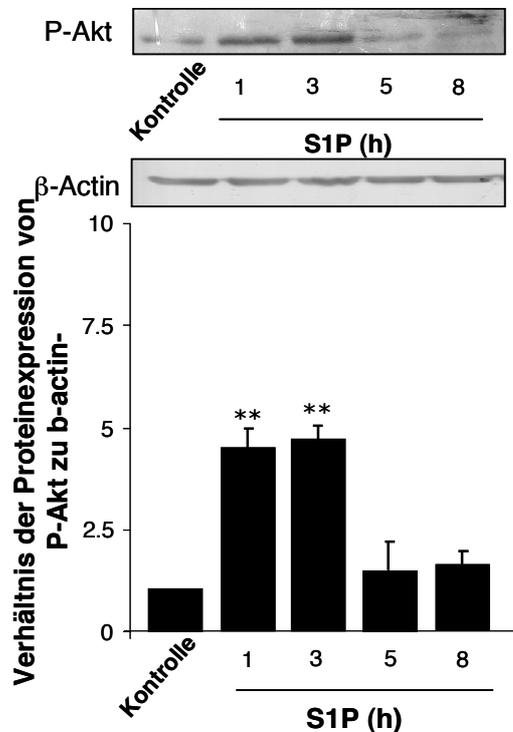


Abb. 31 Zeitliche Beeinflussung der Phosphorylierung von Akt durch S1P. Humane Fibroblasten wurden über einen Zeitraum von 0-8 h mit 10 μ M S1P behandelt. Die Untersuchung der Zellysate erfolgte mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung spezifischer Antikörper, wobei der P-Akt-Antikörper die vom Hersteller angegebene Phosphorylierungsstelle an der Aminosäure Ser⁴⁷³ erkennt. Die Quantifizierung erfolgte mittels einer densitometrischen Auswertung, in welcher die Expression von P-Akt im Verhältnis zu β -Actin ausgewertet wurde. Die Graphik zeigt die Mittelwerte \pm SD von zwei vergleichbar durchgeführten Versuchen **p < 0,01

3.4.5 Veränderung der Dex-induzierten PKB/Akt-Regulation in Wildtyp- und S1P₃^{-/-}-Fibroblasten

Um die Beteiligung der Akt-Kinase am anti-apoptotischen Effekt von Dex, der eine über die Bildung von S1P, sowie die Aktivierung des S1P₃ beinhaltet, zu untermauern, schlossen sich Versuche mit S1P₃^{-/-} und Wildtyp-Fibroblasten an. Die nähere Untersuchung der Expression der Akt-Kinase in Gegenwart von Dex mittels Western Blot-Analyse ergab, dass wie zu erwarten eine starke Regulation der aktiven Akt-Kinase in Wildtyp-Fibroblasten (Abb. 32A,C) erfolgte, welche in S1P₃^{-/-}-Fibroblasten allerdings nicht mehr detektiert werden konnte (Abb. 32B,D).

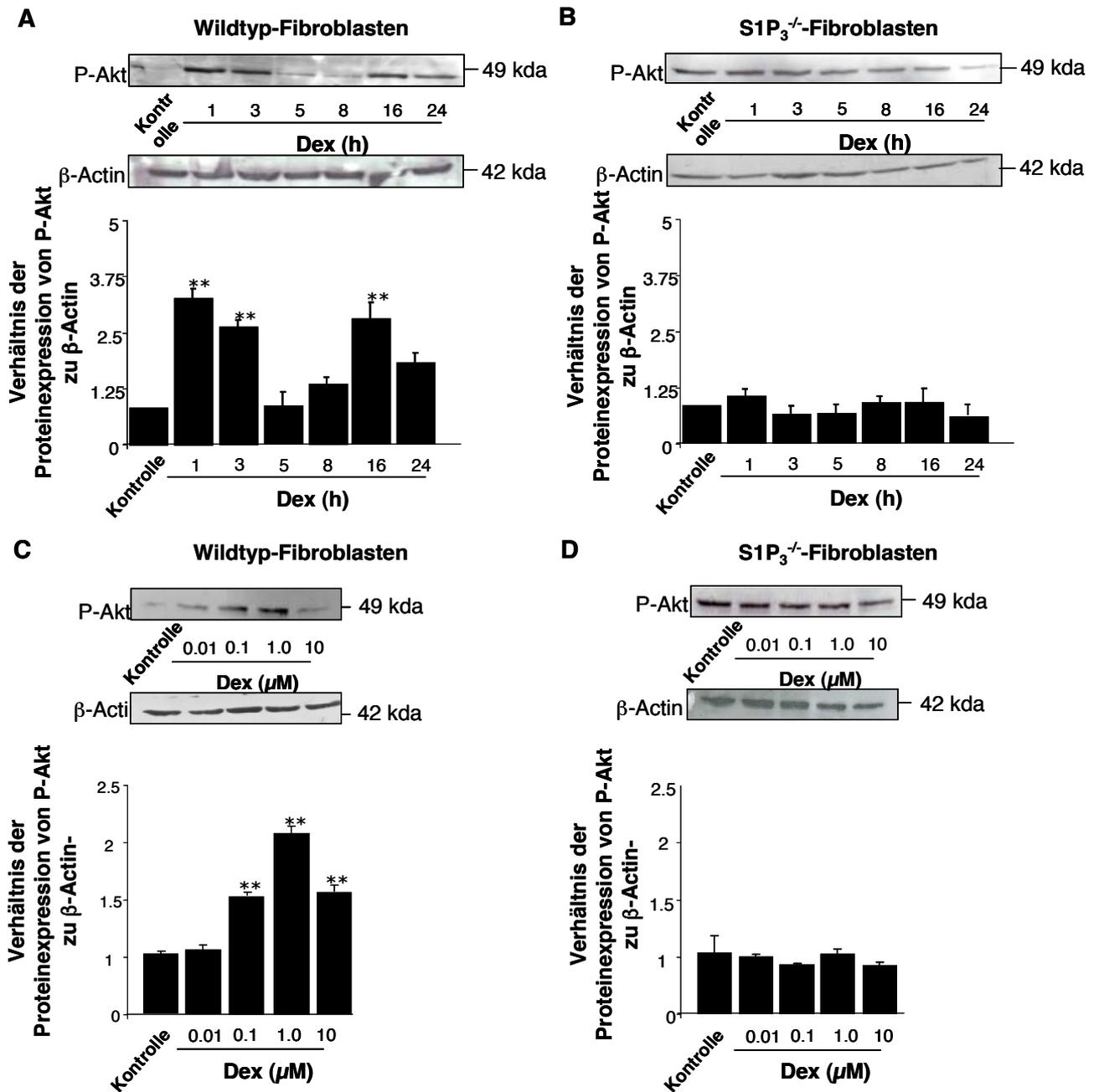


Abb. 32 Beeinflussung der Akt-Kinase durch Dex in S1P₃^{-/-}- und Wildtyp-Fibroblasten. Wildtyp-Fibroblasten (A, C) und S1P₃^{-/-} (B, D) wurden für 8 h mit 0-10 μM Dex (A, B) oder über einen Zeitraum von 8 h mit 0-10 μM Dex (C, D) stimuliert. Die Untersuchung der Zelllysate erfolgte mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung spezifischer Antikörper, wobei der P-Akt-Antikörper die vom Hersteller angegebene Phosphorylierungsstelle an der Aminosäure Ser⁴⁷³ erkennt. Die Quantifizierung erfolgte mittels einer densitometrischen Auswertung, in welcher die Expression von P-Akt im Verhältnis zu β-Actin angegeben wird. Die Graphiken zeigen die Mittelwerte ± SD von jeweils drei vergleichbar durchgeführten Versuchen. **p < 0,01

3.5 Beteiligung von Bcl_{XL} am anti-apoptotischen Effekt von Dex

3.5.1 Analyse der Beeinflussung des Proteins Bcl_{XL} durch Dex mittels Real-time PCR

Die Bcl-2-Familie repräsentiert eine Gruppe von Proteinen, welcher in Bezug auf die Regulation des PCD im Mitochondrium sowohl apoptotische als auch zellschützende Eigenschaften zugeschrieben wurden. Darüber hinaus konnte bereits eingehend gezeigt werden, dass das Protein Bcl_{XL} Teil der durch die PI3K/Akt initiierten Signalkaskade ist. Weiterhin kommt Bcl_{XL} eine wichtige Funktion im anti-apoptotischen Zusammenspiel der mitochondrialen Proteine zu (Datta et al., 1999). Daher sollte im Folgenden die Beteiligung von Bcl_{XL} am anti-apoptotischen Effekt von Dex in humanen Fibroblasten untersucht werden.

Wie aus der Abb. 33 hervorgeht, bewirkt eine konzentrations- und zeitabhängige Stimulation humaner Fibroblasten mit Dex tatsächlich eine Induktion der gebildeten Bcl_{XL} mRNA. Die Quantifizierung der gebildeten mRNA-Transkripte erfolgte dabei mittels einer Real-time PCR-Analyse.

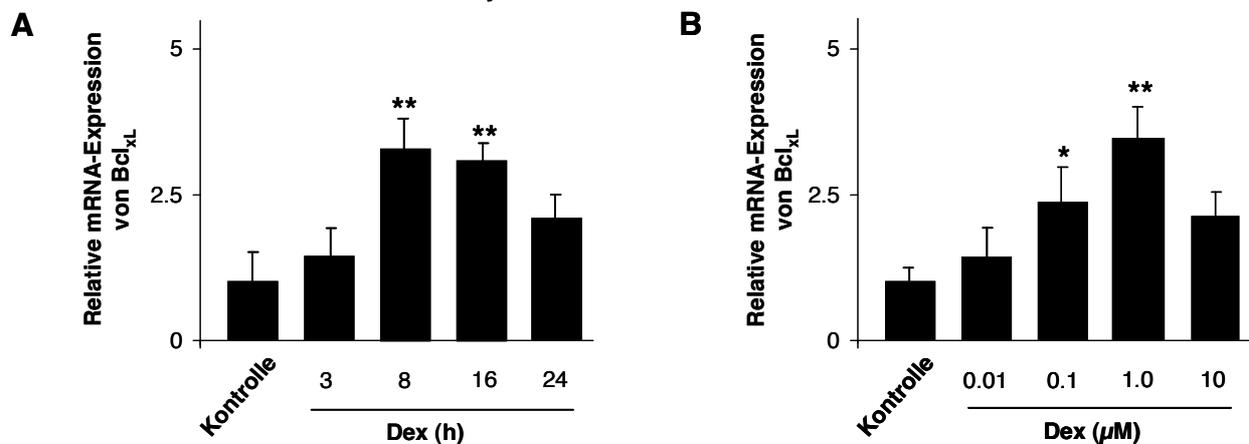


Abb. 33 Beeinflussung der Bcl_{XL} mRNA-Bildung durch Dex. Humane Fibroblasten wurden mit 1 µM Dex über einen Zeitraum von 0-24 h (A) oder mit einer Konzentration von 0-10 µM Dex für 8 h (B) vorinkubiert. Die Quantifizierung der gebildeten mRNA-Transkripte erfolgte in Gegenwart von spezifischen Primern mittels Real-time PCR. Die Graphiken zeigt die Mittelwerte ± SD einer Doppelbestimmung. Der jeweilige Versuch wurde insgesamt drei Mal durchgeführt, wobei vergleichbare Ergebnisse erhalten wurden. *p < 0,01. **p < 0,01

3.5.2 Veränderung der Expression des Proteins Bcl_{XL} der Bcl-2-Familie in Anwesenheit von Dex

Da nun bereits gezeigt werden konnte, dass Dex eine Induktion von Bcl_{XL} auf mRNA-Ebene bewirkt, sollte in einem nächsten Schritt untersucht werden, ob damit auch

eine verstärkte Expression des Bcl_{XL}-Proteins verbunden ist. Dazu wurden Fibroblasten mit Dex nach einem konzentrations- und zeitabhängigen Muster stimuliert und die Menge an gebildetem Bcl_{XL}-Protein aus den Zelllysaten mittels einer Western Blot-Analyse bestimmt. Wie zu erwarten, bewirkte die Stimulation von Fibroblasten mit Dex eine deutliche Steigerung der Bcl_{XL}-Expression mit einem maximal detektierbarem Effekt des GC bei einer Konzentration von 1 μ M und 16 h Inkubationszeit (Abb. 34).

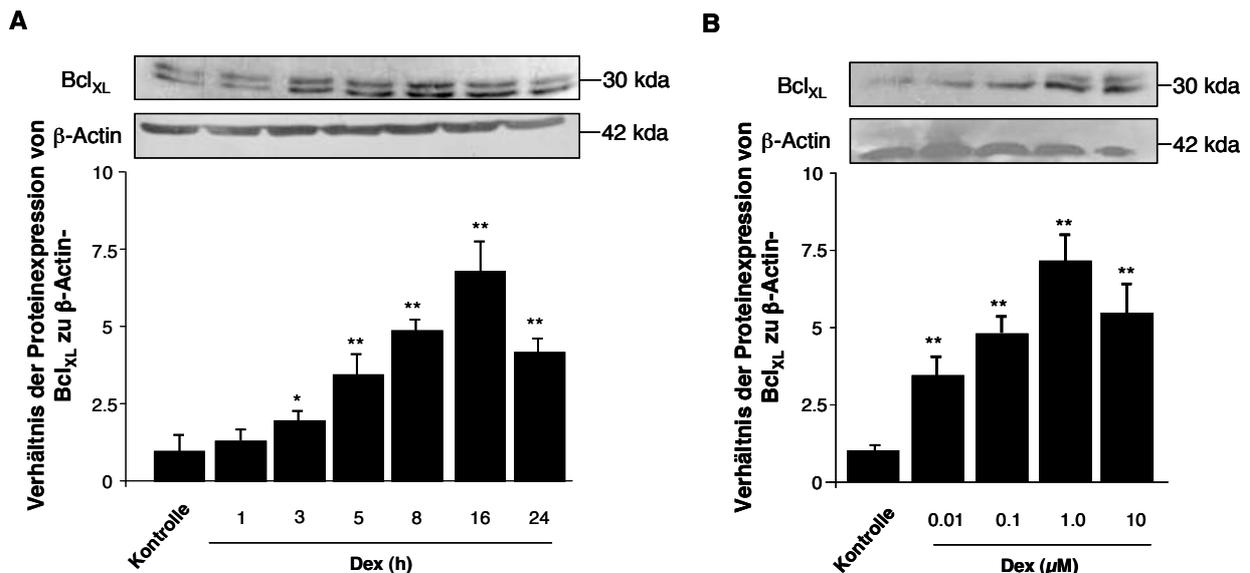


Abb. 34 Regulation der Bcl_{XL}-Proteinexpression durch Dex. Humane Fibroblasten wurden über einen Zeitraum von 0-24 h mit 1 μ M Dex (A) oder einer Konzentration von 0-10 μ M Dex über einen Zeitraum von 8 h (B) inkubiert. Die Untersuchung der Zelllysate erfolgte mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung spezifischer Antikörper. Die Quantifizierung erfolgte mittels einer densitometrischen Auswertung, in welcher die Expression von Bcl_{XL} im Verhältnis zu β -Actin berechnet wird. Die Graphiken zeigen die Mittelwerte \pm SD von jeweils drei vergleichbaren Versuchen.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

3.5.3 Beeinflussung der Dex-induzierten Bcl_{XL}-Proteinsynthese durch den PI3K-Hemmstoff LY294002

Nun stellte sich die Frage, ob die durch das GC hervorgerufene Induktion von Bcl_{XL} auf die vorherige Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges zurück zu führen ist, oder ob andere intrazelluläre Mediatoren wie zum Beispiel Nf κ B für die Aktivierung des Bcl-2-Familienproteins in Frage kommen (Zender et al., 2005). Dazu wurde die Expression von Bcl_{XL} nach Stimulation mit Dex in Anwesenheit des PI3K-Hemmstoffes LY294002 untersucht. Wie aus Abb. 35 hervorgeht, konnte die Aktivierung dieses Proteins der Bcl-2-Familie in Anwesenheit von LY294002 nicht mehr nachgewiesen werden.

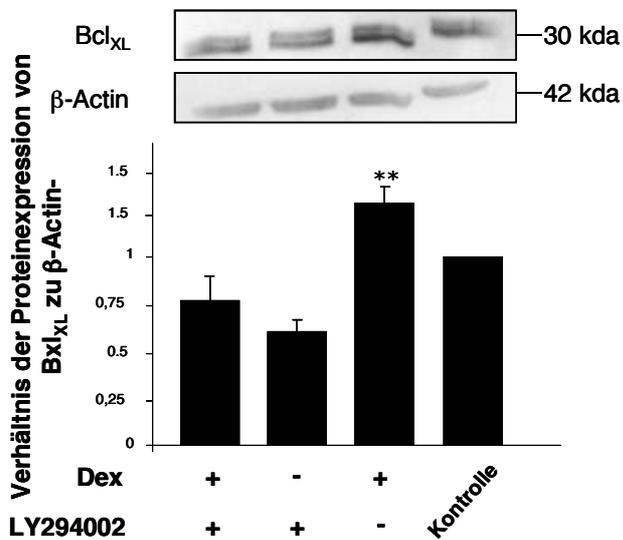


Abb. 35 Einfluss des PI3K-Hemmstoffes LY294002 auf die Proteinexpression von Bcl_{XL} in Gegenwart von Dex. Humane Fibroblasten wurden für 1 h mit LY294002 (100 μ M) vorbehandelt und anschließend mit 1 μ M Dex oder Vehikel für 16 h inkubiert. Die Untersuchung der Zelllysate erfolgte mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung spezifischer Antikörper. Die Quantifizierung erfolgte mittels einer densitometrischen Auswertung, in welcher die Expression von Bcl_{XL} im Verhältnis zu β -Actin angegeben wird. Die Graphik zeigt die Mittelwerte \pm SD von drei vergleichbar durchgeführten Versuchen. **p < 0,01

3.5.4 Bestimmung des Bcl_{XL}-Proteins in Wildtyp- und S1P₃^{-/-}-Fibroblasten in Anwesenheit von Dex

Um die Beteiligung des PI3K/Akt-Signalweges an der S1P-vermittelten, anti-apoptotischen Wirkung von Dex an einer zweiten entscheidenden Signalwegeschnittstelle abzusichern, erfolgten Untersuchungen zur Dex-induzierten Regulation von Bcl_{XL} an S1P₃^{-/-}- und Wildtyp-Fibroblasten. Dabei wurden die genannten Zelltypen konzentrations- und zeitabhängig mit Dex stimuliert und die Menge an gebildetem Bcl_{XL}-Protein aus den Zelllysaten mittels einer Western Blot-Analyse bestimmt. Wie zu erwarten, bewirkte die Stimulation mit Dex in Wildtyp-Fibroblasten eine deutliche Induktion der Expressierung des Proteins der Bcl-2-Familie mit einem maximal nachweisbarem Effekt auf die Bcl_{XL}-Expression bei einer Stimulation mit 1 μ M Dex über einen Zeitraum von 16 h (Abb. 36A,C). Die Analyse von S1P₃^{-/-}-Fibroblasten identifizierte hingegen keine signifikanten Regulationen von Bcl_{XL} (Abb. 36B,D).

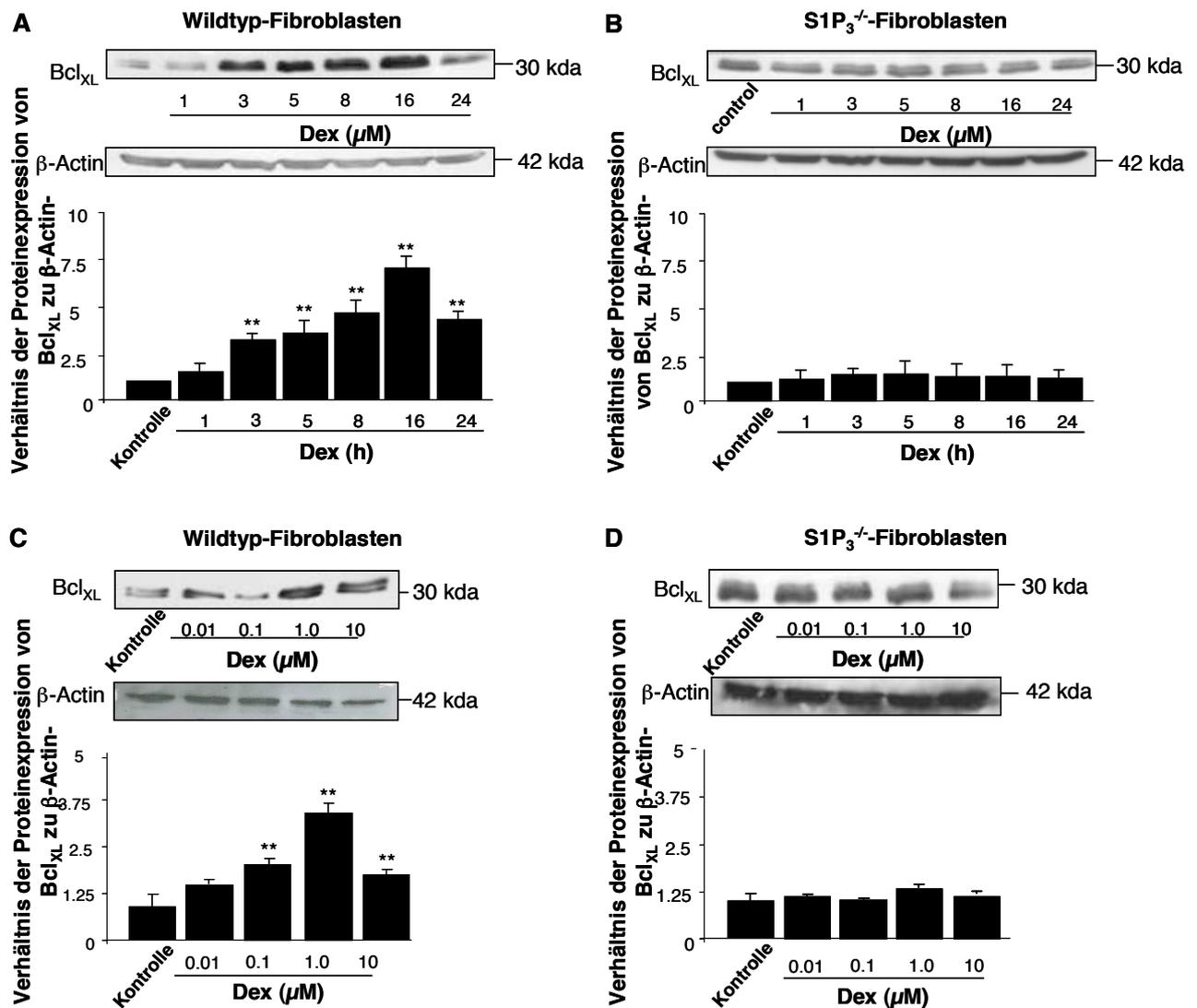


Abb. 36 Beeinflussung von Bcl_{XL} durch Dex in S1P₃^{-/-}- und Wildtyp-Fibroblasten. Wildtyp-Fibroblasten (A,C) und S1P₃^{-/-}-Fibroblasten (B,D) wurden über einen Zeitraum von 0-24 h mit 1 μM Dex (A, B) oder mit einer Konzentration von 0-10 μM Dex für 8 h (C, D) vorbehandelt. Die Untersuchung der Zellysate erfolgte mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung spezifischer Antikörper. Die Quantifizierung erfolgte mittels einer densitometrischen Auswertung, in welcher die Expression von Bcl_{XL} im Verhältnis zu β-Actin angegeben wird. Die Graphiken zeigen die Mittelwerte ± SD von jeweils drei vergleichbar durchgeführten Versuchen *p < 0,05, **p < 0,01

3.6 Fluoreszenzmikroskopische Analyse des transmembranären, mitochondrialen Potentials mittels JC-1 in Gegenwart von Dex

Vielen Signalwegen zur Auslösung des PCD ist gemeinsam, dass das Gleichgewicht der bifunktionalen Bcl-2-Familienproteine auf die Seite der pro-apoptotischen Vertreter hin verschoben wird (Wolter et al., 1997). Dies ist ein für die Auslösung der Apoptose charakteristischer Prozess, welcher eine Änderung des

transmembranären, mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) mit anschließender Freisetzung des CytC zur Folge hat (Sternfeld et al., 2009).

