

## **1 EINLEITUNG**

---

## 1.1 Epitheliale-Mesenchymale Transformation

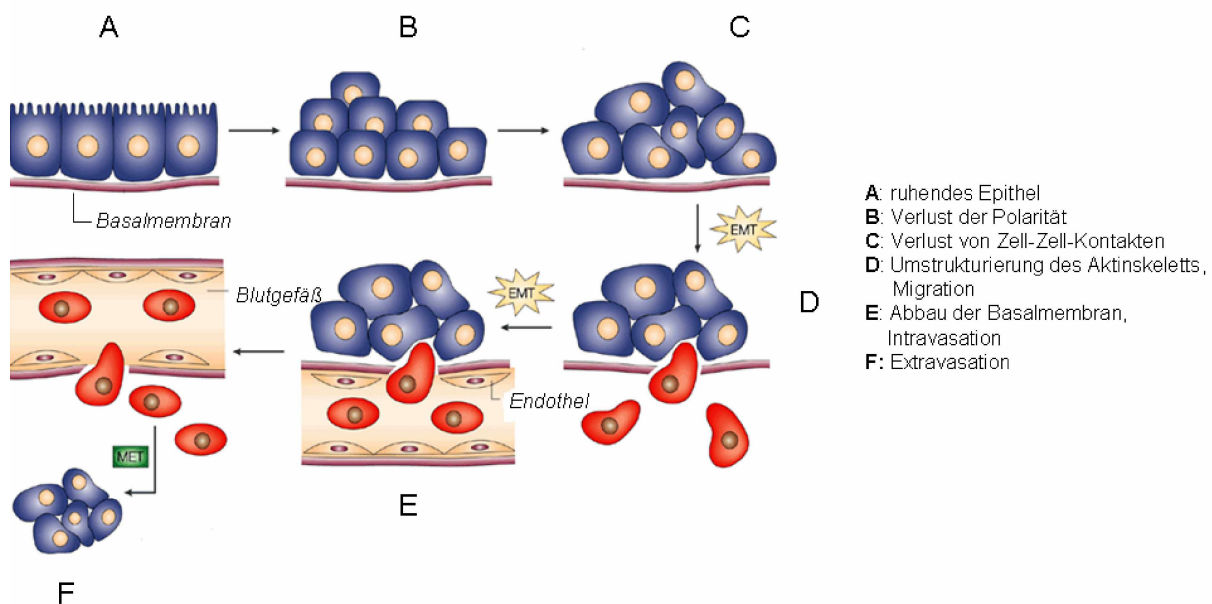
### 1.1.1 Bedeutung der epithelialen-mesenchymalen Transformation

Als epitheliale-mesenchymale Transformation (EMT) wird der Prozess bezeichnet, bei dem sich ruhende Epithelzellen aus ihrem Zell-Zell-Verband lösen und eine mesenchymale Form annehmen. Sie sind zur Migration über die Basalmembran befähigt, können über Blutbahn oder Lymphe in ein entferntes Gewebe gelangen und dort nach Rücktransformation in Epithelzellen (mesenchymale-epitheliale Transformation, MET) neue Strukturen aufbauen (Abb. 1). Physiologisch spielt dieser Prozess während der Wundheilung und der embryonalen Entwicklung eine bedeutende Rolle. So ist die EMT für die Bildung des Herzens, der meisten kraniofazialen Strukturen sowie des Skelettmuskel- und des peripheren Nervensystems fundamental (Thiery, 2002). Andererseits findet man den Prozess im pathophysiologischen Kontext. EMT fördert das Fortschreiten einer Krebserkrankung, da den entarteten Epithelzellen die Invasion in Gefäße und damit die Metastasierung ermöglicht wird. Auch an fibrotischen Prozessen können Epithelzellen nach Durchlaufen der EMT beteiligt sein, eine überschießende Produktion von Proteinen der Extrazellulärmatrix (ECM) durch die fibroblastoiden Zellen kann dann zum Funktionsausfall des Gewebes führen (Kalluri and Neilson, 2003; Thiery, 2002).

Obwohl schon Ende des 19. Jahrhunderts epitheliale und mesenchymale Zellen als hauptsächliche Zelltypen erkannt und auch ein Übergang zwischen beiden Formen bereits 1908 beschrieben wurde (Lillie, 1908), wurde die EMT als Prozess an sich erst 1982 zum ersten Mal benannt (Greenburg and Hay, 1982). Bald darauf entdeckte man, dass sich Epithelzellen durch Inkubation mit dem Medium kultivierter Fibroblasten vereinzeln und in migrierende Mesenchymzellen konvertieren ließen (Stoker and Perryman, 1985). Der dafür als zuständig erkannte Faktor wurde zunächst als *Scatter Factor* bezeichnet und später als hepatozytischer Wachstumsfaktor (HGF) identifiziert (Naldini et al., 1991; Stoker et al., 1987). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass HGF die EMT über Aktivierung des Tyrosinkinase-

Rezeptors c-Met fördert (Weidner et al., 1993). Auch andere Wachstumsfaktoren wie der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor (IGF) und der epitheliale Wachstumsfaktor (EGF) tragen über die Stimulation von Tyrosinkinase-Rezeptoren zur Induktion der EMT *in vivo* und *in vitro* bei (Ahmed et al., 2006; Morali et al., 2000; Valles et al., 1990). Eine große Bedeutung kommt dem transformierenden Wachstumsfaktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) zu, der sowohl während der embryonalen Entwicklung als auch bei der Tumorprogression eine Schlüsselrolle bezüglich Induktion und Promotion der EMT einnimmt (Thiery, 2002; Zavadil and Bottinger, 2005); oft führt auch ein Synergismus zwischen den Faktoren zu einer verstärkten EMT.

Die Charakterisierung der auslösenden Faktoren sowie der beteiligten Signalwege an der EMT ist von großer Bedeutung, da der Transformationsprozess einen wichtigen Angriffspunkt bei der Arzneimittelentwicklung gegen Fibrosen und invasive Tumore darstellt. Denkbar ist dabei, Signalwege zu hemmen, die neben der EMT auch Faktoren wie die Angiogenese beeinflussen, da diese ebenfalls an Fibrose- und Krebsentstehung beteiligt sind.



**Abb. 1:** Schematische Darstellung der EMT (nach Thiery, 2002)

### 1.1.2 Prozess der EMT

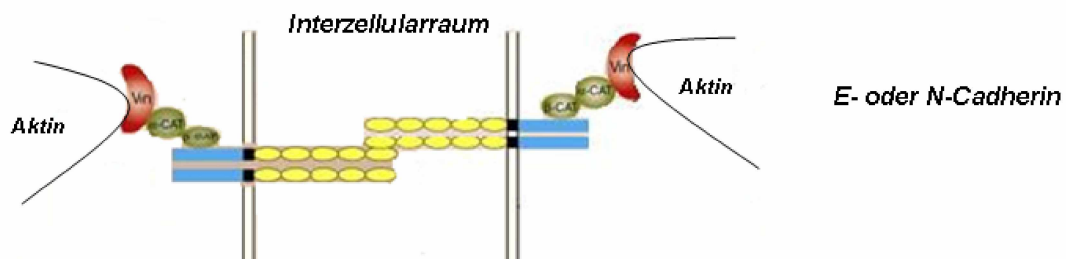
Während der EMT verlieren die Epithelzellen ihre apicobasale Polarität und erlangen einen Fibroblasten-ähnlichen Phänotyp. Durch den Verlust von Zell-Zell-Kontakten lösen sie sich aus dem festen Zellverband des organisierten Epithels. Nach Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts sind die Zellen nun in der Lage, über die ECM zu migrieren. Die Migration wird dadurch gefördert, dass die Zellen in diesem Stadium charakteristische mesenchymale Proteine exprimieren, die sie zur Knüpfung von Zell-Matrix-Bindungen befähigen. Daneben sezernieren sie auch matrixdegradierende Proteasen, die die Basalmembran abbauen und so die Invasion der transformierten Zellen in transportierende Gefäße wie Blutbahn oder Lymphe ermöglichen (Zavadil and Bottinger, 2005). Diese einzelnen Schritte der EMT werden nun im Folgenden näher beschrieben.

### 1.1.3 Verlust von Zell-Zell-Kontakten

Zell-Zell-Kontakte dienen der Aufrechterhaltung des Zellverbands, der Barrierefunktion und der Kommunikation zwischen den Zellen.

*Tight Junctions* limitieren durch ihre Barrierefunktion den parazellulären Transport, dichten die Zelle ab und polarisieren sie durch ihre Anordnung im apikalen Bereich. Gebildet werden die *Tight Junctions* durch transmembranäre Occludine und Claudine, diese sind über intrazelluläre Proteine, wie z. B. das Zona occludens Protein-1 (ZO-1) mit dem Aktingerüst verbunden (Zavadil and Bottinger, 2005).

*Adherens Junctions* stellen homodimere Zell-Zell-Kontakte dar, die auf der extrazellulären Seite über klassische Cadherine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig miteinander verknüpft sind. Die einfach transmembranären Cadherine sind auf der intrazellulären Seite wiederum über  $\beta$ -Catenin,  $\alpha$ -Catenin und Vinculin oder Plakoglobin an das Aktin-Zytoskelett gebunden (Abb. 2). Zu den bekanntesten klassischen Cadherinen zählen das epitheliale Cadherin (E-Cadherin) und das neuronale Cadherin (N-Cadherin) (Angst et al., 2001).



**Abb. 2.:** Struktur der klassischen Cadherine (Vin: Vinculin;  $\alpha$ -Cat:  $\alpha$ -Catenin;  $\beta$ -Cat:  $\beta$ -Catenin) (nach Angst et al., 2001)

Desmosome verteilen Spannungs- und Scherkräfte und dienen damit hauptsächlich der Gewebestabilität. Auch sie sind über transmembranäre desmosomale Cadherine (Desmocolline und Desmogleine) miteinander verbunden und über die zytoplasmatischen Bindungspartner Plakoglobin und Desmoplakin mit Keratinfasern verknüpft (Angst et al., 2001; Zavadil and Bottinger, 2005).

Desmosome und *Adherens Junctions* (auch Gürteldesmosome genannt, da sie gürtelförmig unter den *Tight Junctions* angeordnet sind) zählen aufgrund ihrer verankernden Funktion zu den *Anchoring Junctions*, *Tight Junctions* dagegen zu den *Occluding Junctions*.

Kennzeichen der EMT ist die Auflösung dieser Zell-Zell-Verknüpfungen durch Reduktion der entsprechenden Kontaktproteine. Diese eignen sich daher gut, um den Transformationsstatus der Epithelzelle zu charakterisieren. Als EMT-Marker werden beispielsweise häufig ZO-1,  $\beta$ -Catenin, Zytokeratin und E-Cadherin gewählt. E-Cadherin nimmt als das prototypische Cadherin in Epithelzellen sowohl in der embryonalen Entwicklung als auch in der Tumorprogression eine Schlüsselrolle ein. Die verminderte Expression und/oder Funktion von E-Cadherin wurde während der Tumorprogression vieler Karzinome beobachtet und in Beziehung zur Induktion der EMT gebracht, die ein wesentliches Merkmal der Karzinominvasion darstellt (Peinado et al., 2004; Thiery, 2002). Aufgrund der guten Korrelation der E-Cadherin-Reduktion zur EMT wird E-Cadherin daher sehr häufig zur Charakterisierung gewählt (Kondo et al., 2004; Nawrocki-Raby et al., 2003b; Oft et al., 2002).

Die Auflösung von *Adherens Junctions* kann sowohl über die Umverteilung des E-Cadherins von der Zellmembran ins Zytoplasma als auch durch genetische Regulation zustande kommen. Dabei hängt die Regulation der Genexpression vom Zelltyp und vom zellulären Kontext ab.

