

**UNTERSUCHUNGEN ZU SPHINGOSIN-1-PHOSPHAT
BEI DER EPITHELIALEN-MESENCHYMALEN
TRANSFORMATION IN HUMANEN KERATINOZYTEN**

DISSERTATION

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

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

vorgelegt von
Corinna Schraut
aus Mönchengladbach

Januar 2007

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

Datum der Disputation: 18.04.2007

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von

Herrn Professor Dr. Burkhard Kleuser

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

Für meine Eltern

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

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Professor Dr. Monika Schäfer-Korting für ihre Unterstützung, ihre stets ermunternde Art sowie die Erstellung des Zweitgutachtens bedanken.

Besonders herzlich danke ich Frau Dr. Bettina Sauer für die intensive Einarbeitung und wissenschaftliche Betreuung im molekularbiologischen Bereich sowie ihre ständige Diskussionsbereitschaft und Anteilnahme an der Arbeit.

Herrn Professor Dr. Melzig, Institut für Pharmazeutische Biologie, danke ich für die Bereitstellung des Fluoreszenzmikroskops.

Herrn Dr. Mehnert, Institut für pharmazeutische Technologie und Frau Peggy Schlupp danke ich für die Beratung und tatkräftigen Hilfe bei der Herstellung und Charakterisierung von festen Lipidnanopartikeln.

Herrn Dr. Lars Ruwisch danke ich ganz herzlich für die Einarbeitung und Hilfsbereitschaft bei der HPLC-Analytik.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Frau Hannelore Gonska für die Einarbeitung und Hilfe bei der Zellkultur sowie das stets offene Ohr für alle Sorgen bedanken.

Herrn Matthias Worch und Frau Barbara Brüggener danke ich für die Hilfe bei den immer wieder anfallenden Computerproblemen.

Herrn Dr. Eule, Herrn Dr. Jung, Herrn Dr. Knoblauch, Herrn Dr. Schildknecht sowie dem Ärzteteam des St. Joseph-Krankenhauses danke ich für das Gewebematerial, das sie dem Arbeitskreis zur Verfügung stellten.

Ganz herzlich danke ich dem gesamten Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Kleuser und Frau Prof. Schäfer-Korting für den guten Zusammenhalt, das angenehme Klima und die gemeinsamen Aktivitäten. Für die besonders enge Laborgemeinschaft, produktive Zusammenarbeit und die Unterstützung in der ganzen Zeit möchte ich mich vor allem bei Herrn Dr. Henrik von Wenckstern, Herrn Karsten Zimmermann, Frau Pilar Rivera Gil und Frau Dr. Daniela Malek sowie Frau Dr. Sylvia Schreiber bedanken. Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Simone Lombardi Borgia für seine ständige Gesprächsbereitschaft und die Hilfe bei der Fluoreszenzmikroskopie. Auch bei Frau Melanie Schüppel, Frau Anja Richartz, Frau Judith Seeber und Herrn Ulrich Kürschner möchte ich mich für den Austausch und die netten Unternehmungen bedanken.

Frau Dr. Stefanie Hammer und Herrn Dr. Uwe Münster danke ich ganz herzlich für Unterstützung, Anregung und Beistand während der ganzen Zeit. Ihnen sowie Herrn Karsten Zimmermann und Frau Peggy Schlupp danke ich für die kritische und konstruktive Durchsicht der Arbeit. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn Wilhelm Dolle für die beständige Zusprache und Motivation.

Einen besonderen Dank möchte ich meinen Eltern aussprechen für den Rückhalt, die Ermutigung und die zuverlässige Unterstützung in allen Höhen und Tiefen dieser Arbeit.