Für den zytoprotektiven Effekt von Dex in humanen Fibroblasten war es daher von Interesse herauszufinden, ob das GC eine pro-apoptotische Änderung des $\Delta\psi_m$ reduzieren kann. Hierzu wurden Fibroblasten mit Dex vorinkubiert und nach Auslösung von Apoptose mittels $\text{TNF}\alpha/\text{Act}$ mit dem Fluoreszenzfarbstoff JC-1 angefärbt. Bei JC-1 handelt es sich um einen lipophilen, kationischen Farbstoff, welcher sich selektiv in den Mitochondrien einer Zelle ansammelt. In vitalen Zellen mit einem hohen $\Delta\psi_m$ erfolgt nun die Bildung von JC-1-Komplexen, sogenannten JC1-Aggregaten, die einen intensiv orangenen Farbeindruck hervorrufen. Wenn eine Zelle jedoch apoptotische Merkmale aufweist, beobachtet man dagegen eine grüne Fluoreszenz, welche auf die Bildung von JC-1-Monomeren zurückzuführen ist.

Wie aus Abb. 35A hervorgeht, konnte eine Vorstimulation von Fibroblasten mit Dex eine deutliche Reduktion der mit JC-1-Monomeren gefärbten, grün erscheinenden, apoptotischen Zellen bewirken.

Um in einem zweiten Schritt zu verifizieren, dass die Beeinflussung der Änderung des $\Delta\psi_m$ humaner Fibroblasten auf den dargelegten Dex-induzierten anti-apoptotischen Mechanismus des GC zurückzuführen ist, wurden Untersuchungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff JC-1 auch an $\text{S1P}_3^{-/-}$ und Wildtyp-Fibroblasten durchgeführt. Auch hier zeigte eine Stimulation mit Dex von Wildtyp-Fibroblasten eine deutlich reduzierte Minderung des $\Delta\psi_m$ (Abb. 37 B), wohingegen dieser Effekt in $\text{S1P}_3^{-/-}$ -Fibroblasten nicht mehr detektierbar war (Abb. 37C).

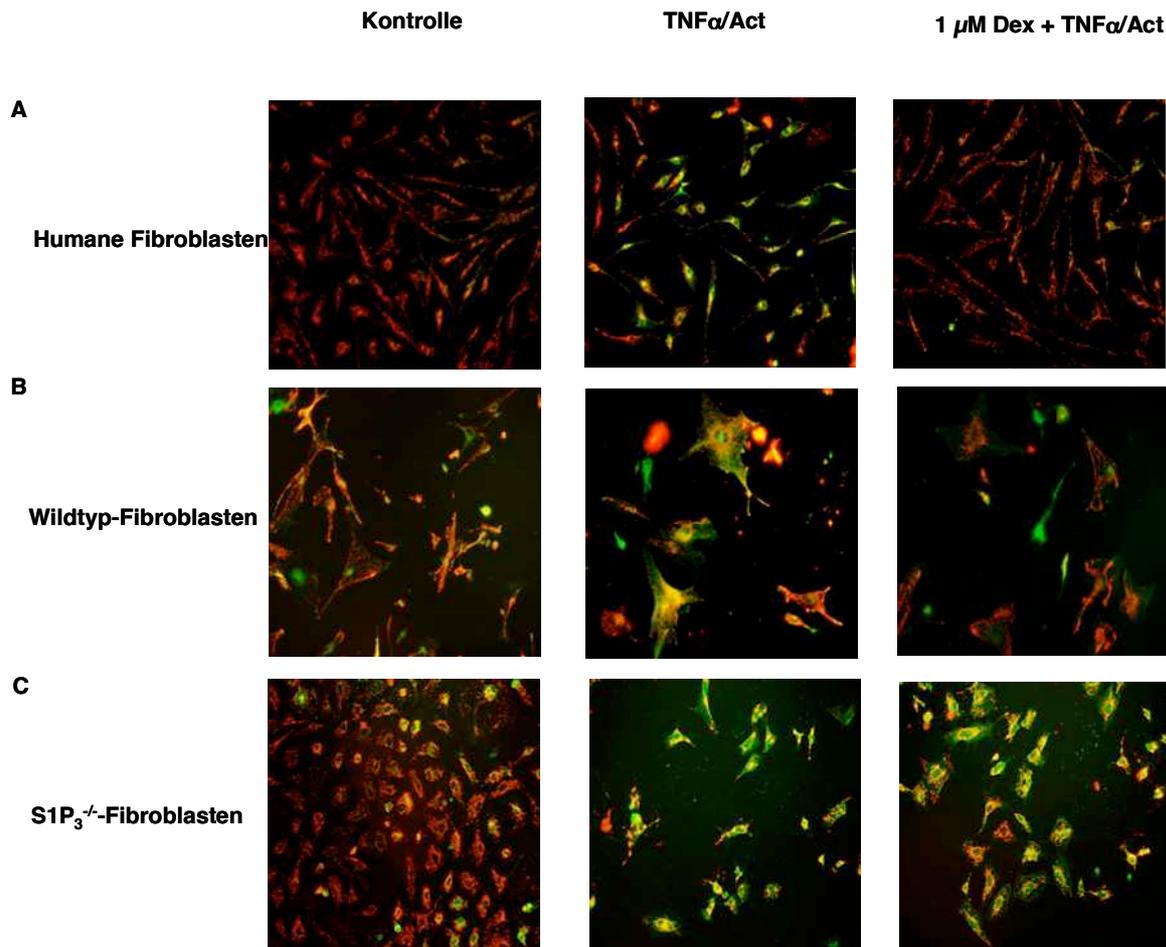


Abb. 37 Änderung des mitochondrialen, transmembranären Membranpotentials humaner Fibroblasten in Anwesenheit von TNF α /Act durch Dex. Humane (A), Wildtyp- (B), und S1P $_3^{-/-}$ -Fibroblasten (C) wurden über einen Zeitraum von 8 h mit 1 μ M Dex vorbehandelt. Zur Auslösung der Apoptose wurden die Zellen mit 100 ng/ml Act und 20 ng/ml TNF α für 16 h behandelt. Nun erfolgte die Inkubation mit JC-1 (0,1 μ g/ml) für 30 Min und die anschließende Visualisierung des Farbstoffs durch ein Fluoreszenzmikroskop.

3.7 Beteiligung der Caspasen 3 und 7 am zytoprotektiven Effekt von Dex in humanen Fibroblasten

3.7.1 Analyse der Bildung von Caspase 3 in Gegenwart von Dex mittels PhiPhiLuxG1D2

Es konnte bereits gut etabliert werden, dass eine gesteigerte Freisetzung des CytC aus den Mitochondrien einer Zelle häufig eine Aktivierung von Caspasen bewirkt. In diesem Zusammenhang wurde eine Beteiligung der Caspasen 3 und 7 als entscheidende Regulatoren der letzten Schritte zur Vermittlung des PCD diskutiert (Sternfeld et al., 2009). So stellen Caspasen einen Teil einer Kaskade zur Spaltung

verschiedener Enzyme dar, welche den Funktionsverlust von Enzymen zur Aufrechterhaltung zellulärer Reparaturmechanismen und der zellulären Homöostase bewirken. Aus diesem Grunde war es von Interesse zu untersuchen, ob Dex nicht nur zu einer deutlichen Stabilisierung des $\Delta\psi_m$ führt, sondern auch gleichzeitig die Bildung der Caspasen 3 und 7 beeinflussen kann.

Zur Detektion der Caspase 3 wurde ein immunozytochemisches Experiment an humanen Fibroblasten durchgeführt. Die Zellen wurden zunächst nach Vorinkubation mit Dex der Gegenwart von $\text{TNF}\alpha/\text{Act}$ ausgesetzt und daraufhin mit einem Kit zur intrazellulären Detektion der Caspase 3 behandelt. Dabei wird das PhiPhiLuxG1D2-Reagenz durch die aktive Caspase-3 proteolytisch gespalten und zur Fluoreszenz angeregt. Die Menge an aktiver Caspase-3 ist dabei proportional zur detektierten Fluoreszenz (Szymczyk et al., 2006). In der Tat konnte dabei, wie aus Abb. 38 hervorgeht, nachgewiesen werden, dass Dex eine deutliche Reduktion der für die aktive Caspase-3-spezifischen Fluoreszenz, bewirkt.

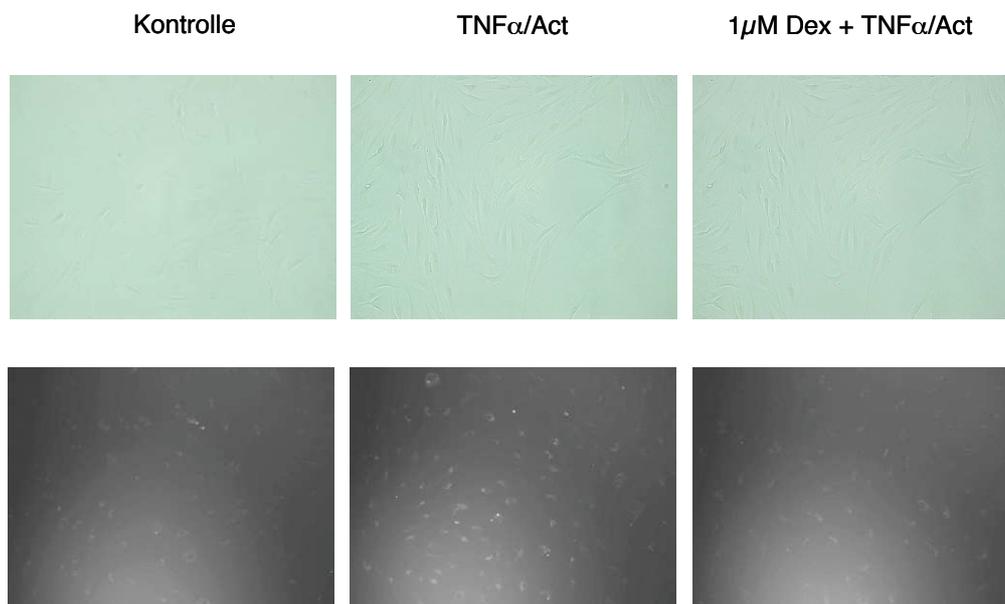


Abb. 38 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Caspase 3 in Gegenwart von Dex. Humane Fibroblasten wurden mit 1 μ M Dex über einen Zeitraum von 8 h stimuliert und daraufhin mit 100 ng/ml Act und 20 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ behandelt. Nach Inkubation der Zellen mit dem PhiPhiLuxG1D2-Reagenz für 3 h bei 37° und 5% CO_2 erfolgte die Visualisierung der Caspase 3-spezifischen Fluoreszenz im Mikroskop. Es wurden einerseits Aufnahmen des jeweiligen Zellverbandes (obere Reihe), sowie auch des Fluoreszenzbildes (untere Reihe) angefertigt.

3.7.2 Quantitative Bestimmung der Bildung von Caspase 3/7 in Gegenwart von Dex und TNF α /Act

Um mittels einer zweiten Methode die Regulation und Beteiligung von Caspasen am anti-apoptotischen Effekt von Dex in humanen Fibroblasten zu belegen, wurden Untersuchungen mit einem weiteren intrazellulären Detektionskit, welches spezifisch die Caspasen 3 und 7 erkennt, angefertigt. Es ist bekannt, dass die Caspase 3 und einige Caspase-3-ähnliche Proteasen, wie zum Beispiel die Caspase 7 eine definierte Aminosäuresequenz (DEVD) von ihren Zielproteinen abspalten und so apoptotische Prozesse vollziehen können. In diesem Versuch reagieren die aktiven Caspasen 3 und 7 mit einem Fluorophor, welches erst unter Abspaltung zweier DEVD-Reste fluoreszieren kann. Die entstandene Fluoreszenz repräsentiert somit die Aktivität der Caspasen 3 und 7.

Humane Fibroblasten wurden mit Dex und TNF α /Act stimuliert und anschließend mit dem Caspase 3/7-Reagenz inkubiert. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Zellen ergab eine deutlich reduzierte Menge an aktiver Caspase 3 bzw. 7 in mit Dex vorbehandelten Zellen (Abb. 39).

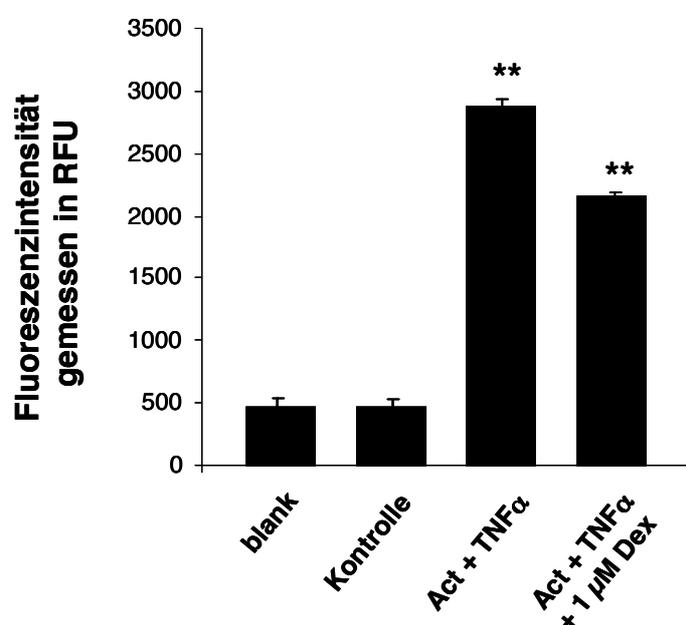


Abb.39 Beeinflussung der Caspase 3/7-Aktivität in humanen Fibroblasten durch Dex. Humane Fibroblasten wurden über einen Zeitraum von 8 h mit 1 μ M Dex stimuliert und daraufhin mit 100 ng/ml Act und 20 ng/ml TNF α behandelt. Nach Inkubation der Zellen mit dem ApoONE[®] Homogenous Caspase 3/7-Reagenz erfolgte die Messung der entstandenen Fluoreszenz mit Hilfe eines Fluoreszenzplattenlesegerätes. Die Graphik repräsentiert die Mittelwerte \pm SD der gemessenen relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) einer Doppelbestimmung. Der Versuch wurde insgesamt drei Mal durchgeführt, wobei vergleichbare Ergebnisse erhalten wurden. **p < 0,01

4 Diskussion

4.1 Regulation des PCD durch GC

Die Behandlung einer Zelle mit GC hat die Induktion mannigfaltiger und von ihrer Art her sehr unterschiedlicher, biologischer Prozesse, zur Folge. Die prominenteste Wirkung von GC auf die menschliche Zelle besteht dabei in der Hemmung proinflammatorischer Reaktionen und begründet zugleich ihren Einsatz in der Therapie entzündlicher Hauterkrankungen. In diesem Zusammenhang wird als eine der wichtigsten Nebenwirkungen bei Langzeitanwendung von GC die Ausbildung einer nachhaltigen Hautatrophie mit einer reduzierten Anzahl an Keratinozyten und Fibroblasten beschrieben. Dieses Phänomen wird auf apoptotische Prozesse in den Zellen zurückgeführt (Saarni and Hopsu-Havu, 1978). Neben der Befähigung von GC zur Auslösung des PCD, konnte aber andererseits auch in Abhängigkeit vom jeweiligen Zelltyp von einem vermehrten Schutz der Zellen vor apoptotischen Vorgängen durch GC berichtet werden. Dabei ist bekannt, dass GC vor allem in Monozyten, T-Lymphozyten und Makrophagen zur Induktion der Apoptose beitragen (Amsterdam and Sasson, 2002). Ein weiteres wichtiges Anwendungsgebiet von GC, in dem die Potenz dieser Arzneistoffe zur Steigerung der zellulären Apoptoserate genutzt wird, besteht in ihrem Einsatz im Bereich der Chemotherapie zur Behandlung leukämischer Erkrankungen (Laane et al., 2009). Hier gelang es unter anderem die Effektivität einer Therapie mit Cyclophosphamid in humanen Prostatakrebszellen durch die parallele Behandlung mit Dex deutlich zu erhöhen (Fontana et al., 2009). Ebenso konnte die pro-apoptotische Wirkung von Dex bei der Chemotherapie des Brustkrebses unter Anwendung von Carboplatin und Gemcitabin genutzt werden (Wang et al., 2007). Die intrazellulären Signalwege, welche hinter dieser aussichtsreichen Möglichkeit zur Verstärkung des Erfolges einer Chemotherapie durch Dex stehen sind allerdings noch wenig untersucht und erfordern daher eine weitere Charakterisierung.

Interessanterweise konnte im Gegensatz zu den bisher praktizierten Anwendungsbereichen kürzlich gezeigt werden, dass GC glanduläre Zellen, wie Brustdrüsenepithelzellen, Leberzellen oder auch Ovarialfollikelzellen vor der Auslösung des PCD schützen können. Diese Erkenntnis dass GC in Abhängigkeit vom Zelltyp auch zum Schutz einer Zelle vor dem PCD beitragen können bietet einerseits Chancen für die Therapie von Erkrankungen, welche mit einem zu schnellen Sterben von Zellen assoziiert sind, birgt aber auch gleichzeitig die Gefahr,

dass das Ausmaß des Erfolgs einer Chemotherapie durch die gleichzeitige Anwendung von Dex weniger aussichtsreich ausfällt. In diesem Zusammenhang ergaben Untersuchungen an humanen dermalen Fibroblasten einen anti-apoptotischen Effekt von Dex, welcher interessanterweise gleichzeitig mit einer Hemmung der Proliferation durch das GC verknüpft ist (Hammer et al., 2004). Genauere Untersuchungen zur Identifizierung der molekular-biologischen Vorgänge zur Auslösung der Apoptose und zum Schutz einer Zelle vor dem PCD führten dabei zu dem Ergebnis, dass meist die gleichen Signalwege zellspezifisch aktiviert oder gehemmt werden. Der detaillierte molekulare Mechanismus ist allerdings noch nicht vollständig untersucht worden (Amsterdam and Sasson, 2002).

In letzter Zeit werden aber bereits verschiedene Modelle postuliert, welche den anti-apoptotischen Effekt von GC erklären könnten. So gelang es unter anderem zu zeigen, dass in hämatopoetischen Zellen die zytoprotektive Wirkung von GC auf Defekte des GR, seinen Bindungspartnern oder auch den angesteuerten Zielgenen und einer damit verbundenen Verschiebung des Gleichgewichts an pro- und anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie zurück zu führen ist (Tissing et al., 2003). Des Weiteren wurde eine zellspezifische Beteiligung des $\text{Nf}\kappa\text{B}$, des PI3K/Akt-Weges, der Serum und GC induzierbaren Kinase 1 oder auch der MAPK Phosphatase 1 und der Proteine Bcl_{XL} , Bcl-2 und Mcl-1 diskutiert (Amsterdam et al., 2002; Melhem et al., 2009; Qian et al., 2009; Uen et al., 2008; Yamamoto et al., 1998). In humanen Fibroblasten allerdings, konnte der anti-apoptotische Effekt des GC Dex interessanterweise mit der Bildung des Lipidmediators S1P in Verbindung gebracht werden (Hammer et al., 2004).

4.2 Regulation von Sphingolipiden und der SphK1 durch Dex

Das Zusammenspiel der Sphingolipide Ceramid, Sphingosin und S1P ist mitunter essentiell für die Vermittlung apoptotischer aber auch zytoprotektiver Signale innerhalb der Zelle. Während Ceramide und Sphingosin für die Auslösung der Apoptose eine wichtige Rolle spielen, wird der Lipidmediator S1P oft in Verbindung mit zytoprotektiven Wirkungen genannt (Kim et al., 2003). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass der Sphingolipid-Rheostat durch die verschiedensten Stimulanzen beeinflusst werden kann. So konnte eine Beeinflussung der zellulären

Ceramidspiegel durch den „transforming growth factor“ (TGF)- β und auch den „epidermal growth factor“ (EGF) in der Modellzelllinie A431 detektiert werden (Goldkorn and Ding, 1997). Weiterhin wurde von einer Modulation der intrazellulären Sphingosin- und auch S1P-Spiegel durch EGF in Gliomzellen und auch Zytokinen, wie dem IL-6, in multiplen Myelomzellen berichtet (Paugh et al., 2008). Allerdings konnte vor diesem Hintergrund eine mögliche Regulation intrazellulärer Sphingolipidspiegel durch GC zur Zeit noch nicht ausreichend bewiesen werden. Lediglich eine Beeinflussung intrazellulärer Ceramidspiegel durch Dex in humanen Thymozyten, sowie eine verstärkte Umwandlung von Ceramid zu Sphingosin bei Stimulation mit Dex, konnte bereits nachgewiesen werden (Cifone et al., 1999). Die Frage, ob eine Stimulation mit Dex zu einer spezifischen Regulation des Lipidmediators S1P in humanen Fibroblasten führt wurde bisher allerdings nur ansatzweise beschrieben (Hammer et al., 2004).

4.2.1 Beeinflussung intrazellulärer Ceramidspiegel durch Dex

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte zunächst der Einfluss von Dex auf das fließende Gleichgewicht zwischen Ceramid, Sphingosin und S1P in humanen Fibroblasten näher untersucht werden. Wie die vorliegenden Ergebnisse von HPLC-Analysen zeigen, bewirkt eine Stimulation von Dex in humanen Fibroblasten eine konzentrationsabhängige Reduktion der intrazellulären Ceramidspiegel. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Untersuchungen von Autelli et al., welche in humanen Thymozyten eine starke Reduktion der Apoptoserate von mit C₂-Ceramid und Dex behandelten Zellen detektieren konnten und somit eine verstärkte Umwandlung des Sphingolipids durch das GC darlegen (Autelli et al., 2009). Auch Chae und Mitarbeiter untermauern die angeführten Ergebnisse, da sie nachweisen konnten, dass Dex in mit TNF α behandelten MC3T3E1 Osteoblasten dazu in der Lage war die entstehende Menge an Ceramid deutlich zu reduzieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese Beobachtung mit einem zytoprotektiven Effekt von Dex auf die genannten Zellen verbunden ist (Chae et al., 2000). Jedoch zieht die Stimulation einer Zelle mit einem GC nicht immer eine Reduktion der intrazellulären Ceramidspiegel mit sich. So zeigte die Analyse von Portalvenenserum, welches von mit Dex behandelten Sprague-Dawley-Ratten gewonnen wurde, dass GC die Bildung von Ceramiden auch induzieren können (Holland et al., 2007). Des Weiteren wurde

sogar dargelegt, dass der gut etablierte pro-apoptotische Effekt von Dex in CD4⁺/CD8⁺-Thymozyten auf der verstärkten Umwandlung von S1P zu Sphingosin und einer damit verknüpften Zunahme der intrazellulären Ceramidspiegel beruht (Bianchini et al., 2006).

Insgesamt stimmen die Ergebnisse des Promotionsvorhabens – analog zum zytoprotektiven oder pro-apoptotischen Effekt von GC - mit den in der Literatur beschriebenen Untersuchungen überein. Besonders bemerkenswert ist dabei aber, dass Dex je nach Zelltyp entweder zu einer verstärkten Bildung von Ceramiden und der Auslösung von Apoptose in der Zelle führt oder aber, wenn ein genereller anti-apoptotischer Effekt des GC zu verzeichnen ist, eine deutliche Reduktion der intrazellulären Ceramidspiegel bewirkt.