Die Zinkfingerproteine Snail und Slug hemmen die Transkription des E-Cadherins über Bindung an die E-Box des E-Cadherin-Promotors (Batlle et al., 2000; Bolos et al., 2003). Für TGF- $\beta$  wurde eine Aktivierung von Snail und Slug über Smad3 (s. u.) beschrieben (Zavadil et al., 2004), und auch FGF und HGF beeinflussen über eine Aktivierung von Slug die Zell-Zell-Bindungen (Savagner et al., 1997). Weiterhin scheint Slug, aber nicht Snail, eine Rolle bei der EMT-assoziierten Wundheilung zu spielen (Savagner et al., 2005), dies steht im Einklang mit der unterschiedlichen Expression dieser Gene bei der TGF- $\beta$ -induzierten EMT in der humanen, spontan immortalisierten nicht-tumorigenen Keratinozyten-Zelllinie HaCaT und der humanen Nierenepithelzelllinie HK-2. Während TGF- $\beta$  in den HaCaTs die Slug-, aber nicht Snail-Synthese induziert, wird in den renalen Epithelzellen Snail, aber nicht Slug hochreguliert (Zavadil et al., 2004).

Weitere Faktoren, die die E-Cadherin-Expression beeinflussen können, sind die Proteine  $\sigma$ EF1 ( $\sigma$ -Cristallin-Enhancer bindender Faktor 1), das Smad-interagierende Protein 1 (SIP1) und c-Fos, das als Heterodimer einen Transkriptionsfaktor bildet. SIP1 und  $\sigma$ EF1 können sowohl die Transkription der Smad-Proteine steuern (Postigo et al., 2003), als auch in Analogie zu Snail und Slug direkt mit dem E-Cadherin-Promoter interagieren und durch die Repression von E-Cadherin einen invasiven Phänotyp hervorrufen (Comijn et al., 2001; Eger et al., 2005). In Brustepithelzellen führt die ektopische Expression von c-Fos zur Transformation (Reichmann et al., 1992). Bei kurzzeitiger c-Fos-Aktivierung ist der Polaritätsverlust reversibel, die EMT kann dann aber über eine autokrine TGF- $\beta$ -Produktion aufrechterhalten werden (Eger et al., 2004; Reichmann et al., 1992). Auch in HaCaTs stimuliert TGF- $\beta$  zu Beginn des EMT-Prozesses über die extrazellulär regulierte Kinase (ERK) schnell und transient c-Fos (Zavadil et al., 2001).

Ebenfalls an die Promoterregion von E-Cadherin bindet das Basis Helix-Loop-Helix Protein (bHLH) E2A. Im Normalzustand ist E2A transkriptionell inaktiv, da es mit inhibitorischen Proteinen der Differenzierung (ID) dimerisiert vorliegt (Benezra et al., 1990). In Mikroarrays von Epithelzellen erwiesen sich ID2 und ID3 als Zielstrukturen von TGF- $\beta$  und BMP7 (bone morphogenetic protein 7). TGF- $\beta$  hemmt die Expression von ID2, dadurch wird E2A aktiviert und unterdrückt die Transkription des E-Cadherin-Gens. BMP7 verhält sich hierzu antagonistisch: es erhöht die Expression von ID2 und schützt damit die Epithelzelle vor der Transformation (Kondo et al., 2004; Kowanetz et al., 2004; Zeisberg et al., 2003).

Ein weiterer, kürzlich als wichtiger Regulator der EMT *in vitro* und *in vivo* identifizierter Faktor ist der bHLH Transkriptionsfaktor Twist. Die ektopische Expression von Twist verursacht in der caninen Nierenepithelzelllinie MDCK die Transkriptionshemmung von E-Cadherin,  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin sowie die Induktion der mesenchymalen Marker Fibronectin, Vimentin,  $\alpha$ -Glattmuskelaktin ( $\alpha$ -SMA) und N-Cadherin (Yang et al., 2004).

Auch die übrigen Transkriptionsfaktoren beeinflussen außer der Regulation der *Adherens Junctions* weitere EMT-Charakteristika, so hemmt beispielsweise ID2 in der murinen Brustepithelzelllinie NMuMG die Synthese von  $\alpha$ -SMA (Valcourt et al., 2005). In humanen Brustepithelzellen reguliert SIP1 die Expression von Vimentin (Bindels et al., 2006), und sowohl SIP1 als auch Snail erhöhen in der squamösen Karzinomzelllinie SCC die Expression der Matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2, s. u.) (Taki et al., 2006). Snail beeinflusst auch in Melanomzellen eine Reihe EMT-relevanter Gene, darunter die des MMP-2 und des kleinen G-Proteins RhoA (Kuphal et al., 2005).

### 1.1.4 Umstrukturierung des Zytoskeletts

Polarisierte Epithelzellen sind durch kortikale Aktinfasern, so genannte Aktingürtel, gekennzeichnet. An diese sind intrazelluläre Bestandteile der *Adherens Junctions* und *Tight Junctions* verankert, so dass dem peripheren Aktin eine große Bedeutung bei der Unterstützung von Zell-Zell-Kontakten zukommt. In mesenchymalen Zellen liegt das Aktin dagegen in Form von Filopodien, Lamellopodien und Aktin-Stressfasern vor, die die Migration der Zelle unterstützen. Filopodien stellen dichte Aktinbündel auf der reizzugewandten Seite dar, die zylinderförmig zur Bewegungsrichtung hin ausgerichtet sind. Lamellopodien befinden sich ebenfalls am vorderen Ende der Zelle, es handelt sich um dünne, blattartige Netzwerke, die die Vorwärtsbewegung der Zelle initiieren und der Zellmembran ein charakteristisches Erscheinungsbild geben. Stressfasern bestehen aus Bündeln kurzer Aktinfilamente mit eingelagerten Myosinfilamenten, sie durchspannen parallel zu den Längsseiten den Zellkörper und bewegen durch Kontraktion den Zellkörper vorwärts (Mitchison and Cramer, 1996). Aktin-Stressfasern sind mit der Innenseite der Plasmamembran über Integrine und den so genannten fokalen Adhäsionskomplex verbunden, der

neben Strukturproteinen wie Talin, Vinculin und  $\alpha$ -Aktinin einige Proteinkinasen einschließlich der fokalen Adhäsionskinase (FAK) enthält (Burrige et al., 1988). Die Aktin-Polymerisation wird über die kleinen G-Proteine der Rho-Familie reguliert, zu denen Rho, Rac und Cdc42 gehören. So kommt es durch Aktivierung von Rho zur Bildung der Aktin-Stressfasern und des fokalen Adhäsionskomplexes. Die Formierung der Lamellopodien ist Rac-vermittelt, während bei der Bildung der Filopodien Cdc42 beteiligt ist (Nobes and Hall, 1995). Die kleinen G-Proteine der Rho-Familie und ihre regulierenden Faktoren stellen damit wichtige Zielstrukturen für TGF- $\beta$  bei Induktion der EMT dar.

$\alpha$ -SMA ist eine Aktin-Isoform, die die Zelle bei der Aufrechterhaltung der mechanischen Spannung unterstützt.  $\alpha$ -SMA wird zwar hauptsächlich in glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert, kommt aber auch in einigen anderen Zellen, hauptsächlich den Myofibroblasten vor. Diese Zellen, die eine Sonderstellung zwischen normalen Fibroblasten und Gefäßmuskelzellen einnehmen, werden durch  $\alpha$ -SMA zu starker Kontraktion befähigt. Sie spielen eine wichtige Rolle während der Wundheilung, bei der sie durch Zusammenziehen des Granulationsgewebes den Wundverschluss ermöglichen (Majno et al., 1971). Eine überschießende Myofibroblastenaktivität kann dagegen Narbenbildung und Fibrosen zur Folge haben. Auch epitheliale Zellen exprimieren während der EMT  $\alpha$ -SMA (Oft et al., 2002; Rhyu et al., 2005), so dass es als Charakteristikum für die Transformation herangezogen werden kann.

### 1.1.5 Migration über die Extrazellulärmatrix

Die Migration über die ECM wird durch die Knüpfung neuer Kontakte zwischen Proteinen der ECM und Integrinen der Zelle unterstützt. Integrine sind Heterodimere, die aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit bestehen, dabei stellen 15 der 23 verschiedenen Heterodimere Rezeptoren für Matrixproteine dar (Ruoslahti, 1991). Diese werden von den Integrinen anhand ihrer „RGD-Sequenz“ (Arg-Gly-Asp) erkannt (Ruoslahti, 1996). Die transmembranären Integrine haben neben der rein mechanischen Bindung auch noch die Funktion der Signaltransduktion. So kann eine Aktivierung des zyttoplasmatischen Integrin-Endes durch intrazelluläre Kinasen zu einem veränderten extrazellulärem Ligandenbindungsverhalten führen (*inside-out*-

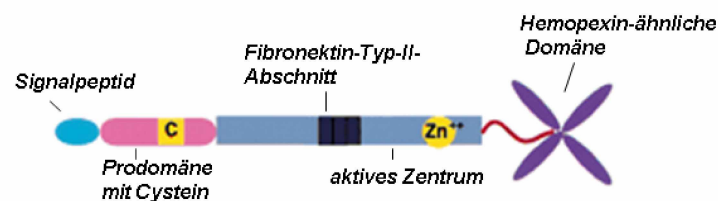


*signalling*). Andererseits können die Integrine durch die extrazelluläre Bindung des Liganden aktiviert werden, was intrazellulär beispielsweise eine Aktivierung der FAK und der kleinen G-Proteine RhoA, Cdc42 und Rac bewirkt (*outside-in-signalling*) (O'Toole et al., 1994; Steffensen et al., 2001). Für epitheliale Ovarialkrebszelllinien sind es die  $\beta$ 1-Integrine  $\alpha$ 3 $\beta$ 1,  $\alpha$ 6 $\beta$ 1 und  $\alpha$ 5 $\beta$ 1, die über Interaktionen mit Kollagen, Laminin und Fibronectin Proliferation, Adhäsion und Migration vermitteln (Ahmed et al., 2005). Während der EMT kann durch Wachstumsfaktoren nicht nur das Expressionsmuster der verschiedenen Integrine verändert werden (Maschler et al., 2005), die transformierten Zellen synthetisieren jetzt auch ECM-Proteine wie Kollagen, Fibronectin, Vitronectin und Vimentin (Nawshad et al., 2005; O'Toole, 2001; Zavadil and Bottinger, 2005) und übernehmen damit ein weiteres Charakteristikum mesenchymaler Zellen. Die eigentliche Migration ist ein Wechselspiel zwischen Kontraktion sowie der Knüpfung bzw. Auflösung von Bindungen zwischen Integrinen und ECM-Proteinen. Dabei bewegen sich zunächst die Lamellopodien in Richtung des Stimulus und heften sich fest, durch nachfolgende Kontraktion des restlichen Zellkörpers sowie Reduktion der Zell-Matrix-Interaktion am anderen Zellende kommt es zur gerichteten Migration (Lauffenburger and Horwitz, 1996; O'Toole, 2001).