Originalarbeiten

S. Hammer, B. Sauer, I. Spika, C. Schraut, B. Kleuser and M. Schäfer-Korting: Glucocorticoids mediate differential antiapoptotic effects in human fibroblasts and keratinocytes via sphingosine 1-phosphate formation. *J Cell Biochem* 91 (4): 840-51, 2004

B. Sauer, H. Gonska, M. Manggau, D. S. Kim, C. Schraut, M. Schäfer-Korting and B. Kleuser: 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, 2005

Poster

H.H. Radeke, H. von Wenckstern, K. Stoidtner, C. Schraut and B. Kleuser: Sphingosine 1-phosphate induces chemotaxis of murine dendritic cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (Suppl 1)* 367, 2003

C. Schraut, S. Hammer, B. Sauer, M. Schäfer-Korting and B. Kleuser: Cytoprotective actions of glucocorticoids in epidermal and dermal cells are mediated via sphingosine 1-phosphate. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (Suppl 1)* 369, 2004

B. Sauer, H. von Wenckstern, C. Schraut and B. Kleuser: Dependence of Smad-signalling in sphingosine 1-phosphate mediated biological responses of fibroblasts. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (Suppl 1)* 369, 2004

P. Rivera Gil, C. Schraut, C. D. Keller and B. Kleuser: Sphingosine 1-phosphate as a mediator of the fibrotic response. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (Suppl 1)* 371, 2005

A. Richartz, C. Schraut, S. Hammer, B. Kleuser, O. Liesenfeld and M. Schäfer-Korting: Anti-apoptotic effects of glucocorticoids are cell-type specific. DPhG-Jahrestagung Mainz, 2005

C. Schraut, B. Sauer and B. Kleuser: Transforming Growth Factor- β and sphingosine 1-phosphate induce epithelial-to-mesenchymal transformation in human primary keratinocytes in a Smad- and ERK-dependent manner. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (Suppl 1) 372, 2006

1	Einleitung	1
1.1	Epitheliale-Mesenchymale Transformation	2
1.1.1	Bedeutung der epithelialen-mesenchymalen Transformation	2
1.1.2	Prozess der EMT	4
1.1.3	Verlust von Zell-Zell-Kontakten	4
1.1.4	Umstrukturierung des Zytoskeletts	7
1.1.5	Migration über die Extrazellulärmatrix	8
1.1.6	Matrixdegradierende Gelatinasen	9
1.2	Der Transformierende Wachstumsfaktor-β	12
1.2.1	Smads	14
1.2.2	Alternative Signalwege	17
1.2.3	TGF- β und Tumorentwicklung	18
1.2.4	TGF- β -induzierte EMT und beteiligte Signalwege	19
1.3	Lysophospholipide	20
1.3.1	Sphingosin-1-Phosphat	20
1.3.2	Lysophospholipid-Rezeptoren	22
1.3.3	S1P als Rezeptoragonist	25
1.3.4	S1P als intrazellulärer Botenstoff	26
1.3.5	S1P und Tumorentwicklung	27
1.3.6	S1P-Crosstalk	28
1.3.7	S1P-Rezeptoragonisten/-antagonisten	30
1.4	Fragestellung und Zielsetzung	32
2	Material und Methoden	33
2.1	Geräte	34
2.2	Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	35
2.3	Nährmedien und Lösungen	38
2.3.1	Zellkultur-Medien	38
2.3.2	Lösungen zur Zellkultivierung	39
2.3.3	Oligonukleotide	40
2.3.4	Lösungen für Zellyse und Proteinbestimmung	41
2.3.5	Lösungen für Western Blot-Analyse und Zymographie	41
2.3.6	Lösungen für die Elektrophorese von Agarose-Gelen	43