4.2.2 Regulation der intrazellulären Sphingosinspiegel durch Dex

Zusätzlich zu einer Regulation des Ceramidhaushalts war es von Interesse herauszufinden, ob auch andere Vertreter der Sphingolipidfamilie, insbesondere Sphingosin und S1P von einer Stimulation mit Dex beeinflusst werden können. Wie aus den Ergebnissen der vorliegenden HPLC-Analysen ersichtlich, korrelierte die Stimulation humaner Fibroblasten mit Dex tatsächlich mit einer Reduktion des intrazellulären Sphingosingehalts. Von einer Regulation der zellulären Sphingosinspiegel konnte bisher in verschiedenen Zelltypen berichtet werden. So bewirkte die Einwirkung der Zytokine IL-1 β oder auch Interferon γ in Ratteninselzellen eine Induktion der sauren Ceramidase, die für die Umformung von Ceramid zu Sphingosin verantwortlich ist (Zhu et al., 2009). Zusätzlich konnte in HeLa-Zellen gezeigt werden, dass eine Überexprimierung der alkalischen Ceramidase zu einer Induktion der intrazellulären Sphingosinspiegel beiträgt (Xu et al., 2006). Von einer Veränderung des Sphingosingehalts einer Zelle durch Stimulation mit GC konnte ebenso berichtet werden. Hier gelang es zu zeigen, dass Dex in humanen Thymozyten nicht nur zu einer starken Senkung der Apoptoserate durch eine signifikante Minderung des zellulären Ceramidgehalts führte, sondern auch, dass dieser Effekt auf einer extensiven Beteiligung des Enzyms Ceramidase und der daraus resultierenden Verschiebung des Sphingolipidgleichgewichts zu Gunsten von Sphingosin beruht (Lepine et al., 2004). Zusätzlich ergaben Untersuchungen an PC12- Zellen eine vergleichbare Umwandlung von Ceramid zu Sphingosin, welche

mit einer anschließenden Umwandlung in den zytoprotektiven Lipidmediator S1P verbunden ist (Edsall et al., 2001). Die im Ergebnisteil dargestellten Untersuchungen zur Analyse des Sphingosingehalts von Fibroblasten in Gegenwart von Dex stehen also in enger Übereinstimmung mit der in der Literatur bereits beschriebenen Regulation zellulärer Sphingosinspiegel.

4.2.3 Regulation intrazellulärer S1P-Spiegel durch Dex

Die Inhibierung von apoptotischen Vorgängen durch S1P konnte bereits in vielen Zelltypen etabliert werden. So wurde unter anderem eine zytoprotektive Wirkung des Sphingolipids in humanen Endothelzellen, Mesangioblasten und Melanozyten, um nur einige wenige Zelltypen zu nennen, festgestellt (Bonnaud et al., 2007; Donati et al., 2007; Kim et al., 2003). Auch diese Daten stehen in Übereinstimmung mit den dargelegten Ergebnissen, da auch in humanen Fibroblasten nicht nur eine Reduktion der Sphingosinspiegel durch Dex mittels HPLC-Analyse gemessen werden konnte, sondern ebenfalls eine Erhöhung der intrazellulären S1P-Spiegel.

Die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit belegen eine Induktion der Bildung des Lipidmediators S1P durch das GC Dex. Diese Resultate stehen in Übereinstimmung mit den Veröffentlichungen vieler anderer Autoren. Eine Stimulation der intrazellulären Produktion von S1P durch mannigfaltige Agenzien konnte bereits etabliert werden. Die Behandlung von kardialen Fibroblasten mit dem Wachstumsfaktor TGF- β , oder auch von HEK293-Zellen mit FKS resultierte beispielsweise in einer gesteigerten Bildung des Sphingolipids (Blom et al., 2005; Gellings Lowe et al., 2009). Ebenso konnte in 3T3-L1-Zellen nachgewiesen werden, dass die Stimulation mit Dex eine signifikante Erhöhung der S1P-Spiegel in der Zelle bewirkt (Hashimoto et al., 2009). Diese Beobachtung konnte interessanterweise auf eine gleichzeitige Regulation der SphK zurückgeführt werden. Edsall et al. gelang es darüber hinaus nachzuweisen, dass in PC12-Zellen eine Überexprimierung der SphK zu einer vermehrten Umformung von Sphingosin zu S1P führt (Edsall et al., 2001; Takabe et al., 2008).

4.2.4 Beteiligung der SphK1 am anti-apoptotischen Effekt von Dex

Obwohl von der SphK zwei Isoenzyme, namentlich SphK1 und SphK2, bekannt sind, welche nicht nur strukturell über einen sehr ähnlichen Aufbau verfügen, sondern

auch beide zur Bildung von S1P aus Sphingosin befähigt sind, wurden ihnen unterschiedliche Wirkungen auf die Zellphysiologie nachgewiesen (Hofmann et al., 2008). Während die Ausschaltung der SphK1 in renalen SphK1^{-/-}-Mesangiumzellen von Mäusen eine starke Sensitivierung gegenüber pro-apoptotischen Signalen zur Folge hat, zeigten renale SphK2^{-/-}-Mesangiumzellen eine deutlich erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber der Auslösung von Apoptose durch Staurosporin (Hofmann et al., 2008).

Es war also auch von Interesse herauszufinden, ob ebenfalls in humanen Fibroblasten die Aktivität der SphK1 ein essentieller Bestandteil des anti-apoptotischen Effekts von Dex ist. Die vorliegende Arbeit belegt, dass eine Stimulation von humanen Fibroblasten mit Dex die Induktion der SphK1 mRNA- und Proteinspiegel bewirkt. Im Gegensatz hierzu konnte dieser Effekt für die SphK2 in humanen Fibroblasten nicht festgestellt werden. Diese Aktivierung der SphK1 kann anhand der aktuellen Literatur belegt werden. Es zeigt sich, dass die SphK1 nicht nur durch verschiedene Wachstumsfaktoren wie PDGF, dem „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) oder auch dem EGF induziert werden kann, sondern dass auch Hormone zu einer Aktivierung der SphK1 beitragen können (Takabe et al., 2008). In diesem Zusammenhang konnte von einer Aktivierung der SphK1 durch Prolaktin in der Brustkrebszelllinie MCF7 berichtet werden (Doll et al., 2007). Ebenfalls bewirkte die Stimulation mit 17- β -Estradiol in dieser Zellart eine deutliche Induktion der SphK1 (Sukocheva et al., 2003). Für humane Fibroblasten konnte eine Regulation der SphK1 durch Calcitriol verzeichnet werden (Sauer et al., 2005).

Darüber hinaus bestätigen die durchgeführten Versuche nicht nur, dass Dex zu einer zeit- und konzentrationsabhängigen Regulation der SphK1 führt, sondern auch, dass die SphK1 ein elementarer Bestandteil dieses zytoprotektiven Signalweges von GC in humanen Fibroblasten ist. Eine Behandlung von humanen Fibroblasten mit SphK1 siRNA führte nämlich zu einer starken Reduktion des anti-apoptotischen Potentials von Dex.

Dieser Effekt kann zusätzlich anhand mehrerer Studien belegt werden. Es gelang unter anderem die Bedeutung der SphK1 für den anti-apoptotischen Effekt von TGF- β in humanen Mesangioblasten oder auch von IL-6 auf Multiple Myelom-Zellen klar herauszustellen (Donati et al., 2009; Li et al., 2007). Auch die Hemmung der SphK1-Aktivität durch den isoenzymspezifischen Inhibitor SK1-I in Glioblastomazellen oder durch Docetaxel in Prostatakrebszellen zeigte eine deutliche Sensitivierung der

Zellen gegenüber pro-apoptischen Signalen (Kapitonov et al., 2009; Sauer et al., 2009). Die Überexprimierung der SphK1 in multiplen Myelom-Zellen oder auch die gesteigerte Induktion der SphK1 durch Agonisten wie $\text{TNF}\alpha$, IL-1 oder Phorbol-12-myristate-13-acetat in HEK293T-Zellen zeigte darüber hinaus einen ausgeprägt zytoprotektiven Effekt. Weiterhin ermöglicht die dadurch bedingte erhöhte Aktivität der SphK1 gleichzeitig auch den Schutz der Zellen vor der Einwirkung von ionisierender Strahlung oder verschiedenen Chemotherapeutika (Li et al., 2007; Taha et al., 2006).

Obwohl es sich bei SphK1 und SphK2 um zwei Isoenzyme handelt, welche zur Bildung desselben Produktes, nämlich S1P, führen, ist es bemerkenswert, dass ihre Aktivierung divergente Auswirkungen auf das Schicksal einer Zelle hat. Während wie in den vorherigen Ausführungen dargelegt, die SphK1 einen ausgeprägt anti-apoptischen Effekt auf Zellen ausübt, konnten der SphK2 häufig zytotoxische Wirkungen nachgewiesen werden (Herr et al., 2007; Saffar et al., 2008; Sankala et al., 2007). Bei der Entstehung einer rheumatoiden Arthritis zum Beispiel konnte die erhöhte Apoptoserate von Synnovialfibroblasten auf eine verstärkte Aktivität der SphK2 zurückgeführt werden (Kamada et al., 2009).

Die Erklärung dieser divergenten Wirkungen liegt im strukturellen Aufbau der beiden Isoenzyme. Während beide Enzyme eine ähnliche Aminosäuresequenz und eine vergleichbare Ausprägung der fünf Proteindomänen aufweisen, besitzt die SphK2 im Vergleich zur SphK1 einen strukturell unterschiedlichen Aufbau in zentralen Regionen und dem N-Terminus des Moleküls. Wie aus einigen aktuellen Studien ersichtlich ist, konnte nachgewiesen werden, dass die SphK2 eine neun Aminosäuren zählende Peptidsequenz enthält, welche vergleichbar mit den Sequenzen in BH3-only Proteinen einiger pro-apoptischer Mitglieder der Bcl2-Familie ist (Maceyka et al., 2005). Diese sogenannten BH3-only-Domänen-Proteine sind dazu befähigt die pro-apoptischen Proteine Bax und Bak zu aktivieren, gleichzeitig aber auch mit den anti-apoptischen Proteinen Bcl-2 oder Bcl_{XL} zu interagieren und auf diese Weise ihren zytoprotektiven Effekt zu neutralisieren (Merino et al., 2009). Darüber hinaus wurde bekannt, dass eine Interaktion der SphK2 mit anti-apoptischen Bcl-2-Familienvertretern ebenfalls zu einer Aufhebung ihres zytoprotektiven Effekts führt und diese Wirkung auf die Anwesenheit der BH3-Domäne zurückzuführen ist (Liu et al., 2003). In diesem Zusammenhang konnte nachgewiesen werden, dass die SphK2 ein hohes Interaktionspotential mit dem anti-

apoptotischen Molekül Bcl_{xL} besitzt, dessen folgliche Inaktivierung zur Auslösung des PCD führte (Liu et al., 2003). Zusätzlich beinhaltet der SphK2-induzierte Weg zur Auslösung der Apoptose im Gegensatz zum zytoprotektivem Effekt der SphK1 keine Beteiligung von GPCR. Jüngste Untersuchungen gehen für einige SphK2-vermittelte Effekte vielmehr von einer Regulation nuklearer Signalwege als Wirkungsprinzip aus (Hait et al., 2009).

Im Ergebnisteil dieser Arbeit wird beschrieben, dass die Stimulation von humanen Fibroblasten mit Dex keine Aktivierung der SphK2 auf mRNA- und Proteinebene ergibt. Außerdem basiert der zytoprotektive Effekt des GC auf einer Aktivierung von GPCR. Daraus kann geschlossen werden, dass die SphK2 nicht am anti-apoptotischen Effekt von Dex in humanen Fibroblasten beteiligt ist. Dies steht im Einklang mit den Studien vieler anderer Autoren und untermauert die These, dass die SphK2 an der Auslösung von pro-apoptotischen Vorgängen in der Zelle beteiligt ist.

4.3 Bedeutung des ABC-Transporters ABCC1 für den anti-apoptotischen Effekt von Dex in Fibroblasten

Die dargestellten Ergebnisse unterstützen die These, dass für den anti-apoptotischen Effekt von Dex in humanen Fibroblasten die Induktion der SphK1 mit der daraus resultierenden intrazellulären Bildung des Lipidmediators S1P von essentieller Bedeutung ist. Die intrazelluläre Bildung und Wirkung von S1P wurde bereits in einigen Studien untersucht. Dabei konnte interessanterweise gezeigt werden, dass zytosolisch lokalisiertes S1P zu einer Mobilisierung von Calcium in der Zelle führt oder aber auch an der Regulation von Proliferation und Apoptose beteiligt sein kann (Spiegel and Milstien, 2000). Dennoch sind neben einer intrazellulären Wirkung von S1P als second Messenger auch Signalwege bekannt, über die S1P zu einer Aktivierung extrazellulär lokalisierter GPCR führen kann (Takabe et al., 2008). Bisher sind fünf ubiquitär aber in Abhängigkeit vom Zelltyp verschieden stark exprimierte Rezeptorsubtypen, namentlich S1P₁₋₅, bekannt, welche nach Interaktion mit spezifischen G-Proteinen zur Vermittlung extrazellulärer Signale führen (Spiegel and Milstien, 2002). Dieses sogenannte „Inside-Out“-Signalverhalten des S1P, konnte bisher am migratorischen Verhalten von Fibroblasten in Gegenwart von PDGF und an der chemotaktischen Anziehung von Mastzellen gegenüber Antigenen dargelegt

werden (Hobson et al., 2001; Jolly et al., 2004). In diesem Zusammenhang zeigte sich, dass PDGF nicht nur zu einer Induktion der SphK1 und der daraus resultierenden Steigerung der intrazellulären S1P-Bildung führt, sondern auch über eine Aktivierung des extrazellulären S1P₁-Rezeptors zu einer vermehrten Migration von Fibroblasten führen konnte (Hobson et al., 2001; Rosenfeldt et al., 2001). Da der Lipidmediator S1P aber eine polare Kopfgruppe aufweist, ist eine Passage des Sphingolipids durch die hydrophobe Zellmembran ohne Beteiligung eines Transportmechanismus weniger wahrscheinlich. Untersuchungen zur Resistenzbildung einiger Krebszelllinien gegenüber Chemotherapeutika bestätigten interessanterweise, dass einige amphiphile Arzneistoffe unter anderem aber auch ABC-Transporter den Wechsel von Lipiden von der inneren an die äußere Seite der Plasmamembran ermöglichen (van Meer and Lisman, 2002). Hierbei spielen vor allem die ABC-Transporter ABCB1 (PGP), ABCC1 (multidrugresistance associated protein (MRP) 1) und ABCG2 (breastcancer resistance protein) eine bedeutende Rolle (Dean et al., 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung einer MDR in Brustkrebszelllinien mit reduzierten Ceramidspiegeln in der Zelle und einer erhöhten Aktivität des ABCB1 verbunden ist (Gouaze-Andersson et al., 2007). Zusätzlich wurde die Beteiligung des ABCB1 am Export von Phospholipiden oder auch PDGF aus dem Zytosol in den Extrazellularraum diskutiert (Raggers et al., 2001; van Helvoort et al., 1996). Darüber hinaus konnte die Relevanz des ABCB4 für den transmembranären Transport von Phosphatidylcholin und des ABCC1 für den transmembranären Transport von Glucosylceramiden und Sphingomyelin herausgestellt werden (Raggers et al., 1999; van Helvoort et al., 1996). Insgesamt gibt es im Moment nur wenige - und in Bezug auf den anti-apoptotischen Effekt von Dex in humanen Fibroblasten keine – überzeugende Hinweise, wie intrazellulär gebildetes S1P an die äußere Zellmembran transportiert werden kann, um anschließend extrazelluläre Wirkungen zu vermitteln.

4.3.1 Teilnahme des ABCC1 am anti-apoptotischen Effekt von Dex

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass der ABC-Transporter ABCC1 entscheidend am anti-apoptotischen Effekt von Dex in humanen Fibroblasten beteiligt ist und die Schnittstelle zwischen der intrazellulären Bildung von S1P und der anschließenden Aktivierung extrazellulärer Signalwege bildet.

Dieses „Inside-Out“-Signalverhalten konnte bereits in verschiedenen Zelltypen beschrieben werden und stellt einen wichtigen Faktor der mannigfaltigen Wirkungen des Lipidmediators S1P dar (Takabe et al., 2008). In der aktuellen Literatur wurde in diesem Zusammenhang berichtet, dass in humanen Thrombozyten die Freisetzung von S1P aus dem Zytosol die Einbindung spezifischer Transporter erfordert (Kobayashi et al., 2006). Außerdem konnte in Astrozyten und Rattenerythrozyten die Beteiligung des ABC-Transporters ABCA1 am Export von S1P aus dem Zytosol in den Extrazellularraum gezeigt werden (Kobayashi et al., 2009; Sato et al., 2007). Darüber hinaus wurde ein weiterer ABC-Transporter, nämlich ABCC1, identifiziert, der am Export von S1P aus Mastzellen beteiligt ist. In diesem Zelltyp konnte ferner eine Verbindung zwischen der Aktivität des ABCC1 und der starken, anhaltenden Sekretion des Lipidmediators S1P hergestellt werden (Mitra et al., 2006). In Endothelzellen schließlich ließ sich eine gemeinsame Beteiligung zweier ABC-Transporter, ABCA1 und ABCC1 am Export von S1P aus Endothelzellen nachweisen (Lee et al., 2007). Allerdings wirft der Sachverhalt, dass S1P in verschiedenen Zelltypen nicht über denselben ABC-Transporter in den Extrazellularraum ausgeschleust wird nachhaltig Fragen auf, die der weiteren Klärung bedürfen. In diesem Zusammenhang könnte die unterschiedlich starke Expression der einzelnen ABC-Transporter in den verschiedenen Zelltypen eine Rolle spielen (Mitra et al., 2006). De facto ergab eine Überprüfung des Expressionsmusters von ABC-Transportern in humanen Fibroblasten nicht nur eine stärkere Expression des ABCC1 im Vergleich zum ebenfalls untersuchten ABCB1, sondern gleichzeitig auch eine Regulation der ABCC1 mRNA- und Proteinspiegel durch Dex. Diese Regulation der zellulären Expression von ABC-Transportern steht in Übereinstimmung mit den Studien verschiedener Autoren. So gelang es unter anderem Jiang et al. zu zeigen, dass der ABC-Transporter ABCA12 nicht nur am Transport von Glycosylceramiden beteiligt ist, sondern auch durch Ceramide nachhaltig induziert werden kann (Jiang et al., 2009). Weiterhin wurde von der Induktion der ABC-Transporter ABCB1 und ABCC1 durch die Substanz Zearalenon, der hormonähnliche Wirkungen zugeschrieben werden, berichtet. Außerdem konnte die Beeinflussung von verschiedenen ABC-Transportern durch ein GC unter anderem in Makrophagen, primären Schweinehirnkapillar-Endothelzellen aber auch in Rattenleberzellen dargestellt werden (Ayaori et al., 2006; Kubitz et al., 1999; von Wedel-Parlow et al., 2009). Eine durchflusszytometrische Analyse humaner Fibroblasten, welche mit dem

ABCC1-Hemmstoff MK571 bzw. mit dem ABCB1-Hemmstoff Verapamil vorinkubiert wurden, zeigte zudem, dass die zuvor prominent anti-apoptotische Wirkung von Dex nicht mehr bei mit MK571 vorbehandelten Zellen gemessen werden konnte. Ein vergleichbar durchgeführter Versuch unter der Anwendung von ABCC1 siRNA ermöglichte ebenfalls die Zurückführung des anti-apoptotischen Effekts von Dex in humanen Fibroblasten auf die Funktion des ABCC1. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit der aktuellen Literatur. So gelang es Lee und Mitarbeitern zu zeigen, dass die Resistenz von Prostatakrebszellen gegenüber apoptotischen Signalen durch eine Überaktivierung des ABCC1 begründet war. Eine Hemmung der Aktivierung des ABC-Transporters stellte hingegen die Ansprache des Tumors auf das verwendete Chemotherapeutikum wieder her (Lee et al., 2004).

Somit zeigen die in dieser Arbeit vorgestellten Resultate, dass der ABC-Transporter ABCC1 einerseits durch eine Stimulation mit Dex reguliert werden kann, andererseits aber auch eine Desensitivierung der Zellen mittels ABCC1 siRNA gleichzeitig zu erhöhten intrazellulären S1P-Spiegeln führt und der anti-apoptotische Effekt des GC in humanen Fibroblasten aufgehoben wird. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den in der Literatur gefundenen Anhaltspunkten zur Beteiligung von ABC-Transportern am Export von S1P aus der Zelle.

4.4 Identifizierung des S1P₃-Rezeptorsubtyps als essentieller Mediator des Dex-induzierten Effekts

Die intensive Ausschleusung von S1P über den ABC-Transporter ABCC1 in den Extrazellularraum führte zu der Vermutung, dass der anti-apoptotische Effekt von Dex in humanen Fibroblasten auch auf extrazelluläre Wirkungen des Lipidmediators zurückzuführen ist. Als extrazelluläre Effekte des S1P konnten unter anderem eine Beeinflussung der Angiogenese, die verstärkte Migration von dendritischen Zellen gegenüber S1P oder auch eine Zunahme der Chemotaxis und eine vermehrte Proliferation von Zellen identifiziert werden (Milara et al., 2009; Soares and Azevedo, 2007; Sugimoto et al., 2003). Neben diesen anscheinend im Organismus ubiquitär vorhandenen, extrazellulären Wirkungen ist auch eine Beteiligung des Lipidmediators an zytoprotektiven Signalwegen in der Zelle beschrieben worden (Greenspon et al., 2009; Li et al., 2008). In diesem Zusammenhang wurde insbesondere eine

Aktivierung der extrazellulär lokalisierten S1P-Rezeptoren diskutiert. So konnte vor allem die Bedeutung des S1P₁-Rezeptorsubtyps für die Inhibition der Apoptose in intestinalen Endothelzellen herausgestellt werden (Greenspon et al., 2009). Ebenso konnte die Aktivierung des S1P₁ in SphK^{-/-}- Mäusen mit einer anti-apoptotischen Wirkung in Verbindung gebracht werden (Hait et al., 2006). In einer ersten Untersuchung an Kardiomyozyten konnte zunächst die Beteiligung des S1P₂ am zytoprotektiven Effekt von S1P dargestellt werden (Frias et al., 2009). In weiteren Studien hingegen konnte eine gemeinsame Rolle der S1P-Rezeptorsubtypen S1P₂ und S1P₃ zur Beeinflussung pro-apoptotischer Signalwege in Kardiomyozyten etabliert werden (Means and Brown, 2009). Ebenso gelang es An et al. die Bedeutung der S1P-Rezeptorsubtypen S1P₂ und S1P₃ für die S1P-induzierte Zytoprotektion von HT4-Zellen herauszustellen (An et al., 2000). Dieses Ergebnis zeigte sich ebenfalls in multiplen Myelomzellen (Li et al., 2008). Darüber hinaus konnte der anti-apoptotische Effekt von S1P in Endothelzellen auf eine Beteiligung des S1P₃-Rezeptorsubtyps zurückgeführt werden (Theilmeyer et al., 2006). Wie diese Auszüge aus der aktuellen Literatur zeigen, werden zytoprotektive Signale in einer Zelle meist über die Rezeptorsubtypen S1P₁, S1P₂, S1P₃ oder einer gemeinsamen Interaktion des S1P₂ und des S1P₃ vermittelt. Wie aus der vorliegenden Arbeit hervorgeht, erfordert der anti-apoptotische Effekt von Dex in humanen Fibroblasten eine Beteiligung des S1P₃-Rezeptors. Dies steht im Einklang mit der oben angegebenen Literatur. Jedoch stellt sich die Frage, wie ein und dasselbe zytoprotektive Agens, nämlich S1P, in Abhängigkeit vom Zelltyp die Aktivierung verschiedener S1P-Rezeptorsubtypen zur Vermittlung anti-apoptotischer Effekte erfordert. Bei näherer Betrachtung ist besonders bemerkenswert, dass die Bevorzugung eines bestimmten S1P-Rezeptorsubtyps oder einer Kombination aus diesen jeweils mit einer verhältnismäßig starken Expression des bzw. der einzelnen Rezeptorsubtypen im jeweiligen Zelltyp verbunden ist. So ergab eine Western Blot-Analyse humaner intestinaler Endothelzellen eine starke Expression des S1P₁ während dessen der S1P₃-Rezeptorsubtyp in dieser Zellart nicht exprimiert wird (Greenspon et al., 2009). Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit der Vermittlung des anti-apoptotischen Effekts von S1P in diesem Zelltyp über den S1P₁-Rezeptorsubtyp. Darüber hinaus konnte eine starke Expression des S1P₂ und des S1P₃ in murinen Herzen herausgestellt werden, welches mit der Vermittlung des anti-apoptotischen Effekts von S1P in Kardiomyozyten in Kongruenz steht (Wendler and

Rivkees, 2006). Der S1P₅-Rezeptorsubtyp konnte dagegen in diesen Zellen nicht detektiert werden. Ebenso korreliert die nachhaltige Expression des S1P₃ im Gegensatz zum S1P₂-Rezeptorsubtyp in Endothelzellen mit der Vermittlung zytoprotektiver Effekte über den S1P₃ (Kimura et al., 2000). Diese Studien stehen in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit präsentierten Ergebnissen: Die Analyse des Expressionsmusters der S1P-Rezeptorsubtypen in humanen Fibroblasten mittels Real-time PCR ergab eine vorwiegende Expression des S1P₃, gefolgt von den restlichen S1P-Rezeptorsubtypen. In Analogie zu den durchgeführten Versuchen zeigte sich auch in kardialen Fibroblasten eine verstärkte Expression des S1P₃ im Verhältnis zu den anderen Rezeptorsubtypen (Landeem et al., 2008). Zudem zeigt eine nähere Betrachtung der dargestellten Graphiken nicht nur eine Analyse des Expressionsmusters von S1P-Rezeptoren in humanen Fibroblasten, sondern veranschaulicht erstmalig, dass die Stimulation von Fibroblasten mit Dex auch zu einer deutlich gesteigerten Expression der gebildeten S1P-Rezeptorsubtypen führt. In der aktuellen Literatur wurde bisher noch nicht von einer möglichen Regulation der S1P-Rezeptoren durch GC berichtet. Allerdings konnte die Beeinflussung der Expression von GPCR – zu denen auch die S1P-Rezeptoren zählen - durch Dex eindeutig nachgewiesen werden (Adams et al., 2003). Diese Untersuchungen stehen in Kongruenz mit der im Ergebnisteil präsentierten Induktion der S1P₃-mRNA durch Dex.