### 1.1.6 Matrixdegradierende Gelatinasen

Epithelzellen sind nicht nur untereinander fest verbunden, sondern auch über Hemidesmosome mit der Basallamina verankert. Diese ist Teil der ECM, hauptsächlich zusammengesetzt aus Kollagen IV, Laminin und Nidogen. Während der EMT lösen sich die Epithelzellen von der Basallamina ab und sezernieren matrixabbauende Enzyme. Hierbei kommt den Matrixmetalloproteinasen (MMPs) MMP-2 und MMP-9 eine große Bedeutung zu, da sie unter anderem das Kollagen IV degradieren, so dass sich die Zellen den Weg durch die Basallamina bahnen können (Zavadil and Bottinger, 2005). In die kontinuierlich wachsende Gruppe der MMPs werden derzeit 28 Mitglieder eingeordnet (Steffensen et al., 2001). Allen MMPs ist ein Zink-Ion im aktiven Zentrum gemeinsam. Sie werden als inaktive Vorstufen (Pro-MMPs) sezerniert und durch enzymatische Abspaltung der Prodomäne aktiviert. Die Prodomäne nahezu aller MMPs weist eine konservierte Sequenz mit Cystein auf,

das das Zink im katalytischen Zentrum bindet und damit inaktiviert. Die Abspaltung des Propeptids wird daher als „Cystein-Switch“ bezeichnet. Im katalytischen Zentrum aller MMPs findet sich weiterhin ein Zink-bindendes Motiv HEXXHXXGXXH. Ihrer Substratspezifität nach unterteilt man die MMPs in Subgruppen. So zeichnen sich MMP-2 und MMP-9 durch eine Kollagen-bindende Domäne aus, die sich aus drei Fibronectin-Typ-II-ähnlichen Abschnitten zusammensetzt und die beiden Enzyme zur Bindung und zum Abbau von nativem und denaturiertem Kollagen befähigt; sie werden daher auch Gelatinase A und B genannt (Abb. 3). Als weitere Gemeinsamkeit weisen die MMPs ein Signalpeptid zur Sekretion auf, und fast alle MMPs sind durch eine Hemopexin-ähnliche Region gekennzeichnet, über die Interaktionen mit Substrat oder Inhibitor vermittelt werden (Chakraborti et al., 2003; Lemaitre and D'Armiento, 2006). Die Aktivierung der MMPs kann sowohl chemisch als auch enzymatisch durch verschiedene Proteasen erfolgen, hervorzuheben sind hier Plasmin und die Plasminogenaktivatoren vom Urokinase- bzw. Gewebe-Typ (uPA bzw. tPA) (Mignatti and Rifkin, 1993); auch kann die proteolytische Aktivierung durch andere MMPs reguliert werden. So wird Pro-MMP-2 durch die membran-gebundenen MMPs (MT-MMPs) in seine aktive Form gespalten, gefolgt und vervollständigt durch Autoaktivierung (Chakraborti et al., 2003). Gehemmt wird die Aktivität der MMPs durch ihre spezifischen Inhibitoren, die so genannten Gewebsinhibitoren der Metalloproteinasen (TIMP-1, -2, -3, -4); eine verminderte TIMP-Aktivität kann daher zu Gewebeschäden führen und die Tumordinvasion begünstigen (Brew et al., 2000; Stetler-Stevenson et al., 1993). Darüber hinaus haben die TIMPs aber auch weitere wichtige biologische Funktionen. So erfolgt beispielsweise die Aktivierung von Pro-MMP-2 über einen mit der Zelloberfläche assoziierten Komplex aus MT1-MMP, TIMP-2 und Pro-MMP-2 (Steffensen et al., 2001). Die Umstrukturierung der ECM wird so über die Interaktionen und das Gleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs moduliert.



**Abb. 3:** Struktur der Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 (nach Vu and Werb, 2000)

Die Sekretion von MMP-2 und MMP-9 ist bei der Metastasierung häufig gesteigert, um den Zellen die Loslösung vom primären Tumor und die Intravasation in die transportierenden Gefäße wie Lymphe und Blutbahn zu erleichtern (Curran and Murray, 1999). Außerdem kommt es nach der Extravasation zu einer Umstrukturierung des neuen Gewebes durch die MMPs. Dabei degradiert MMP-2 die Kollagene Typ I, IV, V, VII, X, Fibrillin, Elastin, Fibronectin, Laminin und aktiviert weitere Matrixmetalloproteinasen einschließlich Pro-MMP-9. Die Substrate von MMP-9 sind die Kollagene Typ I, III, IV, V, XI, Elastin, Fibrillin, Entactin und Aggrecan (Steffensen et al., 2001). MMPs bauen aber nicht nur Bestandteile der ECM ab, sie können auch biologisch aktive Moleküle aktivieren. Beispielsweise spaltet MMP-9 Angiostatin aus Plasminogen (Pozzi et al., 2000), MMP-2 kann durch Spaltung von Decorin Decorin-gebundenes TGF- $\beta$  freisetzen (Imai et al., 1997) sowie durch Spaltung des IGF-bindenden Proteins (IGFBP) die Bioverfügbarkeit von IGF erhöhen (Fowlkes et al., 1994). Der Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )-Vorläufer wird durch beide Gelatinasen in seine aktive Form umgesetzt (Schonbeck et al., 1998), und sowohl MMP-2 als auch MMP-9 setzen TGF- $\beta$  durch Abspaltung seines latent assoziierten Peptids (TGF- $\beta$ -LAP) frei (Yu and Stamenkovic, 2000). Die Tumorprogression infolge der EMT ist bei einer Reihe von Krebsarten durch eine erhöhte MMP-Sekretion gekennzeichnet, hierbei stehen die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 im Vordergrund (Tester et al., 2000; Yokoyama et al., 2003). Reguliert werden die MMPs auf Transkriptionsebene über Hormone, Wachstumsfaktoren, Zytokine sowie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen. Eine Reihe von MMPs, inklusive MMP-9, nicht aber MMP-2, weisen auf ihren Genen eine Bindungsseite für den Transkriptionsfaktor AP-1 (aktivierendes Protein-1) auf, über den beispielsweise Onkogene und Phorbolster die Expression der MMPs erhöhen. Dexamethason dagegen bindet das aktivierende Protein Jun, das einen Teil des Heterodimers AP-1 darstellt und unterdrückt somit die Expression der entsprechenden MMPs; übermäßige Gewebeschäden werden so durch Glucocorticoide eingeschränkt (Chakraborti et al., 2003). Auch der Transkriptionsfaktor Snail aktiviert bei der EMT die MMP-2- und MMP-9-Gene, dies geschieht allerdings indirekt über Aktivierung des Transkriptionsfaktors Ets-1 (Jorda et al., 2005; Taki et al., 2006). Beide Gelatinasen weisen in der Promoterregion ein Smad-bindendes Element auf (Greene et al., 2003) und es konnte gezeigt werden, dass in Nierenepithelzellen die MMP-2-Induktion durch TGF- $\beta$  Smad2-abhängig ist (Phanish et al., 2006). Interessanterweise besteht

zwischen E-Cadherin und MMPs nicht nur eine inverse Beziehung, E-Cadherin und MMPs haben auch einen wechselseitigen Einfluss aufeinander. So bauen MMP-3 und MMP-7 extrazellulär E-Cadherin zu einem löslichen Fragment ab (Davies et al., 2001; Noe et al., 2001). Während das vollständige 120 kDa-E-Cadherin die Expression bzw. Aktivität von MMP-9, MMP-2 und MT1-MMP senkt (Ara et al., 2000; Liu et al., 2006; Nawrocki-Raby et al., 2003b), erhöht dagegen das lösliche 80 kDa-E-Cadherin-Fragment die Expression von MMP-2 und MMP-9 und steigert dadurch die Invasivität der Zellen (Nawrocki-Raby et al., 2003a). MMP-9 wiederum baut E-Cadherin zwar nicht ab, schwächt aber durch Delokalisierung des Cadherins von den Verknüpfungspunkten die Zell-Zell-Kontakte und fördert damit die Migration (Sanceau et al., 2003). Weiterhin kann der Abbau des E-Cadherins durch MMP-Inhibitoren gehemmt werden (Mei et al., 2002).

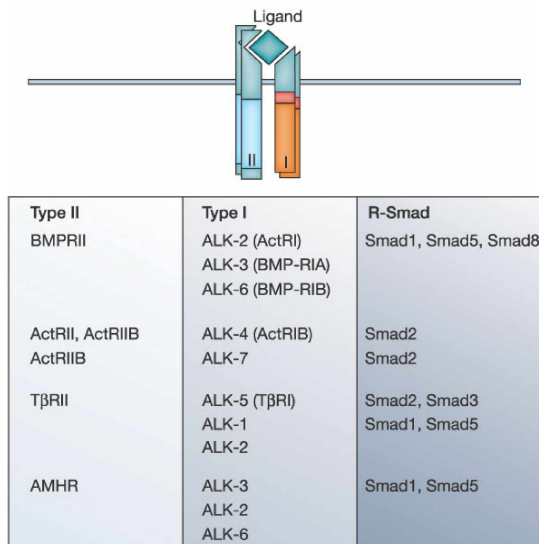
### **1.2 Der Transformierende Wachstumsfaktor- $\beta$**

TGF- $\beta$  gehört zu einer großen Familie strukturverwandter Zytokine. Diese Familie umfasst derzeit 42 Proteine, einschließlich Aktivine und BMPs, die eine Vielzahl biologischer Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose und EMT steuern (Roberts and Sporn, 1993; Shi and Massague, 2003). Obwohl die Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie untereinander hoch konserviert sind (Kingsley, 1994), unterscheiden sich die Phänotypen der Tiere mit defizienten TGF- $\beta$ -Isoformen TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 oder TGF- $\beta$ 3 erheblich. So sind TGF- $\beta$ 1-Null-Mäuse durch stark gestörte Immunfunktionen gekennzeichnet, die kurz nach der Geburt durch Organversagen zum Tod der Tiere führen (Shull et al., 1992). TGF- $\beta$ 2-Knockout-Mäuse weisen schwere Entwicklungsstörungen auf und versterben schon in der Perinatalphase (Sanford et al., 1997), während TGF- $\beta$ 3-defiziente Mäuse durch eine Gaumenspalte und eine Fehlentwicklung der Lunge gekennzeichnet sind (Kaartinen et al., 1995). Dies spricht dafür, dass die Liganden Isoform-spezifische Eigenschaften aufweisen, die nicht durch andere Familienmitglieder ersetzt werden können. Mitglieder der TGF- $\beta$ -Familie haben entscheidende Rollen bei der Entwicklung und der Aufrechterhaltung der Gewebs-Homöostase; eine gestörte Signaltransduktion wird mit Fehlentwicklungen und einer Reihe von Erkrankungen

einschließlich Krebs, Fibrose und Autoimmundefekten in Verbindung gebracht (Blobe et al., 2000).

Die Mitglieder der TGF- $\beta$ -Familie vermitteln ihre Wirkungen über die einfach transmembranären Serin-Threonin-Kinase-Rezeptoren Typ I und Typ II. Diese Rezeptoren liegen im unstimulierten Zustand als Homodimere vor. Bei Bindung eines Liganden kommt es zur Bildung eines Funktionskomplexes bestehend aus zwei Typ I- und zwei Typ II-Rezeptoren (Derynck and Feng, 1997). Darauf folgt die Aktivierung des Typ I-Rezeptors, indem der Typ II-Rezeptor ihn an seiner Gly-Ser-reichen Domäne phosphoryliert. Der Ligand bindet dabei entweder an den Typ II-Rezeptor (z. B. TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3 und die Aktivine) oder an den Typ I-Rezeptor (z. B. BMP-2 und BMP-4), auch bekannt als Aktivinrezeptor-ähnliche Kinase (ALK) (Derynck and Feng, 1997). In Säugetieren wurden bislang fünf Typ II- und sieben Typ I-Rezeptoren identifiziert (Abb. 4). Der TGF- $\beta$ -spezifische Typ II-Rezeptor T $\beta$ RII interagiert dabei klassischerweise mit dem Typ I-Rezeptor T $\beta$ RI/ALK5, kann aber auch mit den Typ I-Rezeptoren ALK1 oder ALK2 komplexieren. In Endothelzellen wird durch TGF- $\beta$  entweder ALK5 oder ALK1 aktiviert, diese beiden Rezeptoren vermitteln hier gegenteilige Effekte. So führt die Stimulation von ALK5 zu einer verstärkten Differenzierung des Endothels, während über ALK1 Proliferation und Migration des Endothels gefördert werden. Das Verhältnis zwischen der Rezeptoraktivitäten ist also ausschlaggebend dafür, ob sich das Endothel in einem ruhenden oder aktivierten Zustand befindet (Goumans et al., 2002). Bei Induktion der EMT durch TGF- $\beta$  scheint der Typ I-Rezeptor ALK2 eine Rolle zu spielen, so konnte seine Beteiligung an der Transformation in verschiedenen Zellen gezeigt werden (Lai et al., 2000; Miettinen et al., 1994).