2.3.7	Lösungen für die Fluoreszenzmikroskopie	44
2.3.8	Lösungen für die HPLC	44
2.3.9	Lösungen der Testsubstanzen	44
2.4	Methoden	45
2.4.1	Gewinnung und Kultivierung humaner epidermaler und dermaler Zellen...	45
2.4.2	Ausschaltung des Smad-Wegs	47
2.4.3	Analyse der mRNA-Transkription	49
2.4.4	Proteindetektion mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot-Analytik und Zymographie	51
2.4.5	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung	54
2.4.6	Untersuchungen topischer S1P-Zubereitungen.....	54
2.4.7	Statistik.....	56
3	Ergebnisse	57
3.1	Einfluss von TGF-β und S1P auf die EMT in humanen Keratinozyten	58
3.1.1	Wirkung von TGF- β auf den Phänotyp humaner Keratinozyten	58
3.1.2	Analoge Wirkung von S1P auf den Phänotyp humaner Keratinozyten.....	59
3.1.3	Veränderung des Zytoskeletts durch TGF- β und S1P	60
3.1.4	Modulation von E-Cadherin durch TGF- β und S1P	61
3.1.5	Auswirkungen von TGF- β und S1P auf die Bildung von α -SMA.....	64
3.1.6	Einfluss von TGF- β und S1P auf Fibronectin	67
3.1.7	Regulation von Pro-MMP-2 und Pro-MMP-9 durch TGF- β und LPL	68
3.1.8	Beteiligung G _i -gekoppelter Rezeptoren an der S1P-induzierten EMT	73
3.1.9	Effekte von SEW2871 und FTY720 auf die Keratinozyten	75
3.1.10	Interaktion von S1P und TGF- β bei Induktion der EMT	77
3.1.11	Rezeptorinteraktionen bei der Pro-MMP-9 Expression	79
3.1.12	Interaktion von S1P und TGF- β bei der Pro-MMP-2-Regulation	80
3.1.13	Interaktion von LPA und TGF- β bei der Pro-MMP-2-Regulation	82
3.1.14	Beteiligung G _i -gekoppelter Rezeptoren an der Pro-MMP-2-Hemmung	82
3.1.15	Relevanz des Smad-Signalwegs bei Modulation der EMT-Parameter	83
3.1.16	Bedeutung des MAPK-Signalwegs bei der Transformation in Keratinozyten.....	85
3.2	Einfluss von LPL auf humane dermale Fibroblasten.....	87
3.2.1	Einfluss von LPL auf die Bildung von PAI-1	87

3.2.2	Wirkungsverstärkung von S1P durch Kombination mit TGF- β	88
3.2.3	Beteiligung G _i -gekoppelter Rezeptoren an der PAI-1-Bildung.....	89
3.2.4	Bedeutung des Smad-Signalwegs an der Induktion von PAI-1	90
3.2.5	Einfluss von S1P auf die Synthese von Pro-MMP-2.....	92
3.3	Untersuchungen zu S1P-Topika	93
3.3.1	Herstellung von S1P-haltigen halbfesten Zubereitungen	93
3.3.2	Physikalische Charakterisierung der S1P-haltigen SLN.....	95
3.3.3	Gehaltsbestimmung der S1P-haltigen SLN.....	96
4	Diskussion	98
4.1	EMT in humanen primären Keratinozyten	99
4.1.1	Bedeutung der TGF- β -induzierten EMT in humanen primären Keratinozyten	99
4.1.2	Charakterisierung der EMT	100
4.1.3	Bedeutung der S1P-induzierten EMT in humanen Keratinozyten	101
4.1.4	Einfluss von TGF- β und S1P auf die EMT-Marker	102
4.1.5	Bedeutung von MMP-2 und MMP-9	104
4.1.6	Beteiligung der S1P-Rezeptoren an der EMT durch S1P.....	106
4.1.7	Einfluss von FTY720 auf Keratinozyten	107
4.1.8	Bedeutung des Smad- und des MAPK-Signalwegs für die EMT	109
4.1.9	Bewertung der transformatorischen Wirkung von S1P.....	113
4.2	Bedeutung der Wirkung von LPL auf dermale Fibroblasten.....	114
4.3	Topische Arzneiformen mit S1P	117
4.4	Ausblick.....	119
5	Zusammenfassung	121
6	Literaturverzeichnis	128

ALK	Aktivinrezeptor-ähnliche Kinase (activin receptor-like kinase)
α -SMA	α -Glattmuskelaktin (α -smooth muscle actin)
AP-1	aktivierendes Protein-1
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
ATP	Adenosintriphosphat
bHLH	Basis Helix-Loop-Helix Protein
BMP	bone morphogenetic protein
bp	Basenpaare
BPE	Rinderhypophysenextrakt (bovine pituary extract)
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CdK	zyklinabhängige Kinase (cyclin-dependent kinase)
Cox	Cyclooxygenase
Cy3	Carbocyanin 3
σ EF1	σ -Cristallin-Enhancer bindender Faktor 1
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMBA	Dimethylbenzanthracen
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMS	N,N-Dimethyl-Sphingosin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E-Cadherin	epitheliales Cadherin
ECM	Extrazellulärmatrix
Edg	endotheliales Differenzierungsgen
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N,N-tetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
EMEM	Eagle`s Minimal Essential Medium
EMT	epitheliale-mesenchymale Transformation
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ERK	extrazellulär regulierte Kinase (extracellular signal-regulated kinase)
ER	Endoplasmatisches Retikulum