Zusätzlich zu den Real-time PCR-Untersuchungen zur mRNA-Expression des S1P₃ wären Daten zur Analyse der Regulation des S1P₃-Proteins wünschenswert gewesen. Da es allerdings zur Zeit nicht möglich ist einen selektiven, S1P₃-spezifischen Antikörper herzustellen, konnten entsprechende Western Blot-Analysen nicht erfolgreich durchgeführt werden.

Die im Ergebnisteil präsentierten Untersuchungen zur Beteiligung des S1P₃ am anti-apoptotischen Effekt von Dex in humanen Fibroblasten veranschaulichen, dass nach Anwendung von S1P₃-ASO oder auch dem selektiven S1P₃-Rezeptorantagonisten Suramin der anti-apoptotische Effekt von Dex nahezu aufgehoben wird. Diese Resultate fanden in weiteren durchflusszytometrischen Analysen des zytoprotektiven Effekts von Dex an S1P₃^{-/-} und S1P₃-Wildtyp-Fibroblasten ihre Bestätigung. Die aktuelle Literatur steht in Kongruenz mit den durchgeführten So resultierte die Ausschaltung des S1P₃-Rezeptorsubtyps in multiplen Myelomzellen durch den S1P₃-Antagonisten CAY10444 in einer Reduktion der zytoprotektiven Spiegel des Proteins

Mcl-1 der Bcl-2-Familie (Li et al., 2008). Des Weiteren konnte die Notwendigkeit eines aktiven S1P₃ in B-Zellen von Patienten mit rheumatoider Arthritis durch Versuche mit dem Inhibitor Suramin nachgewiesen werden (Tan et al., 2007). Insgesamt unterstützt die aktuelle Literatur die erhaltenen Ergebnisse zur Beteiligung des S1P₃ am anti-apoptotischen Effekt von Dex und zur Regulation des S1P-Rezeptorsubtyps auf mRNA-Ebene in humanen Fibroblasten.

4.5 Beteiligung des PI3K- und PKB/Akt-Signalweges am zytoprotektivem Effekt von Dex

4.5.1 Rolle der PI3K für den anti-apoptotischen Effekt von Dex

Wie der Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit veranschaulicht, kann der anti-apoptotische Effekt von Dex in humanen Fibroblasten auf die intrazelluläre Bildung von S1P und dessen extrazellulärer Aktivierung des S1P₃-Rezeptorsubtyps zurückgeführt werden. Dabei war es allerdings zunächst nicht klar, wie eine Aktivierung des S1P₃ mit dem Schutz von Fibroblasten vor der Auslösung des PCD in Zusammenhang gebracht werden kann und bedurfte daher näheren Untersuchungen.

Zu den wichtigsten Mediatoren anti-apoptotischer Signalwege werden heutzutage MAPK, ERK, die JNK, die PI3K oder auch die Bildung von NO durch Stickstoffmonoxidsynthasen (NOS) gezählt (Herr et al., 2007; Levytsky et al., 2004). Darüber hinaus ist bekannt, dass GC zur Beeinflussung des PCD zu einer Regulation der oben genannten Mediatoren befähigt sind. So konnte die Beteiligung der p38 MAPK an der Wirkung von Dex auf Jurkatzellen, die Bedeutung für die Regulation des PCD durch eine Dex-induzierte JNK-Aktivierung in eosinophilen Granulozyten oder der Schutz von ovariellen Follikelzellen durch eine Stimulation von ERK durch Dex bereits etabliert werden (Hasala et al., 2007; Miller et al., 2005; Sasson et al., 2003). Des Weiteren gelang es, die Induktion der NOS durch Kortikoide zu zeigen und die Bedeutung der NOS für den Schutz von Leberzellen vor apoptotischen Agenzien herauszustellen (Aram et al., 2008; Thompson, 2003). Bei einem der prominentesten Vertreter zur Vermittlung anti-apoptotischer Wirkungen handelt es sich um die PI3K, von welcher bisher drei Formen von Isoenzymen, nämlich die

Klassen I-III bekannt sind (Wymann and Pirola, 1998). Neben der Existenz dieser drei Gruppen an PI3Ks konnte bisher gezeigt werden, dass PI3Ks der Klasse IB durch verschiedene Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel PDGF oder auch EGF aktiviert werden können und anschließend eine Induktion von Signalwegen, welche Tyrosinkinase oder GPCR enthalten, bewirken (Burgering and Coffey, 1995; Franke et al., 1995; Kok et al., 2009). Zusätzlich ergaben Untersuchungen an primären, kortikalen Neuronen, dass auch GC zu einer Induktion der PI3K führen können (Harms et al., 2007). Insgesamt kommt es durch die dargelegten Vorgänge zu einer vermehrten Bildung von PIP₃, welches zu einer indirekten oder direkten Aktivierung von Signalmolekülen führt. Dabei kann es sich um Proteinkinasen, wie die PKB/Akt oder auch um Adapterproteine und Regulatoren von kleinen GTPasen handeln, welchen beispielsweise die Kontrolle über Zellwachstum, Proliferation und Migration obliegt (Carnero et al., 2008; Vanhaesebroeck et al., 2001; Wymann et al., 2003). So war es auch möglich einen nachhaltig anti-apoptischen Effekt durch eine GC-induzierte Aktivierung von kortikalen Neuronen nachzuweisen (Harms et al., 2007). Eine nähere durchflusszytometrische Untersuchung des anti-apoptischen, S1P-basierten Effekts von Dex in humanen Fibroblasten mittels spezifischer Hemmstoffe für die oben angegebenen Zielproteine ergab, dass nur unter Vorstimulation der Zellen mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 eine signifikante Minderung des zytoprotektiven Effekts des GC sichtbar wurde. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit der aktuellen Literatur. Denn auch hier konnte unter anderem in chinesischen Hamsterovarialzellen (CHO) eine Aktivierung des nachweislich anti-apoptisch wirksamen S1P₃-Rezeptorsubtypes durch den Lipidmediator S1P mit einer Aktivierung der PI3K verknüpft werden (Banno et al., 2001; Radeff-Huang et al., 2004).

4.5.2 Die essentielle Bedeutung der Akt-Kinase für den zytoprotektiven Effekt von Dex

Die Akt-Kinase – weiterhin auch bekannt als Proteinkinase B – spielt eine wichtige Rolle, wenn es um die Vermittlung von intra- oder extrazellulärer Signale in Zellen geht (New et al., 2007). Funktionell gesehen handelt es sich bei der Akt-Kinase um eine Familie von drei gleichwertigen Isoenzymen, namentlich Akt1, Akt2, und Akt3 (gleichzusetzen mit PKB α , PKB β und PKB γ), welche verschiedene Funktionen in der

Zelle ausüben. Interessanterweise besteht zwischen den einzelnen Isoformen ein hohes Maß an funktioneller Übereinstimmung, jedoch zeigten detaillierte Untersuchungen der einzelnen Isoformen, dass diese durch verschiedene Agenzien induziert werden können oder auch verschiedene Substrate ansprechen (Dummler and Hemmings, 2007; Okano et al., 2000; Stambolic and Woodgett, 2006).

Darüber hinaus kommt der Akt-Kinase eine wichtige Funktion innerhalb des PI3K-Signalweges zu. Dieser Signalweg kann, wie bereits dargelegt, durch verschiedene Induktoren unter ihnen GPCR oder auch S1P aktiviert werden. Dabei kommt es zur Synthese von PIP₃, welches den Transport von Akt und der PDK1/2 an die Plasmamembran initiiert (Alessi et al., 1997). Anschließend erfolgt die Phosphorylierung der Isoform Akt1 an den Aktivierungsstellen Thr³⁰⁸ und Ser⁴⁷³ durch die PDK1/2 (Fayard et al., 2005). Dieser Vorgang wird zusätzlich durch weitere zell- und stimuluspezifische Kinasen unterstützt und resultiert in der Stabilisierung der aktiven Form von Akt1, welche nun zur Regulation spezifischer Zielproteine in den Nukleus verlagert wird (New et al., 2007).

Bei genauerer Betrachtung der zellulären Funktionen von Akt1 stehen die Vermittlung und Modulation von Proliferation und Zytoprotektion im Vordergrund (Icyuz et al., 2009; Yang et al., 2009). Diese Wirkungen können unter anderem auf eine vermehrte Expression von Akt1 in menschlichen Lungenfibroblasten zurückgeführt werden (Park et al., 2009). Darüber hinaus konnte eine Aktivierung der Akt1-Isoform in primären Rattenadipozyten auf die vorhergehende Stimulation mit Insulin zurück geführt werden (Kohn et al., 1995). Als weiterer Induktor von Akt1 konnte bisher PDGF identifiziert werden (Franke et al., 1995). Zusätzlich zeigte aber die Einwirkung von Kortikosteron auf neuronale Zellen nicht nur eine Regulation des Akt-Proteins, sondern gleichzeitig auch einen vermehrten Schutz der Neurone vor apoptotischen Vorgängen (Harms et al., 2007). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den dargestellten Untersuchungen zur Rolle von Akt und insbesondere seiner Isoform Akt1 in humanen Fibroblasten unter Einwirkung von Dex. So konnte anhand von Real-time PCR-Versuchen eine spezifische Regulation der Akt1-Isoform durch Dex bei einer maximal effektiven Konzentration von 1 μ M und einer Stimulationszeit von 8 h etabliert werden. Darüber hinaus war es von Interesse die Regulation von Akt und zwar insbesondere seiner aktivierten Form P-Akt auf Proteinebene zu analysieren. Dafür wurden Western Blot-Analysen unter Verwendung eines für die Phosphorylierungsstelle Ser⁴⁷³-spezifischen Antikörpers durchgeführt. Wie zu

erwarten resultierte die Stimulation von Dex in einer deutlichen Aktivierung von P-Akt. Interessanterweise ergaben sich maximal regulatorische Effekte einer Konzentration von 1 μ M des GC bei einer Stimulationszeit von 1h sowie auch bei 6 h Einwirkzeit von Dex. Diese zweiphasige Aktivierung der Akt-Kinase lässt sich durch den parallelen Verlauf von rapiden, nicht-genomischen und verzögert stattfindenden genomischen Effekten des GC erklären. Letztere sind dabei der Interaktion des GC mit dem GR und den daraus resultierenden Mechanismen der Transrepression und Transaktivierung geschuldet. Die nicht-genomischen Wirkungen von GC können dagegen auf die Aktivierung von membranständigen Rezeptoren oder auch auf die Beeinflussung von physikochemischen Eigenschaften der Zellmembran zurückgeführt werden (Buttgereit et al., 1993; Roy and Rai, 2009). Das Auftreten von nicht-genomischen Effekten wurde erstmalig an Patienten mit einer postoperativen Fehlfunktion der Nebenniere entdeckt, welche eine sehr schnelle Ansprache auf GC zeigten (Merry et al., 1994). Seitdem existieren auch viele andere Studien, welche belegen, dass die mannigfaltigen Wirkungen von GC nicht allein durch die Interaktion des GC mit dem GR zu erklären sind. Zusätzlich gibt es in diesem Zusammenhang eine breite Zustimmung zu der These, dass den nicht-genomischen Wirkungen ein nicht zu unterschätzender Stellenwert in der Wirkung von GC zukommt, insbesondere in Bezug auf die Erklärung apoptotischer Vorgänge (Boldizar et al., 2006; Buckingham, 1996; Sionov et al., 2006).

In einigen weiteren Versuchen sollte nun die Bedeutung der Akt-Kinase für den zytoprotektiven Effekt von Dex in humanen Fibroblasten näher abgesichert werden. Hierzu wurde das Verhalten von Fibroblasten anhand einiger durchflusszytometrischer Versuche unter Desensitivierung von Akt mittels siRNA in Gegenwart von Dex analysiert. Erwartungsgemäß zeigen die dargestellten Ergebnisse, dass die Funktionalität der Akt-Kinase essentiell für den anti-apoptotischen Effekt von Dex in humanen Fibroblasten ist. Dies steht unter anderem im Einklang mit Beobachtungen an Leukämiezellen, bei denen eine Ausschaltung der Akt-Kinase mittels spezifischer Inhibitoren zu einer verstärkten Apoptose der Zellen führte (de Frias et al., 2009). Außerdem zeigte die Desensitivierung von Akt mittels Akt siRNA in humanen Lungenfibroblasten eine deutlich erhöhte Rate an apoptotischen Zellen unter Einwirkung von ionisierender Strahlung (Park et al., 2009).

In einem nächsten Schritt war es erforderlich den anti-apoptotischen Effekt von Dex, welcher auf die Bildung von S1P zurückgeführt werden kann, mit der zytoprotektiven Aktivierung der Akt-Kinase durch Dex in Verbindung zu bringen. Wie dem Ergebnisteil dieser Arbeit entnommen werden kann, zeigen die daraufhin durchgeführten Western Blot-Untersuchungen an S1P₃^{-/-}- und Wildtyp-Fibroblasten eine stetige Induktion der Akt-Kinase durch Dex in Wildtyp-Zellen, wohingegen dieser Effekt in S1P₃^{-/-}-Zellen nicht mehr nachweisbar war. Insgesamt belegen die dargestellten Ergebnisse, dass der S1P-basierte, anti-apoptotische Effekt von Dex in humanen Fibroblasten eine Regulation und Aktivierung der Akt-Kinase auf mRNA- und Protein-Ebene umfasst. Auch für diese Beobachtungen gibt es zahlreiche, einschlägige Literaturhinweise. So gelang es unter anderem Banno et al. zu zeigen, dass der anti-apoptotische Effekt des S1P in CHO-Zellen neben einer Aktivierung der PI3K auch eine Induktion der Akt-Kinase beinhaltet (Banno et al., 2001). Ebenso konnte die Bedeutung von Akt für den zytoprotektiven Effekt von S1P in Endothelzellen oder hepatischen Myofibroblasten herausgestellt werden (Davaille et al., 2002; Greenspon et al., 2009). Zusätzlich gibt es auch Anhaltspunkte dafür, dass der S1P₃-Rezeptorsubtyp entscheidend mit an der Aktivierung der Akt-Kinase beteiligt ist. So konnten Means et al. zeigen, dass der S1P₂ und der S1P₃-Rezeptorsubtyp essentiell für den Schutz von Kardiomyozyten vor Ischämien sind (Means et al., 2007). Zudem konnte der S1P₃ als essentieller Teil des Signalweges für den anti-apoptotischen Effekt von VEGF in humanen, primären Epithelzellen etabliert werden (Fieber et al., 2006). Die dargestellten Untersuchungen zur Beteiligung der Akt-Kinase am anti-apoptotischen Effekt von Dex in humanen Fibroblasten unterstützen somit den aktuellen Stand der Forschung auf dem Gebiet der zytoprotektiven Aktivierung von Akt durch S1P-vermittelte Signalwege.

4.6 Beteiligung des Proteins Bcl_{XL} der Bcl-2-Familie am anti-apoptotischen Effekt von Dex

Es gibt die viele Mechanismen, die innerhalb der Zelle der zytoprotektiven Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs nachgeschaltet sind. Zu den wichtigsten unter ihnen zählen die Regulation von Proteinen der Forkhead Box o Transkriptionsfaktorfamilie, oder auch die Beeinflussung von Caspasen (Datta et al.,

1999). Darüber hinaus konnten auch einige Mitglieder der Bcl-2-Familie, denen eine entscheidende Bedeutung bei der Entscheidung über die Auslösung von Apoptose oder einer zytoprotektiven Wirkung auf die Zelle zukommt, als direkte Zielproteine der Akt-Kinase identifiziert werden (Flacke et al., 2009; Mukherjee et al., 2009; Yune et al., 2008). Die Proteine der Bcl-2-Familie lassen sich in zwei Klassen gliedern. Die eine Klasse ist an der Aktivierung und Regulation von pro-apoptotischen, mitochondrialen Signalwegen zur Auslösung von Apoptose beteiligt, die zweite Gruppe von Proteinen der Bcl-2-Familie hat eine hierzu gegenläufige Funktion in der Zelle. Zu den pro-apoptotischen Vertretern der Bcl-2-Familie werden Bax oder Bak und ihre Aktivatoren, die sogenannte BH3-only-Proteine gezählt (Dewson and Kluck, 2009). Zu den letztgenannten gehören zum Beispiel Bid oder auch Puma (Lomonosova and Chinnadurai, 2008). Demgegenüber stehen die anti-apoptotischen Vertreter der Bcl-2-Familie, nämlich Mcl-1, Bcl_{XL}, Bcl-w und Bfl-1 (Thomadaki and Scorilas, 2006). Beide Arten von Proteinen können durch eine Förderung (pro-apoptotische) oder Hemmung (zytoprotektiv) der Homo-Oligomerisierung der Proteine Bax und Bak die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und somit die Auslösung der Apoptose kontrollieren (Brunelle and Letai, 2009).

Der Eingriff in Vorgänge des PCD durch eine Regulation der anti-apoptotischen Vertreter der Bcl-2-Familie konnte eingehend beschrieben werden. So bezeichneten Jiang et al. die Aktivierung von Mcl-1 in humanen Melanozyten als kritischen Vorgang zur Inhibierung der Apoptose durch Stress des endoplasmatischen Retikulums (Jiang et al., 2008). Zusätzlich konnte eine positive Regulation von Mcl-1 durch VEGF oder IL-6 mit einer zytoprotektiven Wirkung in verschiedenen Krebszelllinien in Verbindung gebracht werden (Kobayashi et al., 2005; Le Gouill et al., 2004). Für das anti-apoptotische Protein Bcl-2 ergaben sich ähnliche Wirkungen: So zeigten „vascular smooth muscle cells“ (VSMC) in Gegenwart erhöhter Glucosekonzentrationen eine deutliche Induktion von Bcl-2 in Kombination mit einer erhöhten Widerstandsfähigkeit gegen apoptotische Prozesse (Li et al., 2005). Eine vergleichbar vorliegende zytoprotektive Wirkung von vermehrt vorliegendem Bcl-2 konnte als Ursache der Resistenz von Kardiomyozyten gegenüber oxidativem Stress nachgewiesen werden (Ren et al., 2009). Ebenso führten Untersuchungen an HEK93-Zellen unter Überexprimierung von Bcl-2 zu vergleichbaren Ergebnissen (Sandhu and Al-Rubeai, 2009). In Analogie zu den bisher vorgestellten Ergebnissen zeigte sich auch für Bcl_{XL}, welches im Mittelpunkt der Untersuchungen zum anti-

apoptotischen Effekt von Dex stand, eine starke anti-apoptotische Potenz. So ergab die Stimulation von Myelomzellen mit IL-6 eine deutliche Induktion von Bcl_{XL}, welche mit einem verstärkt anti-apoptotischen Effekt korrelierte (Schwarze and Hawley, 1995). Auch bei einer Überexprimierung des Proteins konnte ein starker zytoprotektiver Effekt verzeichnet werden (Wang et al., 2006; Zender et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit gelang es das Protein Bcl_{XL} als entscheidenden Mediator zur Beeinflussung des PCD durch Dex zu identifizieren. Dabei konnte allerdings nicht nur eine Beteiligung von Bcl_{XL} am anti-apoptotischen Effekt von Dex nachgewiesen werden, sondern auch eine fein regulierte Induktion des Proteins auf mehreren Ebenen dargestellt werden. So zeigten Untersuchungen an humanen Fibroblasten mittels Real-time PCR eine maximale Induktion des Proteins bei einer Stimulation der Zellen mit 1 μ M Dex für 16 h. Eine analog durchgeführte Untersuchung der Proteinexpression mittels Western Blot-Analyse führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Zudem konnte unter Anwendung des PI3K-Inhibitors LY294002 mittels Western Blot-Analyse auch die weitere Beteiligung von Bcl_{XL} am anti-apoptotischen Effekt von Dex in humanen Fibroblasten abgesichert werden. In Anwesenheit des Inhibitors konnte nämlich nur eine sehr geringe Expression des Bcl-2-Familie-Proteins registriert werden. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit dem aktuellen Stand der Literatur. So zeigte die Stimulation von verschiedenen Zelllinien mit Dex nicht nur eine positive Regulation der Bcl_{XL}-Spiegel durch das GC, sondern auch einen vorherrschenden Schutz dieser Zellen vor dem PCD (Ni Chonghaile et al., 2006; Petrella et al., 2006; Qian et al., 2009). Darüber hinaus konnte - genauso wie in der vorliegenden Arbeit - in epidermalen Keratinozyten oder auch Brustepithelzellen die zytoprotektive Induktion von Bcl_{XL} auf die Aktivität der Proteinkinase Akt zurückgeführt werden (Ramljak et al., 2003; Umeda et al., 2003). Zusätzlich beinhalten die vorliegenden Untersuchungen in humanen Fibroblasten Belege dafür, dass die Dex-induzierte, zytoprotektive Hochregulation von Bcl_{XL} auf die vorherige Aktivierung des S1P₃-Rezeptorsubtyps zurück zu führen ist. Anhand von Western Blot-Analysen an S1P₃^{-/-}- und Wildtyp-Mausfibroblasten konnte nämlich gezeigt werden, dass eine Induktion von Bcl_{XL} nur in Wildtyp-Fibroblasten erfolgte, wohingegen eine Regulation des Proteins in den S1P₃-defizienten Zellen ausblieb. Die Ergebnisse von Kim et al. unterstützen die erhaltenen Resultate der durchgeführten Versuche anhand ihrer Untersuchungen zum pro-apoptotischen Effekt von NN-Dimethyl-Sphingosin (DMPS), einem Inhibitor der Umwandlung von

Sphingosin zu S1P, in Leukämiezellen (Kim et al., 2009). Hier konnte gezeigt werden, dass eine Verminderung intrazellulärer S1P-Spiegel durch die Einwirkung von DMPS mit einer signifikanten Reduktion der Bcl_{xL}-Proteinexpression und einem daraus resultierenden verstärkten Apoptoserate der Zellen verbunden ist. Zusätzlich konnte eine Beeinflussung von Proteinen der Bcl-2-Familie und somit auch des PCD in T-Zellen beobachtet werden. Hier bewirkte die Stimulation von T-Zellen mit S1P eine deutliche Reduktion des intrazellulären Gehalts an pro-apoptotischem Bax (Goetzl et al., 1999).