Weitere Proteine verstärken die Zellantwort auf TGF- $\beta$ , so erhöhen Endoglin oder Betaglykan (TGF- $\beta$  Typ III-Rezeptor) die Bindung von TGF- $\beta$  an den T $\beta$ RI-T $\beta$ RII-Komplex (Feng and Derynck, 2005). Während Betaglykan die Bindung von TGF- $\beta$ 2 an T $\beta$ RII entscheidend verstärkt (Lopez-Casillas et al., 1993), wird Endoglin in Endothelzellen zur effizienten TGF- $\beta$ -Zellantwort über ALK1 benötigt (Lebrin et al., 2004).

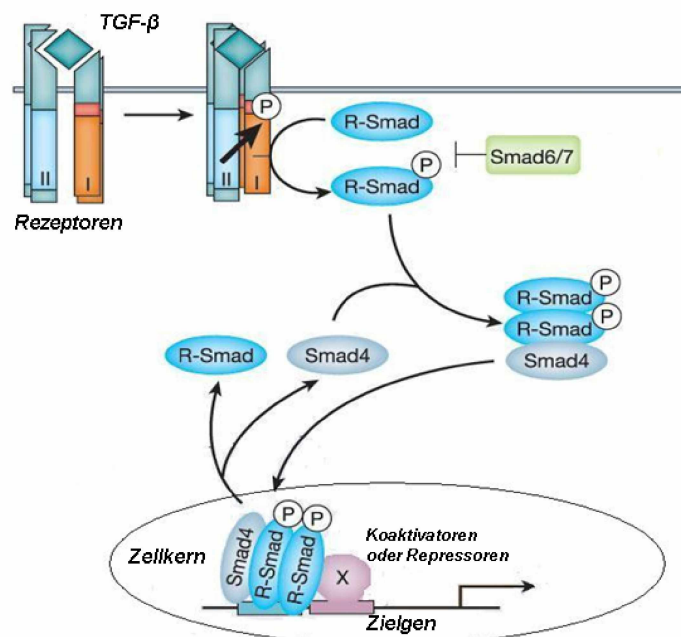


**Abb. 4:**  
Kombinationen der Typ I- und Typ II-  
Rezeptoren und die beteiligten R-Smads  
(nach Derynck and Zhang, 2003)

### 1.2.1 Smads

TGF- $\beta$  vermittelt eine Vielzahl seiner Effekte über intrazelluläre Signalproteine, so genannte Smads. Der Name „Smad“ leitet sich von den kodierenden Genen ab, die in *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* erstmals identifiziert wurden. Smad ist dabei die Kombination aus dem als *Mad* (Mother against decapentaplegic) bezeichneten *Drosophila*-Gen und dem als *Sma* (Small body size) bezeichneten *C. elegans*-Gen. Die bisher acht bekannten Smad-Proteine werden strukturell und funktionell eingeteilt in Rezeptor-aktivierte-Smad-Proteine (R-Smads), die durch den aktivierten Typ I-Rezeptor phosphoryliert werden, kooperative Smad-Proteine (Co-Smads), die mit den aktivierten R-Smads komplexieren und inhibitorische Smad-Proteine (I-Smads) (Itoh et al., 2000). TGF- $\beta$  aktiviert hauptsächlich die R-Smads Smad2 und Smad3, während die R-Smads Smad1, Smad5 und Smad8 Zielstrukturen für BMP darstellen. Allerdings kann auch TGF- $\beta$  über den Typ I-Rezeptor ALK1 Smad1 und Smad5 aktivieren (Derynck and Zhang, 2003; Goumans et al., 2002). Als Co-Smad wurde bislang in humanen Zellen nur Smad4 nachgewiesen (Wrana and Attisano, 2000). Smad6 und Smad7 gehören in die Gruppe der I-Smads; während Smad6 eher BMP-vermittelte Effekte antagonisiert, hemmt Smad7 vorzugsweise die Wirkungen von TGF- $\beta$  (Hanyu et al., 2001; Itoh et al., 2001).

Nach Bildung des TGF- $\beta$ -Rezeptorkomplexes wird dieser über Clathrin- oder Caveolin-abhängige Wege internalisiert; in den so gebildeten Zellkompartimenten kommt es dann zur Phosphorylierung nachgeschalteter Zielstrukturen, beispielsweise der R-Smads, durch T $\beta$ RI (Di Guglielmo et al., 2003). Die aktivierten R-Smads bilden einen Komplex mit Smad4, der in den Kern wandert und dort die Transkription beeinflusst (Abb. 5). Sowohl heterotrimere Komplexe, bestehend aus zwei R-Smads und einem Smad4, als auch Heterodimere wurden gefunden. Die meisten TGF- $\beta$ -Effekte werden über Smad3-Smad4 vermittelt, während Aktivin vorzugsweise über einen Komplex aus Smad2 und Smad4 agiert (Chacko et al., 2001; Wu et al., 2001). Die I-Smads können sowohl mit den R-Smads um die Rezeptorbindung konkurrieren als auch Wechselwirkungen zwischen R-Smad und Co-Smad blockieren und so die Reaktion auf die Wachstumsfaktoren limitieren (Nakao et al., 1997).

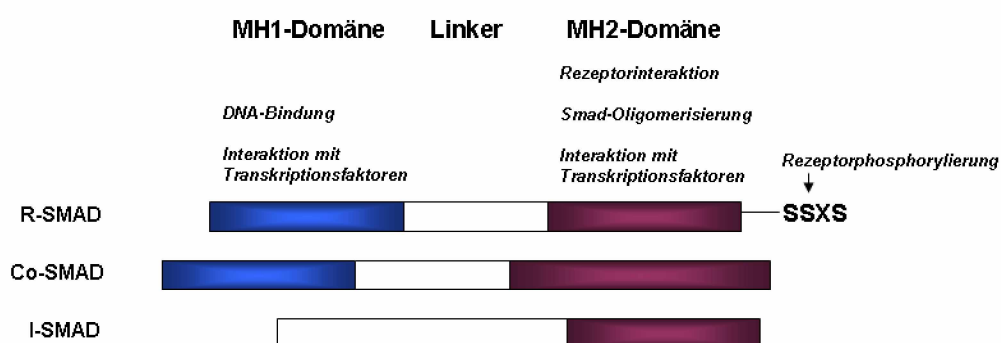


**Abb. 5:** Genaktivierung durch TGF- $\beta$  über den Smad-Signalweg (nach Derynck and Zhang, 2003)

R- und Co-Smads setzen sich aus einer konservierten MH1-Domäne und einer C-terminalen MH2-Domäne zusammen, die über einen variablen Linker verbunden sind (Abb. 6). Über die MH1-Domäne können die Smads, mit Ausnahme von Smad2, an DNA binden, während die MH2-Domäne Smad-Oligomerisation und Smad-Rezeptor-Interaktionen vermittelt. I-Smads weisen zwar ebenfalls eine MH2-Domäne

auf, sind aber infolge fehlender MH1-Domäne nicht zur DNA-Bindung befähigt. Sowohl die MH1- als auch die MH2-Domäne können mit Transkriptionsfaktoren interagieren (Derynck and Zhang, 2003). Die R-Smads weisen zudem am äußersten C-terminalen Ende ein SSXS-Motiv auf, an diesen Serin-Resten werden sie durch den Typ I-Rezeptor phosphoryliert. Nach der Ligandenbindung bleibt der TGF- $\beta$ -Rezeptor für drei bis vier Stunden aktiv, durch die anhaltende Rezeptoraktivierung verbleibt der Smad-Komplex im Kern und beeinflusst dort die Genexpression. Unaktivierte R-Smads befinden sich im Zytoplasma, während Smad4 in Kern und Plasma verteilt ist. Nach Aktivierung und Translokation in den Kern werden die R-Smads dort dephosphoryliert, dies führt zur Dissoziation des Smad-Komplexes und Rückführung der inaktiven R-Smads ins Plasma (Derynck and Zhang, 2003). Nicht nur phosphorylierte R-Smads werden im Kern nach Ubiquitinierung proteolytisch abgebaut, sondern auch inaktive R-Smads im Zytoplasma. Auf diese Weise erfolgt eine posttranslationale Kontrolle der Smad-Spiegel.

Smads werden aber nicht nur durch Mitglieder der TGF- $\beta$ -Familie reguliert. So aktivieren auch die Wachstumsfaktoren EGF und HGF Smad2 (de Caestecker et al., 1998). Der Einfluss der ERK, die durch das G-Protein Ras aktiviert wird, ist umstritten. So wurde ERK als Inhibitor des Smad-Signalwegs beschrieben, indem sie Smad2 und Smad3 in der Linkerregion phosphoryliert und dadurch den Transport in den Kern verhindert (Kretzschmar et al., 1999). Andererseits wurde aber auch eine erhöhte Transkriptionsaktivität von Smad2 nach Phosphorylierung durch ERK gezeigt (Funaba et al., 2002).



**Abb. 6:** Struktureller Aufbau der Smads (modifiziert nach Derynck and Zhang, 2003)



### 1.2.2 Alternative Signalwege

Neben den Smads aktiviert TGF- $\beta$  weitere Signalwege, die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), zu denen die ERK, die p38 Kinase und die JNK (c-Jun N-terminale Kinase) zählen, eingeschlossen. So zeigen Studien mit dem mutierten Rezeptor T $\beta$ RI, der nicht zur Smad-Phosphorylierung fähig ist, dass Zellantworten auch Smad-unabhängig hervorgerufen werden können (Yu et al., 2002). Auch die teilweise sehr schnelle Aktivierung der MAPK innerhalb fünf bis fünfzehn Minuten lässt auf eine transkriptionsunabhängige Aktivierung schließen. Die Aktivierung der JNK und der p38 MAPK erfolgt über TAK (TGF- $\beta$ -aktivierte Kinase), während bei Phosphorylierung der ERK das G-Protein Ras beteiligt ist (Yamaguchi et al., 1999; Yue and Mulder, 2000). Eine Aktivierung von ERK oder JNK kann dann wiederum in einer aktivierenden Smad-Phosphorylierung münden (Engel et al., 1999; Funaba et al., 2002), oder den Smad-Weg durch Phosphorylierung an „falscher“ Stelle (s. o.) hemmen (Kretzschmar et al., 1999). Eine weitere Beeinflussung des Smad-Signalwegs durch die MAPK besteht in der Regulierung von Smad-interagierenden Transkriptionsfaktoren, die eine synergistische Funktion bei der transkriptionellen Kontrolle der Smads ausüben (Derynck and Zhang, 2003). Eine modulierende Funktion bezüglich der Bindung des Smad-Komplexes an die Promoterregion haben Koaktivatoren bzw. Korepressoren, und es konnte gezeigt werden, dass c-Jun durch Interaktion mit dem Korepressor Ski dessen inhibitorische Wirkung verstärkt (Pessah et al., 2002). Umgekehrt haben auch die Smads regulatorischen Einfluss auf die MAPK, so kann z. B. Smad7 die Aktivierung der JNK verstärken (Mazars et al., 2001). Obwohl die unterschiedlichen Signalwege also unabhängig voneinander aktiviert werden können, finden sich doch zahlreiche Interaktionen, und die Zellantwort auf den Stimulus durch TGF- $\beta$  wird durch das Verhältnis zwischen den Signalwegen bestimmt.