FAK	fokale Adhäsionskinase
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (fibroblast growth factor)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
FTY720-P	FTY720-Phosphat
<i>g</i>	relative Zentrifugalbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor (G-protein coupled receptor)
h	Stunde
HGF	hepatozytischer Wachstumsfaktor (hepatocyte growth factor)
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
ID	inhibitorische Proteine der Differenzierung
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (Insuline-like growth factor)
IGFBP	IGF-Bindungsprotein
IHC	immunohistochemisch
IκB	Inhibitor des nuklearen Faktors κB
IL-1β	Interleukin-1β
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
JNK	c-Jun N-terminale Kinase (c-jun N-terminal kinase)
KBM	Keratinocyten-Basalmedium
KGF	Keratinocyten-Wachstumsfaktor
KGM	Keratinocyten-Wachstumsmedium
LD	Laserdiffraktometrie
LPA	Lysophosphatidsäure (lysophosphatidic acid)
LPL	Lysophospholipide
MAD	mother against decapentaplegic
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	MAPK-Effektor-Kinase
MET	mesenchymale-epitheliale Transformation
min	Minute
MMP	Matrixmetalloproteinase

mP	mittlere Partikelgröße
MT-MMP	membranständige Matrixmetalloproteinase (membrane-type matrix metalloproteinase)
N-Cadherin	neuronales Cadherin
NGF	Nervenwachstumsfaktor (nerve growth factor)
OD	optische Dichte
NF-κB	nuklearer Faktor κB
ODN	Oligodesoxynukleotid
PA	Plasminogenaktivator
PAI-1	Plasminogenaktivator-Inhibitor-1
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate-buffered saline)
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDGF	thrombozytärer Wachstumsfaktor (platelet derived growth factor)
PDGFR	thrombozytärer Wachstumsfaktorrezeptor
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PI	Polydispersitätsindex
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbolmyristatacetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Phosphatidylserin
PTX	Pertussistoxin
PVDF	Polyvinyliden-difluorid
RGD	Arginin-Glycin-Asparagin-Sequenz
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	kleine interferierende RNA (small interfering RNA)

SLN	feste Lipidnanopartikel (solid lipid nanoparticles)
Smase	Sphingomyelinase
SIP1	Smad interagierendes Protein 1 (Smad interacting protein 1)
SphK	Sphingosinkinase
TAK	TGF- β -aktivierte Kinase
T β RI	TGF- β -Rezeptor Typ I
T β RII	TGF- β -Rezeptor Typ II
TBST	Tween in Tris-gepufferter Kochsalzlösung (tris buffered saline)
Temed	N,N,N,N-Tetramethyldiamin
TGF- β	transformierender Wachstumsfaktor- β (transforming growth factor- β)
TGF- β -LAP	TGF- β -latent assoziiertes Protein
TIMP	Gewebshemmer der Matrixmetalloproteinasen (tissue inhibitors of matrix metalloproteinases)
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
tPA	gewebsspezifischer Plasminogenaktivator (tissue-type plasminogen activator)
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
u	Einheiten (units)
U/min	Umdrehungen pro Minute
uPA	Plasminogenaktivator vom Urokinase-Typ (urokinase-type plasminogen activator)
VE-Cadherin	vaskuläres endotheliales Cadherin
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VSMC	glatte Gefäßmuskelzellen
ZO-1	Zona occludens Protein-1

Anmerkung: Das Fehlen von ® oder ™ berechtigt nicht zu der Annahme, dass der verwendete Begriff oder Eigennamen frei von Schutzrechten Dritter ist.