Insgesamt belegen die Arbeiten der aufgeführten Autoren die in dieser Arbeit präsentierte Teilnahme des Proteins Bcl_{xL} am anti-apoptotischen Effekt von Dex und der Regulation des Mitglieds der Bcl-2-Familie durch das GC.

4.7 Beeinflussung des transmembranären, mitochondrialen Membranpotentials humaner Fibroblasten in Gegenwart von Dex

Ein weiterer essentieller Prozess, welcher mit der Auslösung der Apoptose in einer Zelle verbunden ist, besteht in einem Abfall des Potentials zwischen der mitochondrialen Matrix und dem Zytosol – auch transmembranäres mitochondriales Potential $\Delta\psi_m$ genannt (Ly et al., 2003). Als Ursache dieses Vorgangs konnte die Homo-Oligomerisierung der Proteine Bax und Bak der Bcl-2-Familie zu einer permeablen Durchlasspore beziffert werden (Brunelle and Letai, 2009). Nach Öffnung dieser Pore kommt es zur Reduktion von $\Delta\psi_m$ und zur Freisetzung weiterer apoptotischer Mediatoren wie dem Cytochrom C, welche dann zur Auslösung des PCD beitragen (Ly et al., 2003). Diese Zusammenhänge konnten bisher vielfach beschrieben werden: So verursachte die Einwirkung von Staurosporin auf humane Karzinomzellen, von Anthralin auf humane Keratinozyten oder auch von TNF α auf eine Melanomzelllinie einen Anstieg im mitochondrialen Potential der Zelle mit der anschließenden Auslösung der Apoptose (McGill et al., 2005; Sarkar et al., 2009; Thomas et al., 2000). Das $\Delta\psi_m$ stellt somit einen entscheidenden Parameter zur Beurteilung des Vitalitätsgrades einer Zelle dar.

Zusätzlich zeigten nähere Untersuchungen des $\Delta\psi_m$, dass das transmembranäre Potential einer Zelle durch externe Stimuli nicht nur zur Auslösung des PCD führen

kann, sondern zelltyp- und agensspezifisch auch zur Hemmung der Apoptose beiträgt. In diesem Zusammenhang konnte beispielsweise die anti-apoptotische Wirkung von EGF in fetalen Hepatozyten oder auch des insulinähnlichen Wachstumsfaktors (IGF)-1 auf Gefäßendothelzellen nachgewiesen werden (Fabregat et al., 2000; Li et al., 2009). Ebenso ist eine Beeinflussung des mitochondrialen, transmembranären Potentials durch Hormone wie 17- β -estradiol oder auch GC bekannt (Saffar et al., 2008; Simpkins and Dykens, 2008).

Die angeführte Literatur veranschaulicht einerseits die Bedeutung des transmembranären, mitochondrialen Membranpotentials für den Viabilitätsgrad einer Zelle, gibt aber gleichzeitig Evidenz dafür, dass eine zytoprotektive Beeinflussung von $\Delta\psi_m$ durch GC möglich sein kann. Daher war es nicht verwunderlich, dass in humanen Fibroblasten der anti-apoptotische Effekt von Dex auf eine Regulation von $\Delta\psi_m$ zurückgeführt werden konnte. Die Visualisierung der Änderung von $\Delta\psi_m$ erfolgte dabei mit dem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff JC-1. Um eine Beeinflussung des mitochondrialen Potentials durch andere Signale als die Dex-abhängige intrazelluläre Synthese von S1P und dessen Aktivierung des S1P₃ auszuschließen, schloss sich eine Analyse des mitochondrialen, transmembranären Potentials in mit Dex stimulierten S1P₃^{-/-}- und Wildtyp-Fibroblasten an. Wie zu erwarten verhinderte das GC in Wildtyp-Fibroblasten eine Minderung von $\Delta\psi_m$, wohingegen dieser Effekt in S1P₃^{-/-}-Fibroblasten nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse veranschaulichen, dass der zytoprotektive Effekt von Dex die Regulation des transmembranären, mitochondrialen Potentials mit einschließt. Die Beeinflussung von $\Delta\psi_m$ durch ein Sphingolipid konnte auch an anderen Zelltypen etabliert werden. So ergab die Stimulation von kardialen Mitochondrien mit Sphingosin eine Veränderung des mitochondrialen, transmembranären Potentials (Hassoun et al., 2006). Darüber hinaus resultierte die Inhibition der intrazellulären S1P-Synthese, durch die Stimulation von Leukämie- oder auch Prostatakarzinomzellen mit den SphK-Inhibitoren DMS oder SK II, einen deutlichen Anstieg des mitochondrialen, transmembranären Potentials verknüpft mit einem Anstieg der Apoptoseraten in diesen Zellen (Kim et al., 2009; Leroux et al., 2007).

Insgesamt stehen die dargestellten Ergebnisse zur Untersuchung des Einflusses von Dex auf das mitochondriale, transmembranäre Potential in Verbindung mit dem zytoprotektivem Effekt des GC im Einklang mit der aktuellen Literatur. Dabei wird die These einer Dex-induzierten Verhinderung des pro-apoptotischen Shifts des

mitochondrialen, transmembranären Potentials unterstützt und konnte in den selbst durchgeführten Versuchen bestätigt werden.

4.8 Beteiligung der Caspasen 3 und 7 am zytoprotektiven Effekt von Dex in humanen Fibroblasten

Bevor in einer Zelle die Auslösung des PCD über den intrinsischen oder extrinsischen Signalweg vollzogen wird, findet oftmals ein komplexes Zusammenspiel spezifischer Aktivatoren, den Caspasen, statt (Brunelle and Letai, 2009). Die Gruppe der Caspasen umschließt zwei Arten von Zymogenen, welche entweder eine initiierende Funktion haben (Initiatorcaspasen) oder die Aktivierung einer weitreichenden Signalkaskade unter Beteiligung verschiedener Caspasen zur Folge haben (Effektorcaspasen) (Riedl and Shi, 2004). Zu den Initiatorcaspasen werden die Caspasen 8, 9 und 10 gezählt. Im Gegensatz hierzu handelt es sich bei den Caspasen 3, 6 und 7 um Effektorcaspasen (Matteucci et al., 2009). Die funktionelle Beeinflussung der einzelnen Caspasen stellt somit einen wichtigen Punkt in der Regulation des PCD dar.

In diesem Zusammenhang konnte unter anderem gezeigt werden, dass eine Aktivierung der Caspase 3 eng mit einer erhöhten Apoptoserate verknüpft ist. So zeigte die Stimulation von Gallenkarzinomzellen mit dem Apoptose induzierenden Zytokin $TNF\alpha$ oder auch die Behandlung von COS-7-Fibroblasten mit Staurosporin einen deutlichen Anstieg der Aktivität von Caspase 3. Diese stellt einen wesentlichen Punkt in der Auslösung des PCD dar (Tesauro et al., 2006; Utaisincharoen et al., 2000). Im Gegensatz zu diesen Resultaten konnte die Hemmung der Caspase 3 durch verschiedene Substanzen mit einem verstärkt anti-apoptotischen Effekt in Verbindung gebracht werden. So bewirkte die Stimulation von renalen Epithelzellen mit Wachstumsfaktoren, oder auch die Behandlung von Gefäßendothelzellen mit hormonähnlichen Substanzen eine deutlich verringerte Caspase 3-Aktivität, verbunden mit einer nachhaltig zytoprotektiven Wirkung (Yu et al., 2009; Zhang et al., 2008). Zusätzlich konnte dieser Effekt auch bei der anti-apoptotischen Einwirkung von Dex auf Nierenzellen oder C6-Gliomazellen nachgewiesen werden (Kumar et al., 2009; Qian et al., 2009). Interessanterweise lies sich die zytoprotektive Wirkung des GC in den beiden zuletzt aufgeführten Fällen auf eine Aktivierung des Proteins Bcl_{XL}

der Bcl-2-Familie zurückführen. Ebenso gibt es in der aktuellen Literatur Hinweise dafür, dass der Lipidmediator S1P über ein fein reguliertes Zusammenspiel von Bcl_{XL} und Caspase 3 zu einer nachhaltigen Hemmung des PCD führt (Hofmann et al., 2008).

Daher war es nicht überraschend, dass die fluoreszenzbasierte Analyse der Beeinflussung der Caspase 3-Spiegel in humanen Fibroblasten durch Dex eine reduzierte Aktivität der Protease ergab. Dieses Ergebnis steht nicht nur im Einklang mit der aktuellen Literatur, sondern erlaubt die Vermutung, dass die durch Dex verursachte reduzierte Aktivität der Caspase 3 in humanen Fibroblasten auf den S1P-basierten, anti-apoptotischen Effekt des GC zurückzuführen ist. Zusätzlich erscheint anhand der Ergebnisse anderer Forschergruppen die Beteiligung des Bcl-2-Familie-Proteins Bcl_{XL} an der Inhibierung der Caspase 3 wahrscheinlich.

4.9 Bedeutung des anti-apoptotischen Effekts von Dex in humanen Fibroblasten

Zusammenfassend tragen die Ergebnisse das dargelegten Promotionsvorhabens näher zum Verständnis der zytoprotektiven Wirkungen von Dex in humanen Fibroblasten bei. Dies ermöglicht zum einen näher die ablaufenden physiologischen Prozesse in der Haut unter Anwendung von GC zu verstehen, zum anderen ergeben sich aber auch einige relevante Anwendungsgebiete im Bereich der Chemotherapie. Das maligne Melanom ist aufgrund seiner Eigenschaft in vielen Bereichen des Körpers im hohen Maße Metastasen zu entwickeln, die am häufigsten tödlich verlaufende Art von Tumorerkrankungen der Haut (Jemal et al., 2006; Liotta and Stetler-Stevenson, 1991). Mitunter konnte nachgewiesen werden, dass für die Bildung von Metastasen die Migration der entarteten Melanozyten Voraussetzung ist. Eine genauere Charakterisierung dieses Vorganges belegte dabei, dass die Mikroumgebung des Tumors, insbesondere die Proteolyse von anwesendem Kollagen durch die von Fibroblasten gebildete MMP 1, die Voraussetzung für die Migration und folglich die Metastasierung der entarteten Zellen darstellt (Benbow et al., 1999; Fidler, 1995). In diesem Zusammenhang konnte zusätzlich nachgewiesen werden, dass die Bildung von Metastasen eng mit der Anwesenheit von Fibroblasten verbunden ist (Wandel et al., 2000; Wandel et al., 2002). Davon lässt sich ableiten,

dass Arzneistoffe oder Biomoleküle, welche zu einer erhöhten Überlebensrate der Fibroblasten in der Mikroumgebung des Tumors führen, sich negativ auf eine mögliche Chemotherapie, die Bildung von Metastasen und auch auf die Entwicklung von Resistenzen auswirken kann.

Insofern sollte auch die Anwendung von Dex im Rahmen der Kombinationstherapie mit Zytostatika für das maligne Melanom überdacht werden. Dex konnte in diesem Zusammenhang zwar als potentes Antiemetikum die Prävalenz des zytostatika-induzierten Erbrechens während der Therapie des malignen Melanoms deutlich mindern und wird auch häufig zur erhöhten Sensitivierung von entarteten Zellen gegenüber ihrem Chemotherapeutikum eingesetzt, allerdings ist auch bekannt, dass der Einsatz von GC zu einer verstärkten Resistenzbildung gegen das Tumorthapeutikum beitragen kann. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die Anwendung von GC die Entstehung von Tumorerkrankungen der Haut begünstigt (Mattern et al., 2007; Sorensen et al., 2004).

Vor dem derzeitigen Hintergrund, dass GC einerseits in Abhängigkeit vom Zelltyp sowohl pro- als auch anti-apoptische Wirkungen aufweisen können und zur Entstehung von Resistenzen beitragen können, ist die Frage nach einer kombinierten Gabe von GC in Verbindung mit einer Zytostatikatherapie kritisch zu betrachten. In Bezug auf die Ergebnisse dieser Arbeit und das maligne Melanom an sich, ist es auch möglich, dass der anti-apoptische Effekt von Dex in humanen Fibroblasten mit zur Ausbildung von Resistenzen gegen die verwendeten Chemotherapeutika beiträgt und auch an der Entwicklung von Metastasen des malignen Melanoms beteiligt sein kann. Die Aufklärung des anti-apoptischen Mechanismus von Dex in humanen Fibroblasten kann demzufolge eine mögliche Erklärung für das Fehlschlagen einer Zytostatikatherapie, welches sich häufig in der starken Metastasierung des malignen Melanoms äußert, repräsentieren. Diese These erfordert aber noch weitere, detaillierte Untersuchungen, welche die Auswirkung von Dex auf die Entwicklung von Resistenzen und auch der Metastasierung des malignen Melanoms im Rahmen der Tumorthherapie untersuchen.

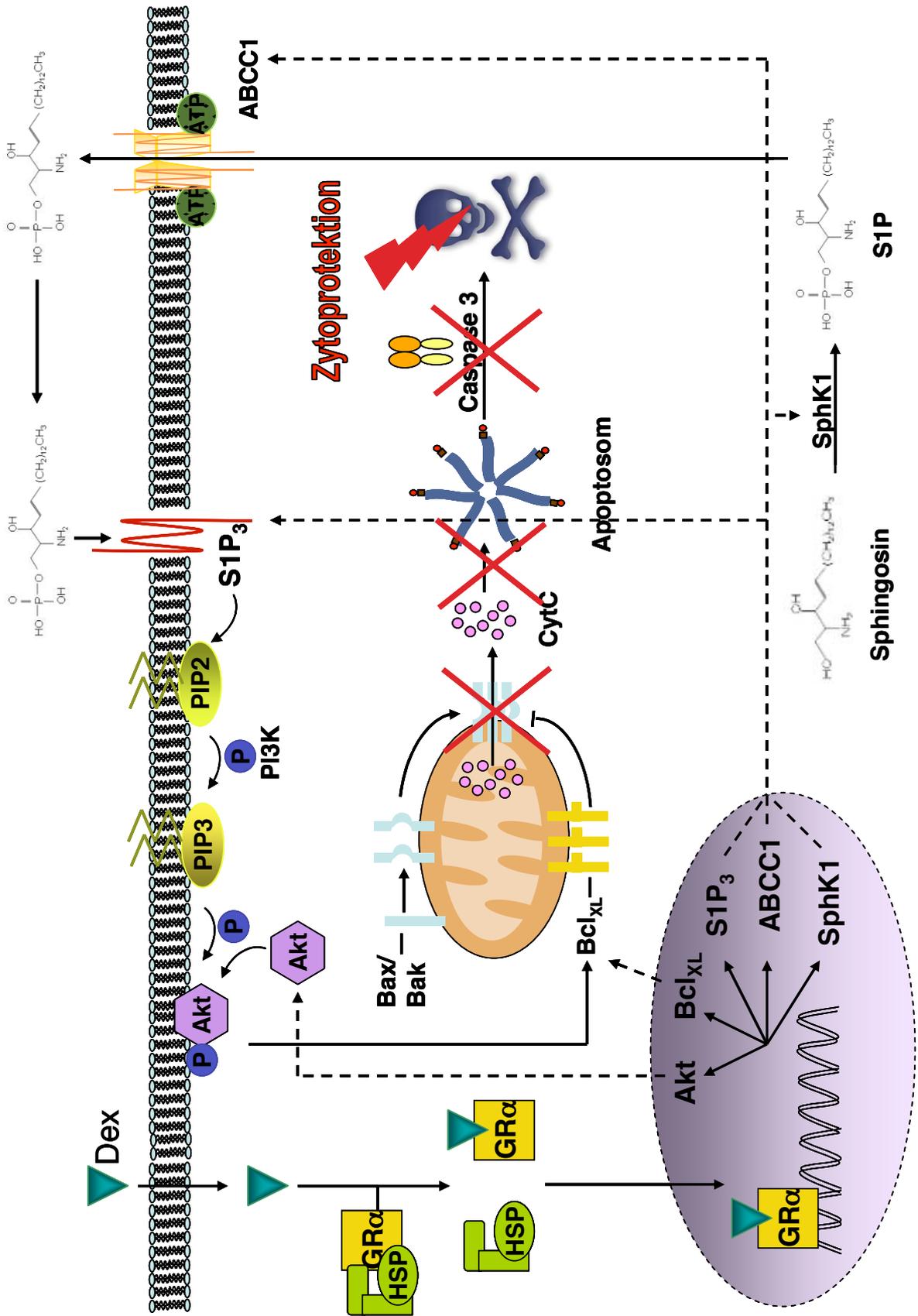


Abb. 38 Zusammenfassung des Signalwegs der anti-apoptotischen Wirkung von Dex in humanen Fibroblasten.

5 Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung

Glukokortikoide (GC) stellen aufgrund ihrer potenten anti-inflammatorischen und immunsuppressiven Eigenschaften eine der am häufigsten verwendeten Arzneistoffklassen zur Therapie von entzündlichen Erkrankungen dar. Zudem werden sie häufig in der Begleitmedikation zur Therapie von malignen Tumoren als Antiemetika eingesetzt. Allerdings kann ihr Einsatz mit der Entwicklung schwerer und teilweise sogar therapielimitierender Nebenwirkungen verbunden sein. In Bezug auf die Haut entwickeln viele Patienten eine teils irreversible Hautatrophie, welche durch den Verlust der Elastizität und Stabilität der Haut aufgrund einer anti-proliferativen Wirkung auf die Zellen der Epidermis (Keratinozyten) und Dermis (Fibroblasten) verbunden ist. Zudem konnte eine starke pro-apoptotische Wirkung von GC auf Keratinozyten beobachtet werden. In humanen dermalen Fibroblasten hingegen zeigte die Anwendung von Dexamethason (Dex) einen genau entgegengesetzten Effekt. Diese Eigenschaft von GC in Abhängigkeit vom Zelltyp sowohl pro-apoptotische als auch zytoprotektive Wirkungen vermitteln zu können spielt auch bei der Therapie von Tumorerkrankungen eine Rolle. Hier wird vor allem das GC Dex als Agens zur Steigerung der Apoptoserate sowie zur Vorbeugung des zytostatika-antizipatorischen Erbrechens eingesetzt. Daher sind ein genaues Hinterfragen der Anwendung von GC im Rahmen einer Tumorthherapie und die weitere Untersuchung der Signalwege und Ursachen für die divergente Wirkung von GC bei der Auslösung der Apoptose von Bedeutung. Vor diesem Hintergrund war es von Interesse die genauen Wirkungen, welche mit der anti-apoptotischen Wirkung von Dex in humanen Fibroblasten verbunden sind zu charakterisieren.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der zytoprotektive Effekt von Dex auf einer Regulation des Sphingolipidreostats beruht. Die beteiligten Sphingolipide Ceramid, Sphingosin und Sphingosin-1-Phosphate (S1P) wurden lange Zeit nur als strukturelle Bestandteile von Membranen angesehen, heute allerdings sind sie vielmehr als hochreaktive Signallipide bekannt, welche unter anderem an der Regulation des programmierten Zelltods (Ceramid, Sphingosin) oder auch an der Vermittlung von zytoprotektiven Wirkungen (S1P) beteiligt sind. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Dex durch eine vermehrte Umwandlung von Ceramid über Sphingosin zu S1P unter Regulation der Sphingosinkinase 1 einen zytoprotektiven Effekt auf humane Fibroblasten ausübt.

Diese Umwandlung von Ceramid zu S1P geschieht im Zytosol der Zelle. Für den Lipidmediator S1P sind jedoch sowohl intrazelluläre Wirkungen, wie die Mobilisierung von Calcium oder auch die Proliferation einer Zelle, sowie auch die Vermittlung von Effekten über eine Aktivierung von extrazellulär lokalisierten Rezeptoren, den sogenannten S1P-Rezeptoren, bekannt. Im Detail konnten bisher fünf S1P-Rezeptoren, S1P₁₋₅ identifiziert werden, welche auch zur Vermittlung von zytoprotektiven Wirkungen befähigt sind. Allerdings konnte bisher noch nicht genau charakterisiert werden, wie intrazellulär gebildetes S1P zu einer Aktivierung von extrazellulär lokalisierten G-Protein gekoppelten Rezeptoren beitragen kann. In diesem Zusammenhang wurde zunächst eine Sekretion des Lipidmediators durch die Zelle selbst, aber auch die Beteiligung von spezifischen „ATP-binding cassette“ (ABC)-Transportern diskutiert. Eine genaue Charakterisierung des Dex-induzierten Exportprozesses von S1P in humanen Fibroblasten ergab dabei eine eindeutige Beteiligung des ABC-Transporters ABCC1 am anti-apoptotischen Effekt des GC. Zudem konnte auch eine Regulation des ABC-Transporters sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene durch Dex etabliert werden. Darüber hinaus konnten in weiteren Versuchen die Partizipation und gleichzeitig auch die Dex-induzierte Regulation des S1P-Rezeptorsubtyps S1P₃ am anti-apoptotischen Effekt von Dex nachgewiesen werden. Einer der am häufigsten angeregten zytoprotektiven Signalwege innerhalb einer Zelle umfasst die Aktivierung der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) und der Proteinkinase Akt. Dabei kommt es durch die Aktivität der PI3K zur Bildung von Phosphoinositol-(3,4,5)-Triphosphat, welches zur Stimulation der Akt-Kinase beitragen kann. Die Daten der vorliegenden Arbeit bestätigen den Verlauf des anti-apoptotischen Effekts von Dex über eine Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges innerhalb der Zelle. Auch hier konnte eine Regulation der Akt-Kinase durch Dex nachgewiesen werden. Ein weiterer wichtiger Punkt zur Auslösung der Apoptose oder Wahrnehmung von zytoprotektiven Wirkungen innerhalb der Zelle besteht in der Regulation der Proteine der „B-Zell Lymphom 2“ (Bcl-2)-Familie auf mitochondrialer Ebene. Hier entscheidet das zahlenmäßige Verhältnis der pro-apoptotischen Vertretern, wie Bak (Bcl-2 homologer Antagonist/Killer) oder Bax (Bcl-2 assoziiertes Protein), im Vergleich zur Anzahl der anti-apoptotischen Proteine, wie Bcl-2-like 1 (Bcl_{XL}) oder Myeloid Cell Leukemia-1 (Mcl-1), über die Bildung einer Permeabilisationspore in der Mitochondrienmembran. Im Falle der Wirkung von Dex auf humane Fibroblasten kommt es zur Induktion des anti-apoptotischen Bcl_{XL} auf

mRNA- und Proteinebene, welches die pro-apoptotischen Vertreter Bax und Bak an der Homo-Oligomerisierung und somit an der Bildung der mitochondrialen Permeabilisationspore hindern kann. Dieser Prozess ist weiterhin durch eine Änderung des transmembranären, epithelialen Potentials, die Freisetzung des Cytochroms C und die anschließende Aktivierung einer Kaskade von pro-apoptotischen Zymogenen, den Caspasen, gekennzeichnet. In diesem Zusammenhang konnte ebenfalls eine anti-apoptotische Änderung des transmembranären epithelialen Potentials der Mitochondrien durch Dex, sowie auch eine verminderte Aktivität der Caspasen 3 und 7 in humanen Fibroblasten durch die Einwirkung des GC identifiziert werden.