TGF- $\beta$  aktiviert des Weiteren die kleinen G-Proteine der Rho-Familie einschließlich RhoA, Rac und Cdc42 (Bhowmick et al., 2001; Edlund et al., 2002), über diese wird eine Umorganisation des Zytoskeletts initiiert (Bishop and Hall, 2000). Eine Beteiligung von RhoA an der Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und die nachfolgende Phosphorylierung der PKB wurde ebenfalls beschrieben (Bakin et al., 2000). Auch der nukleare Transkriptionsfaktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) wird durch TGF- $\beta$

aktiviert, eventuell über Phosphorylierung der I $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B-Inhibitor)-Kinase (Huber et al., 2004).

### **1.2.3 TGF- $\beta$ und Tumorentwicklung**

TGF- $\beta$  beeinflusst die Tumorentwicklung in einer ambivalenten Art. Einerseits schützt es vor Krebsentstehung durch Hemmung der Proliferation in epithelialen, endothelialen und hematopoetischen Zellen (Alexandrow and Moses, 1995; Massague, 1990; Roberts and Sporn, 1993). Cyclin-abhängige Kinasen (Cdk) fördern den Übergang der Zelle in die G<sub>1</sub>/S-Phase und damit die Proliferation. TGF- $\beta$  kann sowohl die Expression der Cdk-Inhibitoren p15 und/oder p21 verstärken als auch die Expression des Zellzyklus-Aktivators und Protoonkogen c-Myc mindern, so dass eine Wachstumshemmung eintritt (Coffey et al., 1988; Datto et al., 1995; Hannon and Beach, 1994). Auch induziert TGF- $\beta$  in einer Reihe von Zellen Smad-abhängig Apoptose und wirkt damit einem entarteten Zellwachstum entgegen. Tumorerkrankungen sind häufig mit einer verminderten Ansprechbarkeit von TGF- $\beta$  auf die Zellen assoziiert, verursacht z. B. durch Mutationen des T $\beta$ RII, Smad2 oder Smad4 (Hata et al., 1998; Massague et al., 2000; Myeroff et al., 1995). Die meisten Krebszellen sind gegen die TGF- $\beta$ -induzierte Wachstumshemmung resistent. Auf der anderen Seite hat TGF- $\beta$  selbst im fortgeschrittenen Tumorstadium eine verschlechternde Wirkung. So wird TGF- $\beta$  in verschiedenen Tumoren epithelialen Ursprungs zwar im Überschuss exprimiert, doch trotz Erhaltung der TGF- $\beta$ -Rezeptoren antworten diese Zellen nicht mit verminderter Proliferation, sondern mit Invasivität und Metastasen (Cui et al., 1996; Yin et al., 1999). Durch Förderung der Migration und der EMT in epithelialen Zellen schafft TGF- $\beta$  einen malignen und invasiven Phänotyp (Thiery and Chopin, 1999). Dieser Status ist in Ras-transformierten Zellen zu finden. Kretzschmar et al. zeigten in murinen Brustepithelzellen, dass überaktives Ras durch Aktivierung von ERK Smad2 und Smad3 an der Linkerseite phosphoryliert und damit eine Translokation in den Kern verhindert; auf diese Weise kommt es zur Inhibition der Wachstumshemmung (Kretzschmar et al., 1999). Durch die gesteigerte Expression und Aktivierung von TGF- $\beta$  schaffen sich die Tumorzellen eine optimale Umgebung. Neben der Umstrukturierung der ECM, die Wachstum, Migration und Invasion des Tumors

ermöglicht, werden durch TGF- $\beta$  Fibroblasten angezogen und die Angiogenese gefördert (Hanahan and Weinberg, 2000). Die Angiogenese spielt eine bedeutende Rolle für die Tumorprogression, da sie die Verbindung mit dem Blutsystem herstellt und den Tumor mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt. Außerdem unterdrückt TGF- $\beta$  lokal Proliferation und Differenzierung einer Reihe von Immunzellen, so dass der Tumor der Kontrolle durch das Immunsystem entgeht (Botti et al., 1998; Letterio and Roberts, 1998).

### 1.2.4 TGF- $\beta$ -induzierte EMT und beteiligte Signalwege

Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Experimente untermauern die bedeutende Rolle von TGF- $\beta$  bei Induktion der EMT und den damit assoziierten Prozessen wie Fibrose oder Tumorprogression. Die Signalwege, die bei der Transformation involviert sind, variieren stark in Abhängigkeit vom zellulären Kontext; einige Beispiele sollen im Folgenden kurz dargestellt werden.

Der Smad-Signalweg nimmt eine zentrale Rolle ein. In einer Reihe von Zelllinien einschließlich HaCaT, NMuMG, HK-2 und MDCK sowie in primären Tubulusepithelzellen der Maus konnte eine Abhängigkeit der EMT von Smad3 gezeigt werden (Piek et al., 1999; Zavadil et al., 2004; Zeisberg et al., 2003). Auch *in vivo* wird bei Smad3-Knockout-Mäusen im Gegensatz zum Wildtyp keine Transformation des Augenlinsenepithels mehr beobachtet (Saika et al., 2004). In NMuMGs sowie in primären Mäuseepithelzellen konnte auch der Einfluss von Smad2 auf die EMT gezeigt werden (LaGamba et al., 2005; Piek et al., 1999; Valcourt et al., 2005). Eine entscheidende Rolle bei der EMT spielt onkogenes Ras, das bei der Induktion der EMT mit TGF- $\beta$  kooperiert (Gotzmann et al., 2002; Oft et al., 2002). Ras vermittelt seine Effekte sowohl über den Raf/MEK/ERK- als auch über den PI3K/PKB-Kinase-Weg (Downward, 1998). Oft et al. zeigten anhand von murinen Tumorzelllinien aus unterschiedlichen Hautkrebsstadien, dass in diesen Zelllinien für die EMT sowohl überaktiviertes Ras als auch Smad2 essentiell ist (Oft et al., 2002). Zellen dieses Modells, die ein fortgeschrittenes Tumorstadium repräsentieren, also stark spindelförmig und invasiv sind, weisen erhöhte Mengen an mutiertem Ras sowie eine gesteigerte, autokrine TGF- $\beta$ -Produktion auf (Oft et al., 2002). Auch die Metastasierung durch die EMT *in vivo* benötigt das Zusammenspiel zwischen dem

TGF- $\beta$ - und dem Raf/MEK/ERK-Signalweg (Janda et al., 2002; Oft et al., 1998). In der Brustepithelzelllinie EpRas, die onkogenes Ras exprimiert, transformieren die Zellen nach Stimulation mit TGF- $\beta$ , dies ist abhängig von NF- $\kappa$ B (Huber et al., 2004). Die Regulation der EMT durch TGF- $\beta$  in Abhängigkeit von ERK wurde mehrfach beschrieben (Santibanez et al., 2003; Xie et al., 2004; Zavadil et al., 2001). In Pankreaszelllinien sind die untersuchten EMT-Merkmale sowohl Smad4- als auch ERK-abhängig und eine dauerhafte Aktivierung von ERK2 durch TGF- $\beta$  kann nur über den Smad-Weg erzielt werden (Ellenrieder et al., 2001). In HaCaTs zeigt die Genexpression nach TGF- $\beta$ 1-Stimulation eine tendenzielle ERK-Abhängigkeit der Gene, die für die Zell-Matrix-Adhäsion und die Zellmotilität zuständig sind. So erwies sich die Aufrechterhaltung von *Adherens Junctions* über E-Cadherin und Aktivierung von Matrixgenen wie z. B. Fibronectin und einiger MMPs, nicht aber die Umstrukturierung des Zytoskeletts, als ERK-abhängig (Zavadil et al., 2001). Eine weitere Kinase, die p38 MAPK, ließ sich ebenfalls als Vermittler bei der TGF- $\beta$ -induzierten EMT identifizieren; sie wird sowohl in NMuMGs als auch im Kolonkrebs-Epithelmodell zur Transformation benötigt (Bates and Mercurio, 2003; Yu et al., 2002). Davies et al. konnten in HaCaTs zeigen, dass sowohl Smad3 als auch die MAPK ERK, JNK und p38 MAPK bei Induktion der EMT notwendig sind (Davies et al., 2005).

Die EMT durch TGF- $\beta$  stellt sich somit als hochkomplexer Prozess dar, der zelltypabhängig durch eine Vielzahl synergistischer bzw. kooperierender Signalwege gesteuert werden kann.

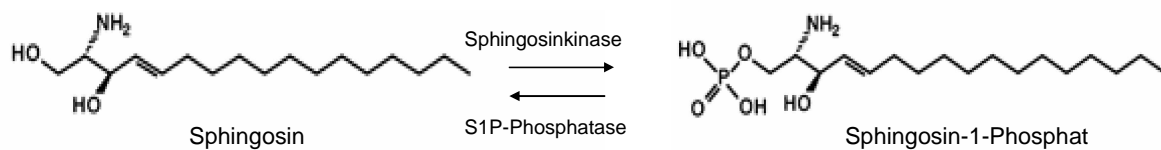
### 1.3 Lysophospholipide

#### 1.3.1 Sphingosin-1-Phosphat

Sphingolipide bilden eine Familie von Membranlipiden, die aus einem langkettigen sphingoiden Rückgrat (beispielsweise Sphingosin) und einer variablen polaren Kopfgruppe bestehen. Ursprünglich wurde den Sphingolipiden nur eine Funktion als Strukturkomponente in Lipiddoppelmembranen zugeordnet, aber im Zuge der Charakterisierung des dynamischen Sphingolipidmetabolismus fand man, dass die

Metabolite, hauptsächlich Ceramide, Sphingosin und Sphingosin-1-Phosphat (S1P), auch eine wesentliche Rolle als Mediatoren bei zellulären Prozessen wie Wachstum, Differenzierung und Apoptose spielen (Spiegel and Kolesnick, 2002). Die Bedeutung von S1P als Regulatorlipid wurde 1991 entdeckt, und innerhalb der letzten 15 Jahre konnte nachgewiesen werden, dass der Sphingosinmetabolit ein weites Spektrum biologischer Prozesse einschließlich Zellmotilität,  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung, Umstrukturierung des Zytoskeletts und Immunität steuert (Le Stunff et al., 2004; Zhang et al., 1991). Sphingolipide können sowohl direkt durch De-novo-Synthese als auch indirekt durch Hydrolyse von Membranlipiden gebildet werden. Die Neusynthese findet auf der zytosolischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums (ER) statt. Nach der Kondensation von Serin mit Palmitoyl-CoA zu 3-Oxosphinganin (= Dihydro-sphingosin) kommt es zur N-Acylierung und zur Bildung von Dihydroceramiden durch die Dihydroceramid-Synthase. Über die Einführung einer *trans*-4,5-Doppelbindung durch die Dihydroceramid-Desaturase entstehen Ceramide, diese werden weiter zu Glykosphingolipiden, zu Ceramid-1-Phosphat oder zu dem Membranlipid Sphingomyelin umgesetzt (Bajjalieh et al., 1989; Jeckel et al., 1992; Kolesnick and Hemer, 1990). Umgekehrt können Ceramide auch metabolisch aus Sphingomyelin gebildet werden. Dies geschieht durch Sphingomyelinasen, deren Aktivität beispielsweise nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Arachidonsäure und Stressfaktoren ansteigt (Levade and Jaffrezou, 1999; Liu et al., 1998; Liu and Hannun, 1997). Bisher sind fünf verschiedene Isoformen der Sphingomyelinasen gefunden worden, die sich durch ihre Aktivitäten in Gegenwart bestimmter Kationen, ihr pH-Optimum und ihre zelluläre Lokalisation unterscheiden (Levade and Jaffrezou, 1999). Die Ceramide werden durch saure, neutrale oder alkalische Ceramidasen zu Sphingosin umgesetzt (Bernardo et al., 1995; El Bawab et al., 2000), dieses wiederum dient den Sphingosinkinasen als Substrat zur Bildung von S1P (Abb. 7). Bisher sind zwei Isoformen der humanen Sphingosinkinase entdeckt worden, bekannt als SphK1 und SphK2. Die deutlich größere SphK2 wird vorzugsweise in Leber und Herz exprimiert, während SphK1 hauptsächlich in Lunge, Milz und Lymphgewebe zu finden ist. Beide Isoformen werden durch N,N-Dimethylsphingosin (DMS) kompetitiv gehemmt (Edsall et al., 1998; Kim et al., 2005). Durch Aktivierung gelangen die Enzyme aus dem Zytosol an die Zellmembran oder ins Kernplasma, wo sie Sphingosin zu S1P phosphorylieren (Le Stunff et al., 2004). Eine ganze Reihe von Agonisten ist bekannt, die die SphK1 stimulieren, dazu gehören