Die dargelegten Ausführungen zeigen, auf welche Art und Weise Dex zum Überleben von Fibroblasten gegenüber apoptotischen Reizen beiträgt. Eine Erkrankung, für die diese Wirkung von Bedeutung sein kann ist das maligne Melanom. Dabei handelt es sich um eine schwer therapierbare neoplastische Erkrankung der Haut, bei der es häufig auch nach einer Therapie mit Zytostatika in Kombination mit Dex zur Vorbeugung von Erbrechen zur Ausbildung von Metastasen kommt. Als Einflussfaktoren für die Metastasierung dieser Krebsart zeichnete sich vor allem die Ausgestaltung der Mikroumgebung des Tumors unter anderem auch die Anwesenheit von Fibroblasten verantwortlich. Diese sind nämlich durch die Bildung der Matrixmetalloproteinase 1 zur Auflösung von Kollagen befähigt, einer Voraussetzung für die Metastasierung der entarteten Melanozyten. Vor diesem Hintergrund kann der identifizierte Signalweg zur anti-apoptotischen Wirkung von Dex in humanen Fibroblasten näher zum Verständnis der Entstehung von Metastasen während einer Kombinationstherapie aus Zytostatikum und GC beitragen. Eine detaillierte weitere Analyse dieser Auswirkungen im Zusammenhang mit der Anwendung von GC in Kombination mit einer Zytostatikatherapie zur Behandlung des malignen Melanoms steht allerdings noch aus.

5.2 Abstract

Due to their potent antiinflammatory and immunosuppressive properties glucocorticoids (GC) represent one of the most commonly used drugs in medicine for the therapy of phlogistic diseases. Thus they display potent antiemetic cotherapeutics during a treatment with cytostatic drugs. Nevertheless their use may be connected to the development of severe and sometimes therapy-limitating side effects. Concerning the skin many patients show the formation of a partial irreversible skin atrophy, which is characterised by a reduced elasticity and stability of the skin caused by anti-proliferative actions of the GC on epidermal (keratinocytes) and dermal (fibroblasts) cells. Thus a pronounced apoptotic effect has been detected in keratinocytes, whereas in human fibroblasts a strong cytoprotective effect of the GC dexamethasone (Dex) was visible. Depending on a specific cell type GC may exert pro-apoptotic as well as cytoprotective effects. This phenomenon has gained broad attention during the last years even concerning the therapy of malignant tumors. In this context the GC Dex is often used as a cotherapeutic drug to increase the potency of chemotherapeutics as well as for the prevention of cytostatic-induced vomiting and nausea. Consequently it is important to analyze the detailed signalling pathways which are involved in the induction of apoptosis or cytoprotection of cells by GC to optimize anti-tumor therapy. For this reason it was of interest to characterize the detailed mechanisms which are part of the anti-apoptotic property of Dex in human fibroblasts.

The present study provides evidence that the cytoprotective effect of Dex in human fibroblasts is based on a tight regulation of the sphingolipid-rheostat. For a long time membrane-sphingolipids, namely ceramide, sphingosine and sphingosine-1-phosphate (S1P) have only been expected to represent structural parts of the plasmamembrane. But nowadays they are considered as important signalling lipids exerting apoptotic effects (ceramide, sphingosine) as well as cytoprotective properties (S1P). In this study for the first time we provide evidence that the GC Dex is able to mediate its cytoprotective effect in human fibroblasts via the conversion of intracellular ceramide into sphingosine and the following transformation into cytoprotective S1P. This process includes the tight regulation of a distinct, cytosolic kinase, the sphingosine kinase 1. Most interestingly it has been established that the

phospholipid S1P is able to signalize its anti-apoptotic effect by activation of both intracellular and extracellular located signalling molecules. To further substantiate the involvement of specific G-protein coupled receptors, namely S1P-receptors, were identified as extracellular targets of anti-apoptotic S1P. Up to now five receptor subtypes S1P₁₋₅ have been characterized. Nevertheless it still remains unclear how intracellular generated S1P activates extracellular located receptors. Several years ago the common opinion implicated a secretion of the lipid mediator in an autocrin manner, but nowadays the involvement of specific ATP binding cassette (ABC)-transporters is discussed. In this study a detailed analysis of the involvement of ABC-transporters in the anti-apoptotic signalling pathways of Dex revealed the participation of the ABC-transporter ABCC1. Moreover a tightly regulated induction of mRNA and protein-levels has been shown. Thus characterization of the involvement of a distinct S1P-receptor in the anti-apoptotic effect of Dex identified the S1P₃ as crucial mediator of cytoprotection. One of the most prominent mediators of intracellular cytoprotection has been referred to as the phosphoinositide-3-kinase (PI3K)/Akt signalling pathway. In detail the PI3K promotes the generation of phosphoinositide-(3,4,5)-trisphosphate which causes the activation of the protein kinase Akt. The present study provides evidence that the anti-apoptotic signalling mechanism initiated by Dex comprises the activation of PI3K/Akt including a tight regulation of mRNA and protein levels of Akt. Further studies implicate the involvement of the B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) family as an important parameter for the life death decision of a cell. This family of mitochondrial proteins includes pro-apoptotic members like Bak (Bcl-2 homologue antagonist/killer) or Bax (Bcl-2 associated protein) as well as cytoprotective members like Bcl-2-like 1 (Bcl-x_L) or myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1). Moreover the ratio of pro- and anti-apoptotic proteins displays the key parameter to predict cell death or survival. Once there is a predominance of apoptotic family members Bax and Bak homooligomerize to perform the generation of a mitochondrial permeabilization pore to export important proteins like cytochrome C to the extracellular space. In the present study we provide evidence that Dex is able to prevent the permeabilization of cellular mitochondria by influencing the ratio of pro- and anti-apoptotic Bcl-2 family proteins via a tightly regulated induction of Bcl-x_L mRNA- and protein-levels. In general this process is characterized by a distinct change in the mitochondria transepithelial potential accompanied by the release of cytochrome C and the activation of caspases.

Therefore corresponding experiments were performed and as expected revealed that Dex was able to inhibit the change in mitochondrial transepithelial membrane potential as well as the activation of caspase 3 and 7.

As a conclusion the present study characterizes the detailed signalling pathway of the cytoprotective effect of Dex in human fibroblasts. These findings may be of interest concerning the treatment of the malignant melanoma, one of the most challenging kinds of skin-cancer which has often been identified to develop therapy-limitating metastases. In detail it has been discovered that the structural organization of the tumor micro environment, especially the presence of fibroblasts, displays an important parameter for the formation of metastases. More precisely it has been elucidated that secretion of matrix metalloproteinase 1 is accountable for the cleavage of collagen, a distinct requirement for the migration of malignant melanocytes. As a conclusion the identified signalling pathway of the cytoprotective effect of Dex in human fibroblasts may contribute to the understanding of the formation of metastases during the combined use of a cytostatic drug and Dex. Nevertheless it is unavoidable to perform further experiments which directly analyze the impact of the use of GC during chemotherapy.

6 Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP binding cassette
AIF	apoptosis inducing factor
APAF1	Apoptotic peptidase activating factor 1
AP-1	Aktivatorprotein 1
APS	Ammoniumpersulfat
ASO	Antisenseoligodesoxynukleotid
ATP	Adenosintriphosphat
Bak	Bcl-2 homologer Antagonist/Killer
Bax	Bcl-2 assoziiertes Protein
Bcl-2	B-Cell Lymphoma 2
Bcl-x _l	Bcl-2-like 1
Bfl-1	Bcl-2-Related Protein A1
BH-Domäne	Bcl-2-Homologie-Domäne
Bid	Bcl2-interacting domain death agonist
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death
BSA	Bovine Serum Albumin
CHO	chinese hamster ovarial
CytC	Cytochrom C
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DD	Death Domain
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dex	Dexamethason
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DMEM	Dubleco`s modified Eagle`s medium
DMPS	NN-Dimethyl-Sphingosin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extracellular Matrix
Edg	Endothelial differentiation gene
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular signal-regulated kinase

ESI	Elektronensprayionisation
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FADD	Fas associated protein with DD
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	Forward Scatter
GC	Glukokortikoid
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GR	Glukokortikoid-Rezeptor
H0	Nullhypothese
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HRP	Horseraddish peroxidase
HSP	Heat Shock Protein
IGF-1	insulinähnlichen Wachstumsfaktors
IL	Interleukin
IUPHAR	International Union of Pharmacology
I κ B	Inhibitor κ B
JC-1	5,5,6,6-Tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanin-Iodid
JNK	c-jun-N-terminal kinase
LC	Flüssigchromatographie
L-NAME	N $_{\omega}$ -Nitro-L-argininmethylesterhydrochlorid
LPA	Lysophosphatidsäure
MAPK	mitogen activated protein kinase
Mcl-1	Myeloid Cell Leukemia-1
MDR	Multi-Drug Resistance
MDR-1	Multi-Drug Resistance Protein 1
MMP-1	Matrix-Metallo-Proteinase 1
MOMP	mitochondrial outer membrane permeabilization
MRP-1	multidrugresistance associated protein 1
MS	Massenspektrometrie
NF κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase

ODN	Oligodesoxynukleotide
OPA	ortho-Phthalaldehyd
o-TOF	orthogonale Flugzeit
P-Akt	Phosphoryliertes Akt
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCD	Programmierter Zelltod
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDK	phosphoinositide dependent Kinase
PGP	P-Glykoprotein
PH-Domäne	Pleckstrim Homologie-Domäne
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositidkinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidyl-3,4,5-Triphosphat
PKB	Protein Kinase B
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
Puma	P53 upregulated mediator of apoptosis
PVDF	Polyvinyliden-difluorid
RFU	Relative Fluoreszenz Unit
RIP	Rezeptor-interagierende Protein
RNAi	RNA-Interferenz
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
scr-ODN	scrambled ODN
SDS	Sodium Dodecyl-Sulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidelektrophorese
SphK	Sphingosinkinase
SSC	Sideward Scatter
ssRNA	single strain RNS
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin
TNFR1	TNF α -Rezeptor 1
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TRADD	TNFR1 assoziiertes Todesdomänenprotein

TRAF	TNFR assoziierter Faktor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cell
$\Delta\psi_m$	Transmembranäres mitochondriales Potential

7 Literaturverzeichnis

- Adams F, Grassie M, Shahid M, Hill DR, Henry B. 2003. Acute oral dexamethasone administration reduces levels of orphan GPCR glucocorticoid-induced receptor (GIR) mRNA in rodent brain: potential role in HPA-axis function. *Brain Res Mol Brain Res* 117(1):39-46.
- Alemay R, van Koppen CJ, Danneberg K, Ter Braak M, Meyer Zu Heringdorf D. 2007. Regulation and functional roles of sphingosine kinases. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 374(5-6):413-428.
- Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P. 1997. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol* 7(4):261-269.
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87(2):171.
- Amsterdam A, Sasson R. 2002. The anti-inflammatory action of glucocorticoids is mediated by cell type specific regulation of apoptosis. *Mol Cell Endocrinol* 189(1-2):1-9.
- Amsterdam A, Tajima K, Sasson R. 2002. Cell-specific regulation of apoptosis by glucocorticoids: implication to their anti-inflammatory action. *Biochem Pharmacol* 64(5-6):843-850.
- An S, Zheng Y, Bleu T. 2000. Sphingosine 1-phosphate-induced cell proliferation, survival, and related signaling events mediated by G protein-coupled receptors Edg3 and Edg5. *J Biol Chem* 275(1):288-296.
- Anliker B, Chun J. 2004. Cell surface receptors in lysophospholipid signaling. *Semin Cell Dev Biol* 15(5):457-465.
- Aram G, Potter JJ, Liu X, Torbenson MS, Mezey E. 2008. Lack of inducible nitric oxide synthase leads to increased hepatic apoptosis and decreased fibrosis in mice after chronic carbon tetrachloride administration. *Hepatology* 47(6):2051-2058.
- Autelli R, Ullio C, Prigione E, Crepaldi S, Schiavone N, Brunk UT, Capaccioli S, Baccino FM, Bonelli G. 2009. Divergent pathways for TNF and C(2)-ceramide toxicity in HTC hepatoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1793(7):1182-1190.
- Autio P, Oikarinen A, Melkko J, Risteli J, Risteli L. 1994. Systemic glucocorticoids decrease the synthesis of type I and type III collagen in human skin in vivo, whereas isotretinoin treatment has little effect. *Br J Dermatol* 131(5):660-663.
- Ayaori M, Sawada S, Yonemura A, Iwamoto N, Ogura M, Tanaka N, Nakaya K, Kusahara M, Nakamura H, Ohsuzu F. 2006. Glucocorticoid receptor regulates ATP-binding cassette transporter-A1 expression and apolipoprotein-mediated cholesterol efflux from macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(1):163-168.
- Bajjalieh SM, Martin TF, Floor E. 1989. Synaptic vesicle ceramide kinase. A calcium-stimulated lipid kinase that co-purifies with brain synaptic vesicles. *J Biol Chem* 264(24):14354-14360.
- Banno Y, Takuwa Y, Akao Y, Okamoto H, Osawa Y, Naganawa T, Nakashima S, Suh PG, Nozawa Y. 2001. Involvement of phospholipase D in sphingosine 1-phosphate-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt in Chinese hamster ovary cells overexpressing EDG3. *J Biol Chem* 276(38):35622-35628.
- Barnes PJ. 2006. Corticosteroids: the drugs to beat. *Eur J Pharmacol* 533(1-3):2-14.
- Barnes PJ, Karin M. 1997. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 336(15):1066-1071.

- Benbow U, Schoenermark MP, Mitchell TI, Rutter JL, Shimokawa K, Nagase H, Brinckerhoff CE. 1999. A novel host/tumor cell interaction activates matrix metalloproteinase 1 and mediates invasion through type I collagen. *J Biol Chem* 274(36):25371-25378.
- Bertorelli G, Bocchino V, Olivieri D. 1998. Heat shock protein interactions with the glucocorticoid receptor. *Pulm Pharmacol Ther* 11(1):7-12.
- Bianchini R, Nocentini G, Krausz LT, Fettucciari K, Coaccioli S, Ronchetti S, Riccardi C. 2006. Modulation of pro- and antiapoptotic molecules in double-positive (CD4+CD8+) thymocytes following dexamethasone treatment. *J Pharmacol Exp Ther* 319(2):887-897.
- Biemans-Oldehinkel E, Doeven MK, Poolman B. 2006. ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS Lett* 580(4):1023-1035.
- Blom T, Slotte JP, Pitson SM, Tornquist K. 2005. Enhancement of intracellular sphingosine-1-phosphate production by inositol 1,4,5-trisphosphate-evoked calcium mobilisation in HEK-293 cells: endogenous sphingosine-1-phosphate as a modulator of the calcium response. *Cell Signal* 17(7):827-836.
- Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH, Wallach D. 1995. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* 270(14):7795-7798.
- Boldizsar F, Palinkas L, Czompoly T, Bartis D, Nemeth P, Berki T. 2006. Low glucocorticoid receptor (GR), high Dig2 and low Bcl-2 expression in double positive thymocytes of BALB/c mice indicates their endogenous glucocorticoid hormone exposure. *Immunobiology* 211(10):785-796.
- Bonnaud S, Niaudet C, Pottier G, Gaugler MH, Millour J, Barbet J, Sabatier L, Paris F. 2007. Sphingosine-1-phosphate protects proliferating endothelial cells from ceramide-induced apoptosis but not from DNA damage-induced mitotic death. *Cancer Res* 67(4):1803-1811.
- Booth BA, Tan EM, Oikarinen A, Uitto J. 1982. Steroid-induced dermal atrophy: effects of glucocorticosteroids on collagen metabolism in human skin fibroblast cultures. *Int J Dermatol* 21(6):333-337.
- Bos JD, Spuls PI. 2008. Topical treatments in psoriasis: today and tomorrow. *Clin Dermatol* 26(5):432-437.
- Bosca L, Hortelano S. 1999. Mechanisms of nitric oxide-dependent apoptosis: involvement of mitochondrial mediators. *Cell Signal* 11(4):239-244.
- Brunelle JK, Letai A. 2009. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci* 122(Pt 4):437-441.
- Buckingham JC. 1996. Fifteenth Gaddum Memorial Lecture December 1994. Stress and the neuroendocrine-immune axis: the pivotal role of glucocorticoids and lipocortin 1. *Br J Pharmacol* 118(1):1-19.
- Burgering BM, Coffey PJ. 1995. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* 376(6541):599-602.
- Buttgereit F. 2000. Mechanisms and clinical relevance of nongenomic glucocorticoid actions. *Z Rheumatol* 59 Suppl 2:II/119-123.
- Buttgereit F, Brand MD, Muller M. 1993. Effects of methylprednisolone on the energy metabolism of quiescent and ConA-stimulated thymocytes of the rat. *Biosci Rep* 13(1):41-52.
- Buttgereit F, Brink I, Thiele B, Burmester GR, Hiepe F, Hall ED. 1995. Effects of methylprednisolone and 21-aminosteroids on mitogen-induced interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha production in human peripheral blood mononuclear cells. *J Pharmacol Exp Ther* 275(2):850-853.

- Buttgereit F, Wehling M, Burmester GR. 1998. A new hypothesis of modular glucocorticoid actions: steroid treatment of rheumatic diseases revisited. *Arthritis Rheum* 41(5):761-767.
- Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, Link W, Leal JF. 2008. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets* 8(3):187-198.
- Chae HJ, Chae SW, Kang JS, Bang BG, Cho SB, Park RK, So HS, Kim YK, Kim HM, Kim HR. 2000. Dexamethasone suppresses tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in osteoblasts: possible role for ceramide. *Endocrinology* 141(8):2904-2913.
- Chen M, Wang J. 2002. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis* 7(4):313-319.
- Chinnaiyan AM, Dixit VM. 1996. The cell-death machine. *Curr Biol* 6(5):555-562.
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. 1995. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81(4):505-512.
- Chittenden T, Flemington C, Houghton AB, Ebb RG, Gallo GJ, Elangovan B, Chinnadurai G, Lutz RJ. 1995. A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J* 14(22):5589-5596.
- Cifone MG, Migliorati G, Parroni R, Marchetti C, Millimaggi D, Santoni A, Riccardi C. 1999. Dexamethasone-induced thymocyte apoptosis: apoptotic signal involves the sequential activation of phosphoinositide-specific phospholipase C, acidic sphingomyelinase, and caspases. *Blood* 93(7):2282-2296.
- Cotter TG. 2009. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer* 9(7):501-507.
- Cutroneo KR, Rokowski R, Counts DF. 1981. Glucocorticoids and collagen synthesis: comparison of in vivo and cell culture studies. *Coll Relat Res* 1(6):557-568.
- Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. 1999. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 13(22):2905-2927.
- Davaille J, Li L, Mallat A, Lotersztajn S. 2002. Sphingosine 1-phosphate triggers both apoptotic and survival signals for human hepatic myofibroblasts. *J Biol Chem* 277(40):37323-37330.
- de Fremery L, Reichstein, Spanhoff, Uyldert,. 1937. *NATURE* 139:26.
- de Frias M, Iglesias-Serret D, Cosialls AM, Coll-Mulet L, Santidrian AF, Gonzalez-Girones DM, de la Banda E, Pons G, Gil J. 2009. Akt inhibitors induce apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica*.
- Dean M, Hamon Y, Chimini G. 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* 42(7):1007-1017.
- Delforno C, Holt PJ, Marks R. 1978. Corticosteroid effect on epidermal cell size. *Br J Dermatol* 98(6):619-623.
- Dewson G, Kluck RM. 2009. Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis. *J Cell Sci* 122(Pt 16):2801-2808.
- Dietrich K, Schned A, Fortuny J, Heaney J, Marsit C, Kelsey KT, Karagas MR. 2009. Glucocorticoid therapy and risk of bladder cancer. *Br J Cancer* 101(8):1316-1320.
- Doll F, Pfeilschifter J, Huwiler A. 2007. Prolactin upregulates sphingosine kinase-1 expression and activity in the human breast cancer cell line MCF7 and triggers enhanced proliferation and migration. *Endocr Relat Cancer* 14(2):325-335.

- Donati C, Cencetti F, De Palma C, Rapizzi E, Brunelli S, Cossu G, Clementi E, Bruni P. 2009. TGFbeta protects mesoangioblasts from apoptosis via sphingosine kinase-1 regulation. *Cell Signal* 21(2):228-236.
- Donati C, Cencetti F, Nincheri P, Bernacchioni C, Brunelli S, Clementi E, Cossu G, Bruni P. 2007. Sphingosine 1-phosphate mediates proliferation and survival of mesoangioblasts. *Stem Cells* 25(7):1713-1719.
- Dummler B, Hemmings BA. 2007. Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease. *Biochem Soc Trans* 35(Pt 2):231-235.
- Edsall LC, Cuvillier O, Twitty S, Spiegel S, Milstien S. 2001. Sphingosine kinase expression regulates apoptosis and caspase activation in PC12 cells. *J Neurochem* 76(5):1573-1584.
- Elias PM, Brown BE. 1978. The mammalian cutaneous permeability barrier: defective barrier function is essential fatty acid deficiency correlates with abnormal intercellular lipid deposition. *Lab Invest* 39(6):574-583.
- Fabregat I, Herrera B, Fernandez M, Alvarez AM, Sanchez A, Roncero C, Ventura JJ, Valverde AM, Benito M. 2000. Epidermal growth factor impairs the cytochrome C/caspase-3 apoptotic pathway induced by transforming growth factor beta in rat fetal hepatocytes via a phosphoinositide 3-kinase-dependent pathway. *Hepatology* 32(3):528-535.
- Fayard E, Tintignac LA, Baudry A, Hemmings BA. 2005. Protein kinase B/Akt at a glance. *J Cell Sci* 118(Pt 24):5675-5678.
- Feingold KR, Man MQ, Menon GK, Cho SS, Brown BE, Elias PM. 1990. Cholesterol synthesis is required for cutaneous barrier function in mice. *J Clin Invest* 86(5):1738-1745.
- Fidler IJ. 1995. Modulation of the organ microenvironment for treatment of cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst* 87(21):1588-1592.
- Fieber CB, Eldridge J, Taha TA, Obeid LM, Muise-Helmericks RC. 2006. Modulation of total Akt kinase by increased expression of a single isoform: requirement of the sphingosine-1-phosphate receptor, Edg3/S1P3, for the VEGF-dependent expression of Akt3 in primary endothelial cells. *Exp Cell Res* 312(7):1164-1173.
- Filippa N, Sable CL, Filloux C, Hemmings B, Van Obberghen E. 1999. Mechanism of protein kinase B activation by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol* 19(7):4989-5000.
- Fink SL, Cookson BT. 2005. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun* 73(4):1907-1916.
- Fisher LB, Maibach HI. 1971. The effect of corticosteroids on human epidermal mitotic activity. *Arch Dermatol* 103(1):39-44.
- Flacke JP, Kumar S, Kostin S, Reusch HP, Ladilov Y. 2009. Acidic preconditioning protects endothelial cells against apoptosis through p38- and Akt-dependent Bcl-xL overexpression. *Apoptosis* 14(1):90-96.
- Fontana A, Galli L, Fioravanti A, Orlandi P, Galli C, Landi L, Bursi S, Allegrini G, Fontana E, Di Marsico R, Antonuzzo A, D'Arcangelo M, Danesi R, Del Tacca M, Falcone A, Bocci G. 2009. Clinical and pharmacodynamic evaluation of metronomic cyclophosphamide, celecoxib, and dexamethasone in advanced hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res* 15(15):4954-4962.
- Franke TF, Yang SI, Chan TO, Datta K, Kazlauskas A, Morrison DK, Kaplan DR, Tsichlis PN. 1995. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* 81(5):727-736.