Wachstumsfaktoren wie der thrombozytäre Wachstumsfaktor (PDGF), der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) und EGF, Zytokine wie der Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) sowie die Lysophosphatidsäure (LPA) und S1P (Spiegel and Milstien, 2002). Der daraus resultierende erhöhte intrazelluläre S1P-Spiegel löst eine Vielzahl zellulärer Reaktionen aus. S1P hat im Gegensatz zu Sphingosin und Ceramiden eher wachstumsfördernde und antiapoptotische Eigenschaften, so dass das dynamische Gleichgewicht zwischen den Sphingolipid-Metaboliten entscheidend für Überleben oder Zelltod ist (Le Stunff et al., 2004). Der Abbau des S1P erfolgt durch die S1P-Lyase und S1P-Phosphatase, wobei beide Enzyme im gleichen Ausmaß beteiligt sein können (Van Veldhoven and Mannaerts, 1994). Die S1P-Lyase spaltet die C2-C3 Bindung des S1P, so dass Hexadecanal und Phosphoethanolamin entstehen; sie wird in fast allen Geweben und Zellen mit Ausnahme der Thrombozyten exprimiert (Yatomi et al., 1995). Die S1P-Phosphatase weist eine für Phosphatasen typische hochkonservierte Sequenz auf. Sie wird hauptsächlich in Leber und Niere gebildet und liegt vorzugsweise an Plasmamembranen assoziiert vor (Mandala et al., 2000).



**Abb. 7:** S1P-Metabolismus

### 1.3.2 Lysophospholipid-Rezeptoren

S1P und LPA, ein weiteres Lysophospholipid (LPL) mit ähnlichem räumlichen Aufbau wie S1P, vermitteln eine Vielzahl ihrer Wirkungen über membranständige Rezeptoren, die die Membran siebenmal durchspannen und an heterotrimere G-Proteine koppeln. Dabei sind sowohl Pertussistoxin (PTX)-sensitive  $G_i$ -Proteine beteiligt als auch  $G_q$ - und  $G_{12/13}$ -Proteine (Hla et al., 2001). 1990 wurde der bedeutsamste Rezeptor für S1P entdeckt. Die mRNA, deren Transkription als schnelle Antwort auf die Stimulation mit Phorbolmyristatacetat (PMA) stattfindet, wurde aus den Endothelzellen der Nabelschnur isoliert. Da PMA die Differenzierung

von Endothelzellen zu kapillarähnlichen Strukturen fördert, wurde das entsprechende Gen als endotheliales Differenzierungsgen (Edg) bezeichnet (Hla and Maciag, 1990). Erst 1998 konnte S1P als Ligand von Edg-1 ausgemacht werden (Lee et al., 1998). Inzwischen sind zehn verwandte Rezeptoren entdeckt, von denen fünf vorzugsweise mit S1P und fünf mit LPA interagieren. Dementsprechend erfolgte eine Umbenennung der Rezeptoren in S1P<sub>1-5</sub> und LPA<sub>1-5</sub> (Lee et al., 2006; Radeff-Huang et al., 2004). Die fünf S1P-Rezeptoren sind stark strukturverwandt, sie weisen eine hohe Aminosäure-Sequenzhomologie auf. Während S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> weitgehend durch verschiedene Gewebe hinweg exprimiert werden, findet die Expression von S1P<sub>4</sub> hauptsächlich auf lymphoidem und hämatopoetischem Gewebe sowie in der Lunge statt. Auch die Bildung des S1P<sub>5</sub> ist begrenzt und beim ausgewachsenen Menschen hauptsächlich im Gehirn und in der Milz zu finden (Anliker and Chun, 2004a). S1P<sub>1</sub> koppelt ausschließlich an G<sub>i</sub>, während S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> neben G<sub>i</sub> noch an G<sub>q</sub> und G<sub>12/13</sub> binden. S1P<sub>4</sub> und S1P<sub>5</sub> fehlt dagegen die G<sub>q</sub>-Kopplung, sie vermitteln ihre Effekte über G<sub>i</sub> und G<sub>12/13</sub>.

Neben den spezifischen Rezeptoren wurden kürzlich drei weitere, nicht verwandte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) entdeckt; GPR3, GPR6 und GPR12 weisen einerseits eine hohe konstitutive Aktivität auf, können aber auch durch S1P aktiviert werden (Uhlenbrock et al., 2002). Für GPR3/6/12 konnte eine PTX-abhängige Steigerung des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Gehalts gezeigt werden; durch Stimulation mit S1P kommt es zur Internalisierung von GPR6 (Ignatov et al., 2003b; Uhlenbrock et al., 2002). Die Funktion der erst kürzlich entdeckten Rezeptoren ist noch nicht vollständig aufgeklärt, neben einer Rolle im zentralen Nervensystem scheinen sie auch in verschiedenen endothelialen und vaskulären Zellen Bedeutung zu haben (Ignatov et al., 2003a; Uhlenbrock et al., 2003).

In S1P<sub>1</sub>-überexprimierenden Zellen induziert S1P die Stimulation der ERK, der Phospholipase C (PLC) und der PI3K und inhibiert die Akkumulation von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Alle diese Effekte sind PTX-abhängig. Auch S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> vermitteln eine ERK-Aktivierung G<sub>i</sub>-abhängig. Beide Rezeptoren aktivieren außerdem PTX-unabhängig, vermutlich über G<sub>q</sub>, die PLC sowie Rho G<sub>12/13</sub>-vermittelt. S1P<sub>4</sub> aktiviert ebenfalls ERK und PLC, daneben wurde über eine Aktivierung des kleinen G-Proteins Cdc42 berichtet. S1P<sub>5</sub> inhibiert G<sub>i</sub>-abhängig die Akkumulation der cAMP, PTX-unabhängig aktiviert S1P<sub>5</sub> die JNK und inhibiert die serum-induzierte ERK-Aktivierung (Sanchez and Hla, 2004). Ebenfalls als PTX-abhängig und damit

über  $G_i$  vermittelt zeigte sich die S1P-induzierte Aktivierung von Ras (Radeff-Huang et al., 2004). Während S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>5</sub> die Adenylatcyclase (AC) hemmen, wird sie durch S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>4</sub> aktiviert. Für S1P<sub>3</sub> konnte sowohl eine Hemmung als auch eine Aktivierung der AC gezeigt werden (Anliker and Chun, 2004a).

Die zuletzt entdeckten LPA-Rezeptoren LPA<sub>4</sub> und LPA<sub>5</sub> ähneln sich zwar untereinander in ihrer Aminosäuresequenz, weichen aber von den übrigen drei stark sequenzhomologen LPA-Rezeptoren LPA<sub>1-3</sub> ab. LPA<sub>1</sub>, der als erster LPA-bindender Rezeptor identifiziert wurde, und LPA<sub>2</sub> werden ubiquitär exprimiert, sie regulieren über  $G_i$ ,  $G_q$  und  $G_{12/13}$  die AC-, ERK- und PLC-Aktivierung sowie über Rho die Zytoskelettstruktur. Auch LPA<sub>3</sub> wird in den meisten Geweben exprimiert, koppelt aber im Unterschied zu LPA<sub>1</sub> und LPA<sub>2</sub> nicht an  $G_{12/13}$  (Anliker and Chun, 2004b). LPA<sub>4</sub> steigert, vermutlich über  $G_s$ , den cAMP-Spiegel, und der erst kürzlich entdeckte LPA<sub>5</sub>-Rezeptor aktiviert über  $G_{12/13}$  Rho sowie über  $G_q$  die PLC, er wird zudem nach Stimulation internalisiert (Lee et al., 2006; Noguchi et al., 2003; Ye et al., 2002). Auch LPA aktiviert PTX-abhängig ERK, vermutlich über Aktivierung von Ras (Radeff-Huang et al., 2004).

**Tab. 1:** Intrazelluläre Signaltransduktion der LPL-Rezeptoren

Rezeptor	S1P <sub>1</sub>	S1P <sub>2</sub>	S1P <sub>3</sub>	S1P <sub>4</sub>	S1P <sub>5</sub>	LPA <sub>1</sub>	LPA <sub>2</sub>	LPA <sub>3</sub>	LPA <sub>4</sub>	LPA <sub>5</sub>
G-Protein-Kopplung	$G_i$	$G_i$	$G_i$	$G_i$	$G_i$	$G_i$	$G_i$	$G_i$	$G_s$	$G_{12/13}$
		$G_q$	$G_q$	$G_{12/13}$	$G_{12/13}$	$G_q$	$G_q$	$G_q$		$G_q$
		$G_{12/13}$	$G_{12/13}$			$G_{12/13}$	$G_{12/13}$			
Aktivierung	ERK	ERK	ERK	ERK	PLC	ERK	ERK	PLC	AC	PLC
	PLC	PLC	PLC	PLC	JNK	PLC	PLC	AC		Rho
	Rho	Rho	Rho	Rho		Rho	Rho			AC
	Rac	PI3K	Rac	AC		PI3K	PI3K			
	PI3K	AC	PI3K	Cdc42						
		AC								
Hemmung	AC	Rac	AC		ERK	AC	AC	AC		
					AC					