- Frias MA, Lang U, Gerber-Wicht C, James RW. 2009. Native and reconstituted HDL protect cardiomyocytes from doxorubicin-induced apoptosis. *Cardiovasc Res*.
- Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. 1998. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem* 67:481-507.
- Fuentes-Prior P, Salvesen GS. 2004. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* 384(Pt 2):201-232.
- Fujio Y, Guo K, Mano T, Mitsuuchi Y, Testa JR, Walsh K. 1999. Cell cycle withdrawal promotes myogenic induction of Akt, a positive modulator of myocyte survival. *Mol Cell Biol* 19(7):5073-5082.
- Gellings Lowe N, Swaney JS, Moreno KM, Sabbadini RA. 2009. Sphingosine-1-phosphate and sphingosine kinase are critical for transforming growth factor-beta-stimulated collagen production by cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 82(2):303-312.
- Gilhar A, Yaniv R, Assy B, Serafimovich S, Ullmann Y, Kalish RS. 2006. Fas pulls the trigger on psoriasis. *Am J Pathol* 168(1):170-175.
- Goetzl EJ, Kong Y, Mei B. 1999. Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate protection of T cells from apoptosis in association with suppression of Bax. *J Immunol* 162(4):2049-2056.
- Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. 2006. Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1757(5-6):639-647.
- Goldkorn T, Ding T. 1997. The rise and fall of ceramide and 1,2-diacylglycerol (DAG): modulation by transforming growth factor-beta 1 (TGF beta 1) and by epidermal growth factor (EGF). *Adv Exp Med Biol* 400A:461-472.
- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. 2002. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2(1):48-58.
- Gouaze-Andersson V, Yu JY, Kreitenberg AJ, Bielawska A, Giuliano AE, Cabot MC. 2007. Ceramide and glucosylceramide upregulate expression of the multidrug resistance gene MDR1 in cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1771(12):1407-1417.
- Goulding NJ, Guyre PM. 1993. Glucocorticoids, lipocortins and the immune response. *Curr Opin Immunol* 5(1):108-113.
- Graler MH, Grosse R, Kusch A, Kremmer E, Gudermann T, Lipp M. 2003. The sphingosine 1-phosphate receptor S1P4 regulates cell shape and motility via coupling to Gi and G12/13. *J Cell Biochem* 89(3):507-519.
- Gray WM, PL. 1951. The rapidity of the adrenocorticotrophic response of the pituitary to the intravenous response to histamine, *Endocrinology*. *Endocrinology* 48:471.
- Greenspon J, Li R, Xiao L, Rao JN, Marasa BS, Strauch ED, Wang JY, Turner DJ. 2009. Sphingosine-1-phosphate protects intestinal epithelial cells from apoptosis through the Akt signaling pathway. *Dig Dis Sci* 54(3):499-510.
- Gulbins E, Li PL. 2006. Physiological and pathophysiological aspects of ceramide. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290(1):R11-26.
- Haanen C, Vermes I. 1996. Apoptosis: programmed cell death in fetal development. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 64(1):129-133.
- Hait NC, Allegood J, Maceyka M, Strub GM, Harikumar KB, Singh SK, Luo C, Marmorstein R, Kordula T, Milstien S, Spiegel S. 2009. Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. *Science* 325(5945):1254-1257.

- Hait NC, Oskeritzian CA, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S. 2006. Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. *Biochim Biophys Acta* 1758(12):2016-2026.
- Hammer S, Sauer B, Spika I, Schraut C, Kleuser B, Schafer-Korting M. 2004. Glucocorticoids mediate differential anti-apoptotic effects in human fibroblasts and keratinocytes via sphingosine-1-phosphate formation. *J Cell Biochem* 91(4):840-851.
- Hannun YA, Luberto C, Argraves KM. 2001. Enzymes of sphingolipid metabolism: from modular to integrative signaling. *Biochemistry* 40(16):4893-4903.
- Harms C, Albrecht K, Harms U, Seidel K, Hauck L, Baldinger T, Hubner D, Kronenberg G, An J, Ruscher K, Meisel A, Dirnagl U, von Harsdorf R, Endres M, Hortnagl H. 2007. Phosphatidylinositol 3-Akt-kinase-dependent phosphorylation of p21(Waf1/Cip1) as a novel mechanism of neuroprotection by glucocorticoids. *J Neurosci* 27(17):4562-4571.
- Hasala H, Zhang X, Saarelainen S, Moilanen E, Kankaanranta H. 2007. c-Jun N-terminal kinase mediates constitutive human eosinophil apoptosis. *Pulm Pharmacol Ther* 20(5):580-587.
- Hashimoto T, Igarashi J, Kosaka H. 2009. Sphingosine kinase is induced in mouse 3T3-L1 cells and promotes adipogenesis. *J Lipid Res* 50(4):602-610.
- Hassoun SM, Lancel S, Petillot P, Decoster B, Favory R, Marchetti P, Neviere R. 2006. Sphingosine impairs mitochondrial function by opening permeability transition pore. *Mitochondrion* 6(3):149-154.
- Hein R, Korting HC, Mehring T. 1994. Differential effect of medium potent nonhalogenated double-ester-type and conventional glucocorticoids on proliferation and chemotaxis of fibroblasts in vitro. *Skin Pharmacol* 7(5):300-306.
- Hench P KE, Slocumb CH, et al. 1949. The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydro-corticosterone: compound E) and of pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis. *Mayo Clin Proc* 24:181-197.
- Hengge UR, Ruzicka T, Schwartz RA, Cork MJ. 2006. Adverse effects of topical glucocorticosteroids. *J Am Acad Dermatol* 54(1):1-15; quiz 16-18.
- Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. 2005. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 4(12):988-1004.
- Herr I, Gassler N, Friess H, Buchler MW. 2007. Regulation of differential pro- and anti-apoptotic signaling by glucocorticoids. *Apoptosis* 12(2):271-291.
- Herr I, Pfitzenmaier J. 2006. Glucocorticoid use in prostate cancer and other solid tumours: implications for effectiveness of cytotoxic treatment and metastases. *Lancet Oncol* 7(5):425-430.
- Hettmannsperger U, Tenorio S, Orfanos CE, Detmar M. 1993. Corticosteroids induce proliferation but do not influence TNF- or IL-1 beta-induced ICAM-1 expression of human dermal microvascular endothelial cells in vitro. *Arch Dermatol Res* 285(6):347-351.
- Higgins CF. 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 8:67-113.
- Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, Dallaporta B, Zamzami N, Marzo I, Geuskens M, Kroemer G. 1997. The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene* 15(13):1573-1581.

- Hla T, Maciag T. 1990. An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 265(16):9308-9313.
- Hobson JP, Rosenfeldt HM, Barak LS, Olivera A, Poulton S, Caron MG, Milstien S, Spiegel S. 2001. Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. *Science* 291(5509):1800-1803.
- Hofmann LP, Ren S, Schwalm S, Pfeilschifter J, Huwiler A. 2008. Sphingosine kinase 1 and 2 regulate the capacity of mesangial cells to resist apoptotic stimuli in an opposing manner. *Biol Chem* 389(11):1399-1407.
- Holland IB, Blight MA. 1999. ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J Mol Biol* 293(2):381-399.
- Holland WL, Brozinick JT, Wang LP, Hawkins ED, Sargent KM, Liu Y, Narra K, Hoehn KL, Knotts TA, Siesky A, Nelson DH, Karathanasis SK, Fontenot GK, Birnbaum MJ, Summers SA. 2007. Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab* 5(3):167-179.
- Icyuz M, Bryant SM, Fortinberry HK, Molakandov K, Siegal GP, Contreras JL, Wu H. 2009. Adenovirus infection activates akt1 and induces cell proliferation in pancreatic islets1. *Transplantation* 87(6):821-824.
- Inagaki Y, Pham TT, Fujiwara Y, Kohno T, Osborne DA, Igarashi Y, Tigyi G, Parrill AL. 2005. Sphingosine 1-phosphate analogue recognition and selectivity at S1P4 within the endothelial differentiation gene family of receptors. *Biochem J* 389(Pt 1):187-195.
- Jaillard C, Harrison S, Stankoff B, Aigrot MS, Calver AR, Duddy G, Walsh FS, Pangalos MN, Arimura N, Kaibuchi K, Zalc B, Lubetzki C. 2005. Edg8/S1P5: an oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival. *J Neurosci* 25(6):1459-1469.
- Jeckel D, Karrenbauer A, Burger KN, van Meer G, Wieland F. 1992. Glucosylceramide is synthesized at the cytosolic surface of various Golgi subfractions. *J Cell Biol* 117(2):259-267.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ. 2006. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 56(2):106-130.
- Jiang CC, Lucas K, Avery-Kiejda KA, Wade M, deBock CE, Thorne RF, Allen J, Hersey P, Zhang XD. 2008. Up-regulation of Mcl-1 is critical for survival of human melanoma cells upon endoplasmic reticulum stress. *Cancer Res* 68(16):6708-6717.
- Jiang YJ, Uchida Y, Lu B, Kim P, Mao C, Akiyama M, Elias PM, Holleran WM, Grunfeld C, Feingold KR. 2009. Ceramide stimulates ABCA12 expression via peroxisome proliferator-activated receptor {delta} in human keratinocytes. *J Biol Chem* 284(28):18942-18952.
- Jolly PS, Bektas M, Olivera A, Gonzalez-Espinosa C, Proia RL, Rivera J, Milstien S, Spiegel S. 2004. Transactivation of sphingosine-1-phosphate receptors by FcepsilonRI triggering is required for normal mast cell degranulation and chemotaxis. *J Exp Med* 199(7):959-970.
- Kamada K, Arita N, Tsubaki T, Takubo N, Fujino T, Soga Y, Miyazaki T, Yamamoto H, Nose M. 2009. Expression of sphingosine kinase 2 in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis contributing to apoptosis by a sphingosine analogue, FTY720. *Pathol Int* 59(6):382-389.
- Kao JS, Fluhr JW, Man MQ, Fowler AJ, Hachem JP, Crumrine D, Ahn SK, Brown BE, Elias PM, Feingold KR. 2003. Short-term glucocorticoid treatment

- compromises both permeability barrier homeostasis and stratum corneum integrity: inhibition of epidermal lipid synthesis accounts for functional abnormalities. *J Invest Dermatol* 120(3):456-464.
- Kapitonov D, Allegood JC, Mitchell C, Hait NC, Almenara JA, Adams JK, Zipkin RE, Dent P, Kordula T, Milstien S, Spiegel S. 2009. Targeting sphingosine kinase 1 inhibits Akt signaling, induces apoptosis, and suppresses growth of human glioblastoma cells and xenografts. *Cancer Res* 69(17):6915-6923.
- Kartner N, Evernden-Porelle D, Bradley G, Ling V. 1985. Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies. *Nature* 316(6031):820-823.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26(4):239-257.
- Kim BM, Choi YJ, Han Y, Yun YS, Hong SH. 2009a. N,N-dimethyl phytosphingosine induces caspase-8-dependent cytochrome c release and apoptosis through ROS generation in human leukemia cells. *Toxicol Appl Pharmacol*.
- Kim DS, Kim SY, Lee JE, Kwon SB, Joo YH, Youn SW, Park KC. 2003. Sphingosine-1-phosphate-induced ERK activation protects human melanocytes from UVB-induced apoptosis. *Arch Pharm Res* 26(9):739-746.
- Kim RH, Takabe K, Milstien S, Spiegel S. 2009b. Export and functions of sphingosine-1-phosphate. *Biochim Biophys Acta* 1791(7):692-696.
- Kimura T, Watanabe T, Sato K, Kon J, Tomura H, Tamama K, Kuwabara A, Kanda T, Kobayashi I, Ohta H, Ui M, Okajima F. 2000. Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of human endothelial cells possibly through the lipid receptors, Edg-1 and Edg-3. *Biochem J* 348 Pt 1:71-76.
- Kobayashi N, Nishi T, Hirata T, Kihara A, Sano T, Igarashi Y, Yamaguchi A. 2006. Sphingosine 1-phosphate is released from the cytosol of rat platelets in a carrier-mediated manner. *J Lipid Res* 47(3):614-621.
- Kobayashi N, Yamaguchi A, Nishi T. 2009. Characterization of the ATP-dependent sphingosine 1-phosphate transporter in rat erythrocytes. *J Biol Chem* 284(32):21192-21200.
- Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, Kaufmann SH, Gores GJ. 2005. Interleukin-6 contributes to Mcl-1 up-regulation and TRAIL resistance via an Akt-signaling pathway in cholangiocarcinoma cells. *Gastroenterology* 128(7):2054-2065.
- Kohn AD, Kovacina KS, Roth RA. 1995. Insulin stimulates the kinase activity of RAC-PK, a pleckstrin homology domain containing ser/thr kinase. *EMBO J* 14(17):4288-4295.
- Kok K, Geering B, Vanhaesebroeck B. 2009. Regulation of phosphoinositide 3-kinase expression in health and disease. *Trends Biochem Sci* 34(3):115-127.
- Kolbe L, Kligman AM, Schreiner V, Stoudemayer T. 2001. Corticosteroid-induced atrophy and barrier impairment measured by non-invasive methods in human skin. *Skin Res Technol* 7(2):73-77.
- Konishi H, Matsuzaki H, Tanaka M, Takemura Y, Kuroda S, Ono Y, Kikkawa U. 1997. Activation of protein kinase B (Akt/RAC-protein kinase) by cellular stress and its association with heat shock protein Hsp27. *FEBS Lett* 410(2-3):493-498.
- Krysko DV, Vanden Berghe T, D'Herde K, Vandenabeele P. 2008. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods* 44(3):205-221.
- Kubitz R, Wettstein M, Warskulat U, Haussinger D. 1999. Regulation of the multidrug resistance protein 2 in the rat liver by lipopolysaccharide and dexamethasone. *Gastroenterology* 116(2):401-410.

- Kumar S, Allen DA, Kieswich JE, Patel NS, Harwood S, Mazzon E, Cuzzocrea S, Raftery MJ, Thiernemann C, Yaqoob MM. 2009. Dexamethasone Ameliorates Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *J Am Soc Nephrol*.
- Laane E, Tamm KP, Buentke E, Ito K, Kharaziha P, Oscarsson J, Corcoran M, Bjorklund AC, Hultenby K, Lundin J, Heyman M, Soderhall S, Mazur J, Porwit A, Pandolfi PP, Zhivotovsky B, Panaretakis T, Grandt D. 2009. Cell death induced by dexamethasone in lymphoid leukemia is mediated through initiation of autophagy. *Cell Death Differ* 16(7):1018-1029.
- Lahiri S, Futerman AH. 2007. The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. *Cell Mol Life Sci* 64(17):2270-2284.
- Landeem LK, Dederko DA, Kondo CS, Hu BS, Aroonsakool N, Haga JH, Giles WR. 2008. Mechanisms of the negative inotropic effects of sphingosine-1-phosphate on adult mouse ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294(2):H736-749.
- Lange K, Kleuser B, Gysler A, Bader M, Maia C, Scheidereit C, Korting HC, Schafer-Korting M. 2000. Cutaneous inflammation and proliferation in vitro: differential effects and mode of action of topical glucocorticoids. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 13(2):93-103.
- Laviad EL, Albee L, Pankova-Kholmyansky I, Epstein S, Park H, Merrill AH, Jr., Futerman AH. 2008. Characterization of ceramide synthase 2: tissue distribution, substrate specificity, and inhibition by sphingosine 1-phosphate. *J Biol Chem* 283(9):5677-5684.
- Le Gouill S, Podar K, Amiot M, Hideshima T, Chauhan D, Ishitsuka K, Kumar S, Raje N, Richardson PG, Harousseau JL, Anderson KC. 2004. VEGF induces Mcl-1 up-regulation and protects multiple myeloma cells against apoptosis. *Blood* 104(9):2886-2892.
- Lee JT, Jr., Steelman LS, McCubrey JA. 2004. Phosphatidylinositol 3'-kinase activation leads to multidrug resistance protein-1 expression and subsequent chemoresistance in advanced prostate cancer cells. *Cancer Res* 64(22):8397-8404.
- Lee MJ, Van Brocklyn JR, Thangada S, Liu CH, Hand AR, Menzeleev R, Spiegel S, Hla T. 1998. Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science* 279(5356):1552-1555.
- Lee YM, Venkataraman K, Hwang SI, Han DK, Hla T. 2007. A novel method to quantify sphingosine 1-phosphate by immobilized metal affinity chromatography (IMAC). *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 84(3-4):154-162.
- Lepine S, Lakatos B, Courageot MP, Le Stunff H, Sulpice JC, Giraud F. 2004. Sphingosine contributes to glucocorticoid-induced apoptosis of thymocytes independently of the mitochondrial pathway. *J Immunol* 173(6):3783-3790.
- Leroux ME, Auzenne E, Evans R, Hail N, Jr., Spohn W, Ghosh SC, Farquhar D, McDonnell T, Klostergaard J. 2007. Sphingolipids and the sphingosine kinase inhibitor, SKI II, induce BCL-2-independent apoptosis in human prostatic adenocarcinoma cells. *Prostate* 67(15):1699-1717.
- Levytskyy RM, Filyak YZ, Stoika RS. 2004. Correlation between generation of nitric oxide and cell viability in human peripheral blood mononuclear cells and leukemic Jurkat T-cell line. *Exp Oncol* 26(3):217-220.
- Li H, Telemaque S, Miller RE, Marsh JD. 2005. High glucose inhibits apoptosis induced by serum deprivation in vascular smooth muscle cells via upregulation of Bcl-2 and Bcl-xl. *Diabetes* 54(2):540-545.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94(4):491-501.

- Li QF, Wu CT, Duan HF, Sun HY, Wang H, Lu ZZ, Zhang QW, Liu HJ, Wang LS. 2007. Activation of sphingosine kinase mediates suppressive effect of interleukin-6 on human multiple myeloma cell apoptosis. *Br J Haematol* 138(5):632-639.
- Li QF, Wu CT, Guo Q, Wang H, Wang LS. 2008. Sphingosine 1-phosphate induces Mcl-1 upregulation and protects multiple myeloma cells against apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 371(1):159-162.
- Li Y, Wu H, Khardori R, Song YH, Lu YW, Geng YJ. 2009. Insulin-like growth factor-1 receptor activation prevents high glucose-induced mitochondrial dysfunction, cytochrome-c release and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 384(2):259-264.
- Linnet K, Ejning TB. 2008. A review on the impact of P-glycoprotein on the penetration of drugs into the brain. Focus on psychotropic drugs. *Eur Neuropsychopharmacol* 18(3):157-169.
- Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. 1991. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res* 51(18 Suppl):5054s-5059s.
- Liu CH, Thangada S, Lee MJ, Van Brocklyn JR, Spiegel S, Hla T. 1999. Ligand-induced trafficking of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1. *Mol Biol Cell* 10(4):1179-1190.
- Liu H, Toman RE, Goparaju SK, Maceyka M, Nava VE, Sankala H, Payne SG, Bektas M, Ishii I, Chun J, Milstien S, Spiegel S. 2003. Sphingosine kinase type 2 is a putative BH3-only protein that induces apoptosis. *J Biol Chem* 278(41):40330-40336.
- Lomonosova E, Chinnadurai G. 2008. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene* 27 Suppl 1:S2-19.
- Lucci A, Han TY, Liu YY, Giuliano AE, Cabot MC. 1999. Modification of ceramide metabolism increases cancer cell sensitivity to cytotoxics. *Int J Oncol* 15(3):541-546.
- Ly JD, Grubb DR, Lawen A. 2003. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update. *Apoptosis* 8(2):115-128.
- Maceyka M, Payne SG, Milstien S, Spiegel S. 2002. Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1585(2-3):193-201.
- Maceyka M, Sankala H, Hait NC, Le Stunff H, Liu H, Toman R, Collier C, Zhang M, Satin LS, Merrill AH, Jr., Milstien S, Spiegel S. 2005. SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. *J Biol Chem* 280(44):37118-37129.
- Mao C, Obeid LM. 2008. Ceramidases: regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate. *Biochim Biophys Acta* 1781(9):424-434.
- Mariotta M, Perewusnyk G, Koechli OR, Little JB, von Knebel Doeberitz M, Mirimanoff RO, Rutz HP. 1999. Dexamethasone-induced enhancement of resistance to ionizing radiation and chemotherapeutic agents in human tumor cells. *Strahlenther Onkol* 175(8):392-396.
- Martin P, Riley R, Back DJ, Owen A. 2008. Comparison of the induction profile for drug disposition proteins by typical nuclear receptor activators in human hepatic and intestinal cells. *Br J Pharmacol* 153(4):805-819.
- Mason HL MC, Kendall EC. 1936. The chemistry of crystalline substances isolated from the suprarenal gland. *J Biol Chem* 114:613-631.

- Mathias S, Pena LA, Kolesnick RN. 1998. Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem J* 335 (Pt 3):465-480.
- Mathieu J, Richard S, Ballester B, Chancerelle Y, Multon E. 1999. [Apoptosis and gamma rays]. *Ann Pharm Fr* 57(4):314-323.
- Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL, Cyster JG. 2004. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 427(6972):355-360.
- Mattern J, Buchler MW, Herr I. 2007. Cell cycle arrest by glucocorticoids may protect normal tissue and solid tumors from cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 6(9):1345-1354.
- Matteucci C, Minutolo A, Balestrieri E, Ascolani A, Grelli S, Macchi B, Mastino A. 2009. Effector caspase activation, in the absence of a conspicuous apoptosis induction, in mononuclear cells treated with azidothymidine. *Pharmacol Res* 59(2):125-133.
- McGill A, Frank A, Emmett N, Turnbull DM, Birch-Machin MA, Reynolds NJ. 2005. The anti-psoriatic drug anthralin accumulates in keratinocyte mitochondria, dissipates mitochondrial membrane potential, and induces apoptosis through a pathway dependent on respiratory competent mitochondria. *FASEB J* 19(8):1012-1014.
- Means CK, Brown JH. 2009. Sphingosine-1-phosphate receptor signalling in the heart. *Cardiovasc Res* 82(2):193-200.
- Means CK, Xiao CY, Li Z, Zhang T, Omens JH, Ishii I, Chun J, Brown JH. 2007. Sphingosine 1-phosphate S1P2 and S1P3 receptor-mediated Akt activation protects against in vivo myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292(6):H2944-2951.
- Meier P, Finch A, Evan G. 2000. Apoptosis in development. *Nature* 407(6805):796-801.
- Melhem A, Yamada SD, Fleming GF, Delgado B, Brickley DR, Wu W, Kocherginsky M, Conzen SD. 2009. Administration of glucocorticoids to ovarian cancer patients is associated with expression of the anti-apoptotic genes SGK1 and MKP1/DUSP1 in ovarian tissues. *Clin Cancer Res* 15(9):3196-3204.
- Menaldino DS, Bushnev A, Sun A, Liotta DC, Symolon H, Desai K, Dillehay DL, Peng Q, Wang E, Allegood J, Trotman-Pruett S, Sullards MC, Merrill AH, Jr. 2003. Sphingoid bases and de novo ceramide synthesis: enzymes involved, pharmacology and mechanisms of action. *Pharmacol Res* 47(5):373-381.
- Merino D, Giam M, Hughes PD, Siggs OM, Heger K, O'Reilly LA, Adams JM, Strasser A, Lee EF, Fairlie WD, Bouillet P. 2009. The role of BH3-only protein Bim extends beyond inhibiting Bcl-2-like prosurvival proteins. *J Cell Biol* 186(3):355-362.
- Merry WH, Caplan RH, Wickus GG, Reynertson RH, Kiskan WA, Cogbill TH, Landercasper J. 1994. Postoperative acute adrenal failure caused by transient corticotropin deficiency. *Surgery* 116(6):1095-1100.
- Meyer zu Heringdorf D, Lass H, Kuchar I, Lipinski M, Alemany R, Rumenapp U, Jakobs KH. 2001. Stimulation of intracellular sphingosine-1-phosphate production by G-protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptors. *Eur J Pharmacol* 414(2-3):145-154.
- Micheau O, Tschopp J. 2003. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114(2):181-190.
- Milara J, Mata M, Mauricio MD, Donet E, Morcillo EJ, Cortijo J. 2009. Sphingosine-1-phosphate increases human alveolar epithelial IL-8 secretion, proliferation and neutrophil chemotaxis. *Eur J Pharmacol* 609(1-3):132-139.

- Miller AL, Webb MS, Copik AJ, Wang Y, Johnson BH, Kumar R, Thompson EB. 2005. p38 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) is a key mediator in glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells: correlation between p38 MAPK activation and site-specific phosphorylation of the human glucocorticoid receptor at serine 211. *Mol Endocrinol* 19(6):1569-1583.
- Mitra P, Oskeritzian CA, Payne SG, Beaven MA, Milstien S, Spiegel S. 2006. Role of ABCC1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(44):16394-16399.
- Moutsatsou P, Papavassiliou AG. 2008. The glucocorticoid receptor signalling in breast cancer. *J Cell Mol Med* 12(1):145-163.
- Mukherjee S, Ray D, Falchi M, Bertelli A, Pini E, Das DK. 2009. Cardioprotection with the Parrodiene 2,4,6-Octatrienal and Its Potassium Salt through Activation of the Akt-Bcl-2 Survival Pathway. *J Nat Prod*.
- New DC, Wu K, Kwok AW, Wong YH. 2007. G protein-coupled receptor-induced Akt activity in cellular proliferation and apoptosis. *FEBS J* 274(23):6025-6036.
- Ng WL, Della-Fiorentina SA. 2009. The efficacy of oral ondansetron and dexamethasone for the prevention of acute chemotherapy-induced nausea and vomiting associated with moderately emetogenic chemotherapy - a retrospective audit. *Eur J Cancer Care (Engl)*.
- Ni Chonghaile T, Concannon CG, Szegezdi E, Gorman AM, Samali A. 2006. Dexamethasone inhibits apoptosis in C6 glioma cells through increased expression of Bcl-XL. *Apoptosis* 11(7):1247-1255.
- Nigam PK. 1989. Striae cutis distensae. *Int J Dermatol* 28(7):426-428.
- Nikolova-Karakashian M, Merrill AH, Jr. 2000. Ceramidases. *Methods Enzymol* 311:194-201.
- Noda T, Fujita N, Yoshimori T. 2009. The late stages of autophagy: how does the end begin? *Cell Death Differ* 16(7):984-990.
- Nofer JR, van der Giet M, Tolle M, Wolinska I, von Wnuck Lipinski K, Baba HA, Tietge UJ, Godecke A, Ishii I, Kleuser B, Schafers M, Fobker M, Zidek W, Assmann G, Chun J, Levkau B. 2004. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest* 113(4):569-581.
- Ohta H, Sweeney EA, Masamune A, Yatomi Y, Hakomori S, Igarashi Y. 1995. Induction of apoptosis by sphingosine in human leukemic HL-60 cells: a possible endogenous modulator of apoptotic DNA fragmentation occurring during phorbol ester-induced differentiation. *Cancer Res* 55(3):691-697.
- Okano J, Gaslightwala I, Birnbaum MJ, Rustgi AK, Nakagawa H. 2000. Akt/protein kinase B isoforms are differentially regulated by epidermal growth factor stimulation. *J Biol Chem* 275(40):30934-30942.
- Olivera A, Spiegel S. 1993. Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature* 365(6446):557-560.
- Oudit GY, Sun H, Kerfant BG, Crackower MA, Penninger JM, Backx PH. 2004. The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J Mol Cell Cardiol* 37(2):449-471.
- Park HS, Yun Y, Kim CS, Yang KH, Jeong M, Ahn SK, Jin YW, Nam SY. 2009. A critical role for AKT activation in protecting cells from ionizing radiation-induced apoptosis and the regulation of acinus gene expression. *Eur J Cell Biol* 88(10):563-575.
- Paugh BS, Paugh SW, Bryan L, Kapitonov D, Wilczynska KM, Gopalan SM, Rokita H, Milstien S, Spiegel S, Kordula T. 2008. EGF regulates plasminogen

- activator inhibitor-1 (PAI-1) by a pathway involving c-Src, PKCdelta, and sphingosine kinase 1 in glioblastoma cells. *FASEB J* 22(2):455-465.
- Pene F, Claessens YE, Muller O, Viguie F, Mayeux P, Dreyfus F, Lacombe C, Bouscary D. 2002. Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma. *Oncogene* 21(43):6587-6597.
- Perez-Garcia MJ, Cena V, de Pablo Y, Llovera M, Comella JX, Soler RM. 2004. Glial cell line-derived neurotrophic factor increases intracellular calcium concentration. Role of calcium/calmodulin in the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem* 279(7):6132-6142.
- Petrella A, Ercolino SF, Festa M, Gentilella A, Tosco A, Conzen SD, Parente L. 2006. Dexamethasone inhibits TRAIL-induced apoptosis of thyroid cancer cells via Bcl-xL induction. *Eur J Cancer* 42(18):3287-3293.
- Pop C, Salvesen GS. 2009. Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem* 284(33):21777-21781.
- Prigent H, Maxime V, Annane D. 2004. Science review: mechanisms of impaired adrenal function in sepsis and molecular actions of glucocorticoids. *Crit Care* 8(4):243-252.
- Qian YH, Xiao Q, Chen H, Xu J. 2009. Dexamethasone inhibits camptothecin-induced apoptosis in C6-glioma via activation of Stat5/Bcl-xL pathway. *Biochim Biophys Acta* 1793(5):764-771.
- Radeff-Huang J, Seasholtz TM, Matteo RG, Brown JH. 2004. G protein mediated signaling pathways in lysophospholipid induced cell proliferation and survival. *J Cell Biochem* 92(5):949-966.
- Raggers RJ, van Helvoort A, Evers R, van Meer G. 1999. The human multidrug resistance protein MRP1 translocates sphingolipid analogs across the plasma membrane. *J Cell Sci* 112 (Pt 3):415-422.
- Raggers RJ, Vogels I, van Meer G. 2001. Multidrug-resistance P-glycoprotein (MDR1) secretes platelet-activating factor. *Biochem J* 357(Pt 3):859-865.
- Ramljak D, Coticchia CM, Nishanian TG, Saji M, Ringel MD, Conzen SD, Dickson RB. 2003. Epidermal growth factor inhibition of c-Myc-mediated apoptosis through Akt and Erk involves Bcl-xL upregulation in mammary epithelial cells. *Exp Cell Res* 287(2):397-410.
- Ren Y, Sun C, Sun Y, Tan H, Wu Y, Cui B, Wu Z. 2009. PPAR gamma protects cardiomyocytes against oxidative stress and apoptosis via Bcl-2 upregulation. *Vascul Pharmacol* 51(2-3):169-174.
- Rhen T, Cidlowski JA. 2005. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* 353(16):1711-1723.
- Riedl SJ, Salvesen GS. 2007. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(5):405-413.
- Riedl SJ, Shi Y. 2004. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(11):897-907.
- Robertson AM, Bird CC, Waddell AW, Currie AR. 1978. Morphological aspects of glucocorticoid-induced cell death in human lymphoblastoid cells. *J Pathol* 126(3):181-187.
- Rosenfeldt HM, Hobson JP, Maceyka M, Olivera A, Nava VE, Milstien S, Spiegel S. 2001. EDG-1 links the PDGF receptor to Src and focal adhesion kinase activation leading to lamellipodia formation and cell migration. *FASEB J* 15(14):2649-2659.

- Roy B, Rai U. 2009. Genomic and non-genomic effect of cortisol on phagocytosis in freshwater teleost *Channa punctatus*: an in vitro study. *Steroids* 74(4-5):449-455.
- Ruwisch L, Schafer-Korting M, Kleuser B. 2001. An improved high-performance liquid chromatographic method for the determination of sphingosine-1-phosphate in complex biological materials. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 363(3):358-363.
- Saarni H, Hopsu-Havu VK. 1978. The decrease of hyaluronate synthesis by anti-inflammatory steroids in vitro. *Br J Dermatol* 98(4):445-449.
- Saddoughi SA, Song P, Ogretmen B. 2008. Roles of bioactive sphingolipids in cancer biology and therapeutics. *Subcell Biochem* 49:413-440.
- Saffar AS, Dragon S, Ezzati P, Shan L, Gounni AS. 2008. Phosphatidylinositol 3-kinase and p38 mitogen-activated protein kinase regulate induction of Mcl-1 and survival in glucocorticoid-treated human neutrophils. *J Allergy Clin Immunol* 121(2):492-498 e410.
- Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. 1999. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med* 107(5):489-506.
- Salomone S, Yoshimura S, Reuter U, Foley M, Thomas SS, Moskowitz MA, Waeber C. 2003. S1P3 receptors mediate the potent constriction of cerebral arteries by sphingosine-1-phosphate. *Eur J Pharmacol* 469(1-3):125-134.
- Sandhu KS, Al-Rubeai M. 2009. The effect of Bcl-2, YAMA, and XIAP over-expression on apoptosis and adenovirus production in HEK293 cell line. *Biotechnol Bioeng* 104(4):752-765.
- Sandhu KS, Chua RG, Zhang X, Kanika ND, Collins SA, Mikhail M, Melman A, Disanto ME. 2009. Regional heterogeneity in expression of the sphingosine-1-phosphate pathway in the female rat lower urinary tract. *Am J Obstet Gynecol* 200(5):576 e571-577.
- Sankala HM, Hait NC, Paugh SW, Shida D, Lepine S, Elmore LW, Dent P, Milstien S, Spiegel S. 2007. Involvement of sphingosine kinase 2 in p53-independent induction of p21 by the chemotherapeutic drug doxorubicin. *Cancer Res* 67(21):10466-10474.
- Sarkar J, Singh N, Meena S, Sinha S. 2009. Staurosporine induces apoptosis in human papillomavirus positive oral cancer cells at G2/M phase by disrupting mitochondrial membrane potential and modulation of cell cytoskeleton. *Oral Oncol*.
- Sasson R, Shinder V, Dantes A, Land A, Amsterdam A. 2003. Activation of multiple signal transduction pathways by glucocorticoids: protection of ovarian follicular cells against apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 311(4):1047-1056.
- Sato K, Malchinkhuu E, Horiuchi Y, Mogi C, Tomura H, Tosaka M, Yoshimoto Y, Kuwabara A, Okajima F. 2007. Critical role of ABCA1 transporter in sphingosine 1-phosphate release from astrocytes. *J Neurochem*.
- Sauer B, Gonska H, Manggau M, Kim DS, Schraut C, Schafer-Korting M, Kleuser B. 2005. Sphingosine 1-phosphate is involved in cytoprotective actions of calcitriol in human fibroblasts and enhances the intracellular Bcl-2/Bax rheostat. *Pharmazie* 60(4):298-304.
- Sauer L, Nunes J, Salunkhe V, Skalska L, Kohama T, Cuvillier O, Waxman J, Pchejetski D. 2009. Sphingosine kinase 1 inhibition sensitizes hormone-resistant prostate cancer to docetaxel. *Int J Cancer* 125(11):2728-2736.

- Sauna ZE, Ambudkar SV. 2000. Evidence for a requirement for ATP hydrolysis at two distinct steps during a single turnover of the catalytic cycle of human P-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(6):2515-2520.
- Scheid MP, Woodgett JR. 2003. Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt. *FEBS Lett* 546(1):108-112.
- Schmidt FR. 2005. About the nature of RNA interference. *Appl Microbiol Biotechnol* 67(4):429-435.
- Schoepe S, Schacke H, May E, Asadullah K. 2006. Glucocorticoid therapy-induced skin atrophy. *Exp Dermatol* 15(6):406-420.
- Schurer NY, Elias PM. 1991. The biochemistry and function of stratum corneum lipids. *Adv Lipid Res* 24:27-56.
- Schutze S, Tchikov V, Schneider-Brachert W. 2008. Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(8):655-662.
- Schwarze MM, Hawley RG. 1995. Prevention of myeloma cell apoptosis by ectopic bcl-2 expression or interleukin 6-mediated up-regulation of bcl-xL. *Cancer Res* 55(11):2262-2265.
- Schwenk ES, E. 1949. A preparation of 3-hydroxy-12-keto- Δ^9 , 11-cholenic acid and its lower homologues. *Arch Biochem* 14:125-129.
- Shibli-Rahhal A, Van Beek M, Schlechte JA. 2006. Cushing's syndrome. *Clin Dermatol* 24(4):260-265.
- Simpkins JW, Dykens JA. 2008. Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection. *Brain Res Rev* 57(2):421-430.
- Sionov RV, Kfir S, Zafir E, Cohen O, Zilberman Y, Yefenof E. 2006. Glucocorticoid-induced apoptosis revisited: a novel role for glucocorticoid receptor translocation to the mitochondria. *Cell Cycle* 5(10):1017-1026.
- Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. 1994. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76(6):959-962.
- Soares R, Azevedo I. 2007. Inhibition of S1P by polyphenols prevents inflammation and angiogenesis: NFkappaB, a downstream effector? *Free Radic Biol Med* 42(2):311.
- Sorensen HT, Mellekjaer L, Nielsen GL, Baron JA, Olsen JH, Karagas MR. 2004. Skin cancers and non-hodgkin lymphoma among users of systemic glucocorticoids: a population-based cohort study. *J Natl Cancer Inst* 96(9):709-711.
- Spiegel S, Milstien S. 2000. Sphingosine-1-phosphate: signaling inside and out. *FEBS Lett* 476(1-2):55-57.
- Spiegel S, Milstien S. 2002. Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *J Biol Chem* 277(29):25851-25854.
- Stambolic V, Woodgett JR. 2006. Functional distinctions of protein kinase B/Akt isoforms defined by their influence on cell migration. *Trends Cell Biol* 16(9):461-466.
- Stanger BZ, Leder P, Lee TH, Kim E, Seed B. 1995. RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell* 81(4):513-523.
- Sternfeld T, Tischleder A, Schuster M, Bogner JR. 2009. Mitochondrial membrane potential and apoptosis of blood mononuclear cells in untreated HIV-1 infected patients. *HIV Med*.
- Stoffel W, Assmann G. 1970. Metabolism of sphingosine bases. XV. Enzymatic degradation of 4t-sphingenine 1-phosphate (sphingosine 1-phosphate) to 2t-

- hexadecen-1-al and ethanolamine phosphate. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 351(8):1041-1049.
- Strasser A. 2005. The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* 5(3):189-200.
- Sugimoto N, Takuwa N, Okamoto H, Sakurada S, Takuwa Y. 2003. Inhibitory and stimulatory regulation of Rac and cell motility by the G12/13-Rho and Gi pathways integrated downstream of a single G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor isoform. *Mol Cell Biol* 23(5):1534-1545.
- Sukocheva OA, Wang L, Albanese N, Pitson SM, Vadas MA, Xia P. 2003. Sphingosine kinase transmits estrogen signaling in human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 17(10):2002-2012.
- Sun Y, Peng ZL. 2009. Programmed cell death and cancer. *Postgrad Med J* 85(1001):134-140.
- Szymczyk KH, Kerr BA, Freeman TA, Adams CS, Steinbeck MJ. 2006. Involvement of hydrogen peroxide in the differentiation and apoptosis of preosteoclastic cells exposed to arsenite. *Biochem Pharmacol* 72(6):761-769.
- Taha TA, Hannun YA, Obeid LM. 2006. Sphingosine kinase: biochemical and cellular regulation and role in disease. *J Biochem Mol Biol* 39(2):113-131.
- Takabe K, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S. 2008. "Inside-out" signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. *Pharmacol Rev* 60(2):181-195.
- Tan SY, Xiao L, Pi X, Holoshitz J. 2007. Aberrant Gi protein coupled receptor-mediated cell survival signaling in rheumatoid arthritis B cell lines. *Front Biosci* 12:1651-1660.
- Tesaro M, Thompson WC, Moss J. 2006. Effect of staurosporine-induced apoptosis on endothelial nitric oxide synthase in transfected COS-7 cells and primary endothelial cells. *Cell Death Differ* 13(4):597-606.
- Theilmeyer G, Schmidt C, Herrmann J, Keul P, Schafers M, Herrgott I, Mersmann J, Larmann J, Hermann S, Stypmann J, Schober O, Hildebrand R, Schulz R, Heusch G, Haude M, von Wnuck Lipinski K, Herzog C, Schmitz M, Erbel R, Chun J, Levkau B. 2006. High-density lipoproteins and their constituent, sphingosine-1-phosphate, directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury in vivo via the S1P3 lysophospholipid receptor. *Circulation* 114(13):1403-1409.
- Thomadaki H, Scorilas A. 2006. BCL2 family of apoptosis-related genes: functions and clinical implications in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 43(1):1-67.
- Thomas WD, Zhang XD, Franco AV, Nguyen T, Hersey P. 2000. TNF-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of melanoma is associated with changes in mitochondrial membrane potential and perinuclear clustering of mitochondria. *J Immunol* 165(10):5612-5620.
- Thompson BT. 2003. Glucocorticoids and acute lung injury. *Crit Care Med* 31(4 Suppl):S253-257.
- Tissing WJ, Meijerink JP, den Boer ML, Pieters R. 2003. Molecular determinants of glucocorticoid sensitivity and resistance in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 17(1):17-25.
- Uen YH, Ko PH, Yin PH, Liu TY, Chi CW, Lui WY. 2008. Glucocorticoid protects hepatoma cells against metabolic stress-induced cell death. *Int J Oncol* 33(6):1263-1270.
- Uhlenbrock K, Gassenhuber H, Kostenis E. 2002. Sphingosine 1-phosphate is a ligand of the human gpr3, gpr6 and gpr12 family of constitutively active G protein-coupled receptors. *Cell Signal* 14(11):941-953.

- Umeda J, Sano S, Kogawa K, Motoyama N, Yoshikawa K, Itami S, Kondoh G, Watanabe T, Takeda J. 2003. In vivo cooperation between Bcl-xL and the phosphoinositide 3-kinase-Akt signaling pathway for the protection of epidermal keratinocytes from apoptosis. *FASEB J* 17(6):610-620.
- Utainsincharoen P, Tangthawornchaikul N, Ubol S, Chaisuriya P, Sirisinha S. 2000. TNF-alpha induces caspase 3 (CPP 32) dependent apoptosis in human cholangiocarcinoma cell line. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 31 Suppl 1:167-170.
- Van Brocklyn JR, Graler MH, Bernhardt G, Hobson JP, Lipp M, Spiegel S. 2000. Sphingosine-1-phosphate is a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-6. *Blood* 95(8):2624-2629.
- van der Laan S, Meijer OC. 2008. Pharmacology of glucocorticoids: beyond receptors. *Eur J Pharmacol* 585(2-3):483-491.
- van Helvoort A, Smith AJ, Sprong H, Fritzsche I, Schinkel AH, Borst P, van Meer G. 1996. MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell* 87(3):507-517.
- Van Limbergen J, Stevens C, Nimmo ER, Wilson DC, Satsangi J. 2009. Autophagy: from basic science to clinical application. *Mucosal Immunol* 2(4):315-330.
- van Meer G, Lisman Q. 2002. Sphingolipid transport: rafts and translocators. *J Biol Chem* 277(29):25855-25858.
- Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ, Waterfield MD. 2001. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* 70:535-602.
- Villa L, Ballabio CB, Sala G. 1958. [Clinical & metabolic effect of 16 alpha-methyl-9 alpha-fluoroprednisolone or dexamethasone.]. *Reumatismo* 10(3):127-133.
- von Wedel-Parlow M, Wolte P, Galla HJ. 2009. Regulation of major efflux transporters under inflammatory conditions at the blood-brain barrier in vitro. *J Neurochem* 111(1):111-118.
- Wach F, Bosserhoff A, Kurzydym U, Nowok K, Landthaler M, Hein R. 1998. Effects of mometasone furoate on human keratinocytes and fibroblasts in vitro. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 11(1):43-51.
- Wandel E, Grasshoff A, Mittag M, Hausteiner UF, Saalbach A. 2000. Fibroblasts surrounding melanoma express elevated levels of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in vitro. *Exp Dermatol* 9(1):34-41.
- Wandel E, Raschke A, Hildebrandt G, Eberle J, Dummer R, Anderegg U, Saalbach A. 2002. Fibroblasts enhance the invasive capacity of melanoma cells in vitro. *Arch Dermatol Res* 293(12):601-608.
- Wang H, Wang Y, Rayburn ER, Hill DL, Rinehart JJ, Zhang R. 2007. Dexamethasone as a chemosensitizer for breast cancer chemotherapy: potentiation of the antitumor activity of adriamycin, modulation of cytokine expression, and pharmacokinetics. *Int J Oncol* 30(4):947-953.
- Wang W, Graeler MH, Goetzl EJ. 2005. Type 4 sphingosine 1-phosphate G protein-coupled receptor (S1P4) transduces S1P effects on T cell proliferation and cytokine secretion without signaling migration. *FASEB J* 19(12):1731-1733.
- Wang X. 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15(22):2922-2933.
- Wang ZB, Zhang Y, Liu YQ, Guo Y, Xu H, Dong B, Cui YF. 2006. Bcl-xL overexpression restricts gamma-radiation-induced apoptosis. *Cell Biol Int* 30(1):15-20.

- Wendler CC, Rivkees SA. 2006. Sphingosine-1-phosphate inhibits cell migration and endothelial to mesenchymal cell transformation during cardiac development. *Dev Biol* 291(2):264-277.
- Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. 1997. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 139(5):1281-1292.
- Wymann MP, Pirola L. 1998. Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta* 1436(1-2):127-150.
- Wymann MP, Zvelebil M, Laffargue M. 2003. Phosphoinositide 3-kinase signalling-- which way to target? *Trends Pharmacol Sci* 24(7):366-376.
- Wysocki AB. 1999. Skin anatomy, physiology, and pathophysiology. *Nurs Clin North Am* 34(4):777-797, v.
- Xilouri M, Papazafiri P. 2008. Induction of Akt by endogenous neurosteroids and calcium sequestration in P19 derived neurons. *Neurotox Res* 13(3-4):209-219.
- Xu R, Jin J, Hu W, Sun W, Bielawski J, Szulc Z, Taha T, Obeid LM, Mao C. 2006. Golgi alkaline ceramidase regulates cell proliferation and survival by controlling levels of sphingosine and S1P. *FASEB J* 20(11):1813-1825.
- Yamamoto M, Fukuda K, Miura N, Suzuki R, Kido T, Komatsu Y. 1998. Inhibition by dexamethasone of transforming growth factor beta1-induced apoptosis in rat hepatoma cells: a possible association with Bcl-xL induction. *Hepatology* 27(4):959-966.
- Yang L, Xiao L, Ma X, Tang M, Weng X, Chen X, Sun L, Cao Y. 2009. Effect of DNazymes targeting Akt1 on cell proliferation and apoptosis in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Biol Ther* 8(4):366-371.
- Young KW, Bootman MD, Channing DR, Lipp P, Maycox PR, Meakin J, Challiss RA, Nahorski SR. 2000. Lysophosphatidic acid-induced Ca²⁺ mobilization requires intracellular sphingosine 1-phosphate production. Potential involvement of endogenous EDG-4 receptors. *J Biol Chem* 275(49):38532-38539.
- Yu J, Eto M, Akishita M, Okabe T, Ouchi Y. 2009. A selective estrogen receptor modulator inhibits TNF-alpha-induced apoptosis by activating ERK1/2 signaling pathway in vascular endothelial cells. *Vascul Pharmacol* 51(1):21-28.
- Yune TY, Park HG, Lee JY, Oh TH. 2008. Estrogen-induced Bcl-2 expression after spinal cord injury is mediated through phosphoinositide-3-kinase/Akt-dependent CREB activation. *J Neurotrauma* 25(9):1121-1131.
- Zeidan YH, Hannun YA. 2009. The Acid Sphingomyelinase/Ceramide Pathway: Biomedical Significance and Mechanisms of Regulation. *Curr Mol Med*.
- Zendegui JG, Inman WH, Carpenter G. 1988. Modulation of the mitogenic response of an epidermal growth factor-dependent keratinocyte cell line by dexamethasone, insulin, and transforming growth factor-beta. *J Cell Physiol* 136(2):257-265.
- Zender L, Hutker S, Mundt B, Waltemathe M, Klein C, Trautwein C, Malek NP, Manns MP, Kuhnel F, Kubicka S. 2005. NFkappaB-mediated upregulation of bcl-xl restrains TRAIL-mediated apoptosis in murine viral hepatitis. *Hepatology* 41(2):280-288.
- Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. 1996. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87(4):619-628.
- Zhang H, Desai NN, Olivera A, Seki T, Brooker G, Spiegel S. 1991. Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. *J Cell Biol* 114(1):155-167.

- Zhang J, Yang J, Liu Y. 2008. Role of Bcl-xL Induction in HGF-mediated Renal Epithelial Cell Survival after Oxidant Stress. *Int J Clin Exp Pathol* 1(3):242-253.
- Zhu Q, Shan X, Miao H, Lu Y, Xu J, You N, Liu C, Liao DF, Jin J. 2009. Acute activation of acid ceramidase affects cytokine-induced cytotoxicity in rat islet beta-cells. *FEBS Lett* 583(12):2136-2141.