### 1.3.3 S1P als Rezeptoragonist

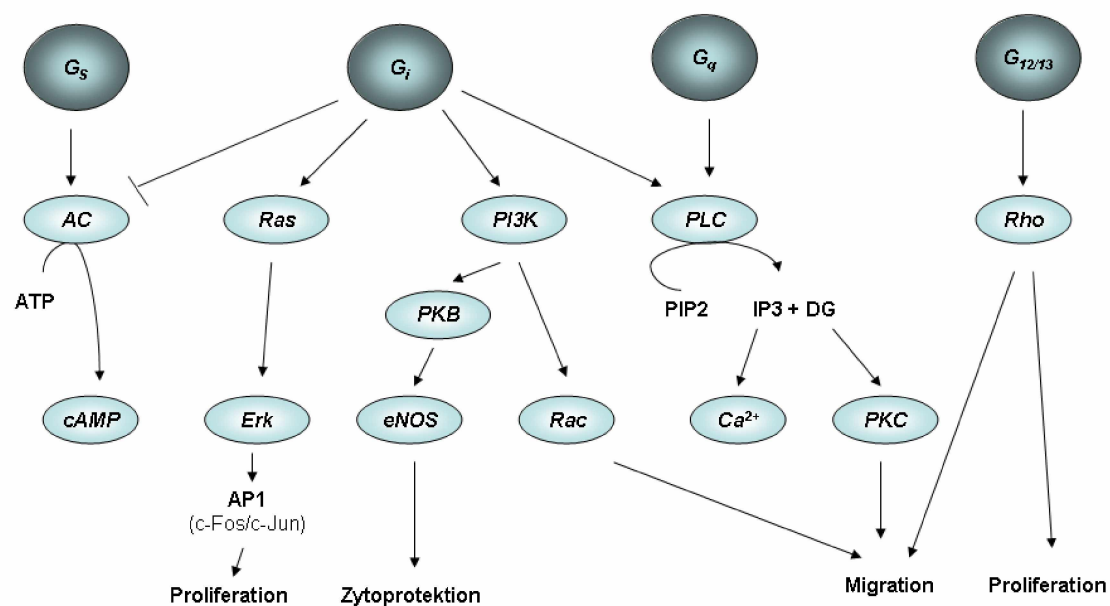
S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3</sub> haben große Bedeutung bei der Angiogenese. In Endothelzellen wird über S1P<sub>1</sub> das kleine G-Protein Rac aktiviert, das die Bildung von Lamellopodien vermittelt (Lee et al., 2001), während es über Rho zur Anordnung von Aktin-Stressfasern und zur Bildung von fokalen Kontakten über Integrine kommt (Paik et al., 2001). Durch diese Mechanismen werden die Zellen zur Migration angeregt. Außerdem werden die Zell-Zell-Kontakte zwischen den Endothelzellen durch Einlagerung von vaskulärem endothelialen Cadherin (VE-Cadherin) und  $\beta$ -Catenin in die *Adherens Junctions* gestärkt und es kommt zur Ausbildung von kapillaren Strukturen (Lee et al., 1999). Der endotheliale S1P<sub>1</sub>-Rezeptor ist auch für die Stabilisierung der neuen Gefäße zuständig. Durch Aktivierung von N-Cadherin infolge Umlagerung aus dem Zytoplasma an die Zelloberfläche kommt es zur Knüpfung von Kontakten zwischen Endothel und unterstützenden Mauerzellen (Paik et al., 2004). Versuche mit S1P<sub>1</sub>-Knockouts unterstreichen die Bedeutung dieses Rezeptors, die Embryos sterben zwischen den Gestationstagen 12,5 und 14,5 durch massive Blutungen mit nur unzureichend bedeckten Gefäßen durch Gefäßmuskelzellen (Allende et al., 2003; Liu et al., 2000).

In einer Reihe von Zellen aktiviert S1P über S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3</sub> Rho und Rac und wirkt dadurch migratorisch; S1P<sub>2</sub> hat dagegen antimigratorische Funktion, vermutlich durch die Inhibierung von Rac. S1P<sub>2</sub> wird stark in Zellen exprimiert, in denen S1P die Migration hemmt, beispielsweise in Melanom- und glatten Gefäßmuskelzellen (Okamoto et al., 2000), das Verhältnis zwischen S1P<sub>1/3</sub>- und S1P<sub>2</sub>-Rezeptoren bestimmt also das migratorische Potential der Zelle durch S1P. Zudem ist S1P<sub>2</sub> entscheidend für die kardiale Entwicklung während der Embryogenese (Kupperman et al., 2000)

Auf eine Vielzahl von Zellen hat S1P eine proliferative Wirkung. Dabei haben die Rezeptoren S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> durch Aktivierung von Rho zusätzlich zu G<sub>i</sub>-vermittelten Signalwegen das größte Potential, Zellwachstum zu beeinflussen, wie es für S1P<sub>2/3</sub>-überexprimierende Leberzellen gezeigt werden konnte (Radeff-Huang et al., 2004). Darüber hinaus wird die Proliferation auch rezeptorunabhängig, vermutlich über intrazelluläre Signalwege, vermittelt (Spiegel and Milstien, 2003a). Auf humane Keratinozyten dagegen hat S1P einen wachstumshemmenden Effekt, der zum Teil

PTX-abhängig ist, aber ebenfalls intrazellulär vermittelt zu sein scheint (Vogler et al., 2003).

Auch der antiapoptotische Effekt des S1P kann sowohl rezeptorabhängig als auch intrazellulär induziert werden. In Endothelzellen wird der zytoprotektive Effekt durch verstärkte Freisetzung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) erzielt, hauptsächlich über den  $G_i$ -vermittelten PI3K/PKB/eNOS-Weg durch Stimulation von  $S1P_1$  oder  $S1P_3$  (Kwon et al., 2001; Morales-Ruiz et al., 2001). Eine Beteiligung von ERK und p38 MAPK an der antiapoptotischen Wirkung wurde ebenfalls beschrieben (Baudhuin et al., 2002; Davaille et al., 2002).

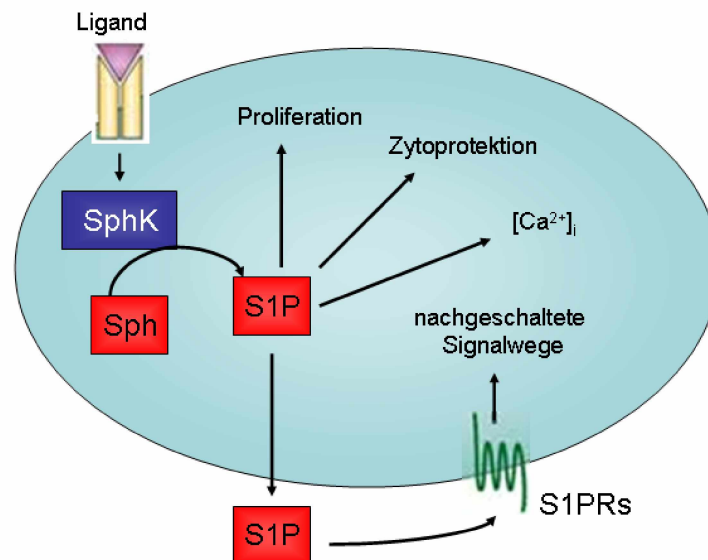


**Abb. 8:** Regulation der Signalwege und Zelleffekte über die spezifischen G-Proteine

### 1.3.4 S1P als intrazellulärer Botenstoff

Obwohl die meisten S1P-vermittelten Effekte über die genannten Rezeptoren vermittelt werden, lassen eine Reihe von Hinweisen darauf schließen, dass S1P auch intrazellulär als so genannter *Second Messenger* agiert. Zwar kann intrazellulär gebildetes S1P im Zuge eines *inside-out* Mechanismus nach seiner Ausschleusung extrazellulär wirken, daneben konnten aber auch rezeptorunabhängige S1P-Effekte nachgewiesen werden (Olivera et al., 2003). Die Stimulation der SphK1 durch verschiedene Agonisten führt durch vermehrte Bildung von S1P zu verstärktem

Wachstum und Zellschutz, so verliert sich durch Hemmung der Sphingosinkinase der proliferative Effekt von PDGF (Olivera and Spiegel, 1993), ebenso wie die zytoprotektiven Wirkungen von Vitamin D<sub>3</sub> und Dexamethason (Hammer et al., 2004; Kleuser et al., 1998). In murinen S1P<sub>2</sub>/S1P<sub>3</sub>-Doppel-Knockout-Fibroblasten konnten durch die Überexpression der SphK auch nach Behandlung mit PTX proliferative und zytoprotektive Effekte erreicht werden (Olivera et al., 2003). Einen weiteren Hinweis auf einen rezeptorunabhängigen Mechanismus bietet Dihydro-S1P, das zwar als Agonist an allen S1P-Rezeptoren wirkt, aber trotzdem nicht alle Effekte des S1P aufweist (Van Brocklyn et al., 1998). Der intrazelluläre Wirkmechanismus ist zwar noch nicht geklärt, ein direkter Effekt ist jedoch die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus dem ER (Meyer Zu Heringdorf, 2004) und die Steigerung des Calcium-Influx' nach intrazellulärer Bildung durch die SphK (Itagaki and Hauser, 2003).



**Abb. 9:** Intra- und extrazelluläre Signalwege des S1P (Sph: Sphingosin) (nach Spiegel and Milstien, 2003b)

### 1.3.5 S1P und Tumorentwicklung

S1P besitzt aufgrund seiner proliferativen, migratorischen und antiapoptotischen Wirkungen auf eine Reihe von Zelltypen sowie durch Förderung der Angiogenese onkogenes Potential. Die Überexpression der SphK führt in der Fibroblastenzelllinie NIH3T3 zur Transformation und *in vivo* zur Tumorbildung (Xia et al., 2000). Auch transfiziertes aktives Ras scheint sein onkogenes Potential durch Stimulation der

SphK zu entfalten (Xia et al., 2000). Epitheliale Zellen sind von dem onkogenen Potential des S1P ebenfalls betroffen. Bei Patienten mit Ovarkrebs wurden erhöhte S1P-Plasmaspiegel festgestellt, das Lysophospholipid könnte hier also als Tumormarker genutzt werden (Sutphen et al., 2004). In Magenkrebszellen aktiviert S1P den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor EGFR sowie einen weiteren Tyrosinkinase-Rezeptor und scheint dadurch zur Tumorigenität beizutragen (Yamashita et al., 2006). Eine erhöhte Expression der SphK1 ist auch bei Tumoren des Kolons detektierbar und fördert über eine erhöhte Produktion der Cyclooxygenase Cox-2 und des Prostaglandins E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) das Tumorwachstum (Kawamori et al., 2006). In der humanen Brustkrebszelllinie MCF7 wirkt EGF durch eine Aktivierung der SphK1 migratorisch und wachstumsfördernd (Doll et al., 2005; Sarkar et al., 2005). Dagegen ist es die SphK2, die in der humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB-453 die Migration auf EGF vermittelt (Hait et al., 2005). Auch ein verändertes Verhältnis der Rezeptoren scheint eine Rolle zu spielen. Es zeigte sich, dass die Invasion in Melanom- und Magenkrebszellen über S1P<sub>2</sub> inhibiert wird, so dass eine Abnahme der S1P<sub>2</sub>-Rezeptordichte oder eine Zunahme gegensätzlicher Signalwege zu einem aggressiveren Phänotyp beitragen könnte (Arikawa et al., 2003; Yamashita et al., 2006).

Ein Grund für die verminderte Ansprechbarkeit von Krebszellen auf Chemotherapeutika kann eine Verstärkung des S1P-Signalwegs sein, wie es für Prostatakrebszellen gezeigt wurde (Akao et al., 2006), die Kombination mit einem SphK-Inhibitor könnte hier sinnvoll sein. Aber auch generell weisen die Inhibitoren der SphK1 und Antikörper gegen S1P Potential als Antitumorthherapie auf, da sie Tumorwachstum und Angiogenese hemmen und die Apoptose in den Krebszellen erhöhen (French et al., 2006; Visentin et al., 2006).

### 1.3.6 S1P-Crosstalk

S1P hat, die Angiogenese und Gefäßbildung betreffend, ähnliche Eigenschaften wie VEGF. Studien zu der Beziehung zwischen S1P und VEGF ergaben, dass S1P den VEGF-Rezeptor-2 transaktivieren kann (Endo et al., 2002; Tanimoto et al., 2002). So phosphoryliert S1P in bovinen arteriellen Endothelzellen (BAECs) den Tyrosinkinase-Rezeptor durch Stimulation des S1P<sub>1</sub>-Rezeptors und nachfolgende G<sub>i</sub>-Aktivierung;

durch Einsatz eines Antikörpers gegen VEGF konnte gezeigt werden, dass dies nicht durch Freisetzung von endogenem VEGF verursacht wird (Tanimoto et al., 2002). Andererseits stimuliert VEGF die SphK1 und induziert über die Bildung von S1P die Akkumulation von Ras und Aktivierung von ERK. Obwohl noch nicht eindeutig bewiesen, gibt es eine Reihe von Hinweisen, die dabei eher für einen intrazellulären Mechanismus als für ein *inside-out-signalling* sprechen. Beispielsweise kann die S1P-rezeptorvermittelte ERK-Aktivierung durch PTX inhibiert werden, nicht aber die VEGF-vermittelte. Diese allerdings wird durch Hemmung der SphK1 aufgehoben (Shu et al., 2002). Auch PDGF aktiviert über den Tyrosinkinase-Rezeptor PDGFR die SphK1 und transloziert sie an die Plasmamembran. Dort gebildetes S1P wird offenbar ausgeschleust und aktiviert über S1P<sub>1</sub> nachgeschaltete Signalwege, die für die Zellbewegung wichtig sind. Der Crosstalk zwischen PDGFR und S1P<sub>1</sub> ist essentiell für die durch PDGF hervorgerufene Migration von Perizyten und glatten Muskelzellen zur Bildung neuer Gefäße (Spiegel and Milstien, 2003b). Neben dem PDGF-Rezeptor transaktiviert S1P in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) auch GPCR-abhängig den EGFR (Tanimoto et al., 2004).

Kürzlich erst wurde ein weiterer Crosstalk von S1P entdeckt, zum ersten Mal mit einem Serin-Threonin-Kinase-Rezeptor, dem TβRII. In Mesangiumzellen konnte gezeigt werden, dass S1P ähnliche Eigenschaften wie TGF-β in Bezug auf die Regulation von NO, sekretorischer Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) und MMP-9 hat. Interessanterweise phosphoryliert S1P in Analogie zu TGF-β ebenfalls Smad1, Smad2 und Smad3. Diese Aktivierung von Smad2 geschieht schon nach 15 bis 20 Minuten und wird durch PTX gesteigert, was auf eine Hemmung der Smad-Phosphorylierung durch die PTX-sensitive Aktivierung der ERKs hindeutet. Die S1P-induzierte Phosphorylierung von Smad1 kann durch Behandlung mit spezifischer kleiner interferierender RNA (siRNA) gegen TβRII gehemmt werden, dies lässt auf eine Komplexierung des TβRII mit dem S1P-Rezeptor schließen, zumal auch das Molekulargewicht von TβRII nach Kostimulation mit S1P und TGF-β erhöht ist (Xin et al., 2004). In dermalen Keratinozyten konnte ein ähnlicher Crosstalk gezeigt werden. So aktiviert S1P Smad3 auch ohne Zugabe von TGF-β, die S1P-induzierte Wachstumshemmung ist teilweise und die Migration vollständig Smad3-vermittelt. Die Smad3-Phosphorylierung durch S1P erwies sich als S1P<sub>1</sub>-abhängig vermittelt. S1P scheint zur Smad-Aktivierung kein TGF-β zu benötigen, wohl aber den TβRI, da die Hemmung dieses Rezeptors auch die Smad3-Aktivierung aufhebt. Ein weiteres

Indiz für die Transaktivierung ergibt sich durch die Immunpräzipitation des S1P<sub>1</sub> mit TβRI, nach Stimulation mit S1P konnten die Rezeptoren komplexiert nachgewiesen werden (Sauer et al., 2004a). Ebenso phosphoryliert LPA über G<sub>i</sub>-gekoppelte Rezeptoren Smad3 in Abhängigkeit vom TβRI, aber unabhängig von TGF-β. Dieser Mechanismus scheint für die LPA-induzierte Migration und Wachstumshemmung der Keratinozyten verantwortlich zu sein (Sauer et al., 2004b).

### 1.3.7 S1P-Rezeptoragonisten/-antagonisten

Um die Effekte der spezifischen Rezeptoren eingehender untersuchen zu können, stehen mittlerweile einige Substanzen zur Verfügung, die an einem oder mehreren Rezeptoren agonistische bzw. antagonistische Wirkung haben.

Die größte Bedeutung kommt derzeit FTY720 zu, einem chemischen Derivat des aus dem Ascomyzeten *Isaria sinclairii* isolierten ISP-1 (Myriocin), in das als neuer Immunmodulator mit innovativem Wirkprinzip große Hoffnung gesetzt wird (Brinkmann et al., 2000). FTY720 befindet sich derzeit in klinischen Studien als Immunsuppressivum bei der Therapie der multiplen Sklerose. Der S1P-Agonist bindet nach seiner Phosphorylierung mit hoher Affinität an vier der fünf S1P-Rezeptoren, S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>3</sub>, S1P<sub>4</sub> und S1P<sub>5</sub> (Brinkmann et al., 2002).

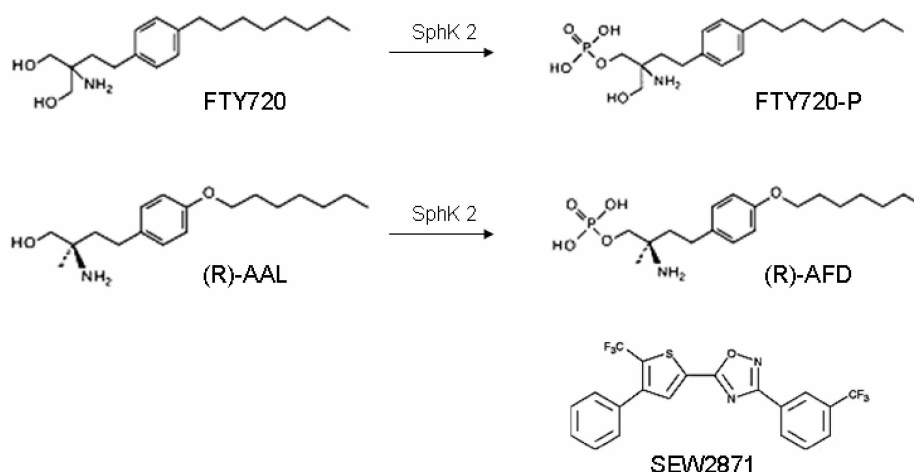
Lymphozyten weisen als bedeutendsten S1P-Rezeptor S1P<sub>1</sub> auf. Sowohl T- als auch B-Zellen benötigen ihn, um nach S1P-Stimulation aus peripherem Lymphgewebe in die Blutbahn zu gelangen. Auch die Freisetzung der Thymozyten aus dem Thymus erfolgt durch Stimulation des S1P<sub>1</sub>-Rezeptors (Matloubian et al., 2004). Phosphoryliertes FTY720 bindet an den S1P<sub>1</sub>-Rezeptor der Thymozyten und Lymphozyten, dies verursacht eine Internalisierung und den anschließenden Abbau des Rezeptors (Graler and Goetzl, 2004). Dadurch können die Zellen nicht mehr als Antwort auf zirkulierendes S1P ausgeschüttet werden und verbleiben im Lymphgewebe. Erst durch Reexpression der S1P<sub>1</sub>-Rezeptoren werden die Lymphozyten wieder freigesetzt. Trotzdem kommt es nicht zur generalisierten Unterdrückung der Zellfunktion. Wird FTY720 in klinisch relevanten Konzentrationen eingesetzt, ist die T-Zell Antwort auf Antigene nicht unterdrückt (Brinkmann et al., 2001; Pinschewer et al., 2000). Die Wirkung von FTY720 auf Endothelzellen ist dagegen vergleichbar mit der des S1P, da auch FTY720 die *Adherens Junctions* des

Endothels durch Anreicherung von VE-Cadherin in den Zellmembranen verstärkt und so die Blutgefäße durch Bildung einer Barriere abdichtet (Brinkmann, 2004). FTY720 ist nur in seiner phosphorylierten Form wirksam und hat, ebenso wie Sphingosin, eine hohe Affinität zur SphK, der es als Substrat dient. Im Gegensatz zu Sphingosin, das vorzugsweise durch die SphK1 umgesetzt wird, erfolgt die Phosphorylierung von FTY720 zu FTY720-Phosphat (FTY720-P) effizienter durch SphK2 als durch die SphK1 (Billich et al., 2003).

Ebenso wie FTY720 stellt das Analogon (R)-AAL nach Phosphorylierung zu (R)-AFD einen Agonisten an den vier S1P-Rezeptoren S1P<sub>1;3-5</sub> dar mit vergleichbaren Wirkungen wie FTY720 *in vitro* und *in vivo* (Brinkmann et al., 2002; Sanchez et al., 2003).

Der Tetraaromat SEW2871 wurde durch Hoch-Durchsatz-Selektion von chemischen Datenbanken als S1P-Rezeptoragonist identifiziert, er greift selektiv am S1P<sub>1</sub>-Rezeptor an (Jo et al., 2005). Als spezifischer Agonist erzeugt er in Mäusen ebenfalls eine Lymphopenie und unterdrückt die Migration der Lymphozyten (Sanna et al., 2004). Die S1P-Agonisten sind in Abb. 10 dargestellt.

S1P-Rezeptorantagonisten stellen das Pyrazolopyridin JTE-013, das selektiv an S1P<sub>2</sub> bindet, und Suramin mit einer Präferenz für S1P<sub>3</sub> dar (Ancellin and Hla, 1999; Osada et al., 2002).



**Abb. 10:** Aufbau und Metabolismus der S1P-Rezeptoragonisten

## 1.4 Fragestellung und Zielsetzung

Im Laufe der letzten Jahre wurde viel über die Bedeutung von S1P erforscht, und während man früher von einer vorwiegend mechanischen Funktion der Phospholipide ausging, ist inzwischen ihre Beteiligung an einer Vielzahl biologischer Prozesse bekannt. So wirken sie in Abhängigkeit vom Zelltyp proliferativ, differenzierungsfördernd, zytoprotektiv, chemotaktisch und begünstigen die Angiogenese. Da S1P weiterhin ein wachstumshemmendes Potential auf Keratinozyten aufweist, ist hier ein Einsatz als Therapeutikum bei hyperproliferativen Hautkrankheiten angedacht. Um mögliche Wirkungen und Risiken bei einer Behandlung abschätzen zu können, sind umfassende Kenntnisse zum Wirkmechanismus der Signalmoleküle wünschenswert. Da S1P bei einem topischen Einsatz über einen längeren Zeitraum in erhöhter Konzentration vorwiegend auf epidermale, aber gegebenenfalls auch dermale Zellen einwirkt, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss auf primäre Keratinozyten sowie Fibroblasten im Hinblick auf die beteiligten Signalwegen analysiert. S1P weist bezüglich einer Reihe von Zelleffekten eine hohe Analogie zu TGF- $\beta$  auf; während TGF- $\beta$  allerdings in einer Vielzahl von epithelialen Zellen als wesentlicher Faktor der EMT identifiziert ist, gibt es nur Hinweise auf ein transformatorisches Potential des Sphingolipids. Der Einfluss von TGF- $\beta$  und S1P auf primäre Keratinozyten sollte nun anhand von EMT-Markern überprüft werden.

Die Arbeit gliedert sich in folgende Teilbereiche:

- Untersuchung des transformatorischen Potentials von TGF- $\beta$  und S1P auf Keratinozyten anhand charakteristischer EMT-Marker,
- Identifizierung der spezifischen Rezeptorbeteiligung bei der S1P-induzierten EMT,
- Charakterisierung der intrazellulären Signaltransduktion bei Induktion der EMT durch TGF- $\beta$  und S1P,
- Einfluss von S1P auf die Matrixproteinsynthese in Fibroblasten sowie Untersuchung beteiligter Signalwege im Vergleich mit TGF- $\beta$ ,
- Herstellung S1P-haltiger topischer Zubereitungen.