

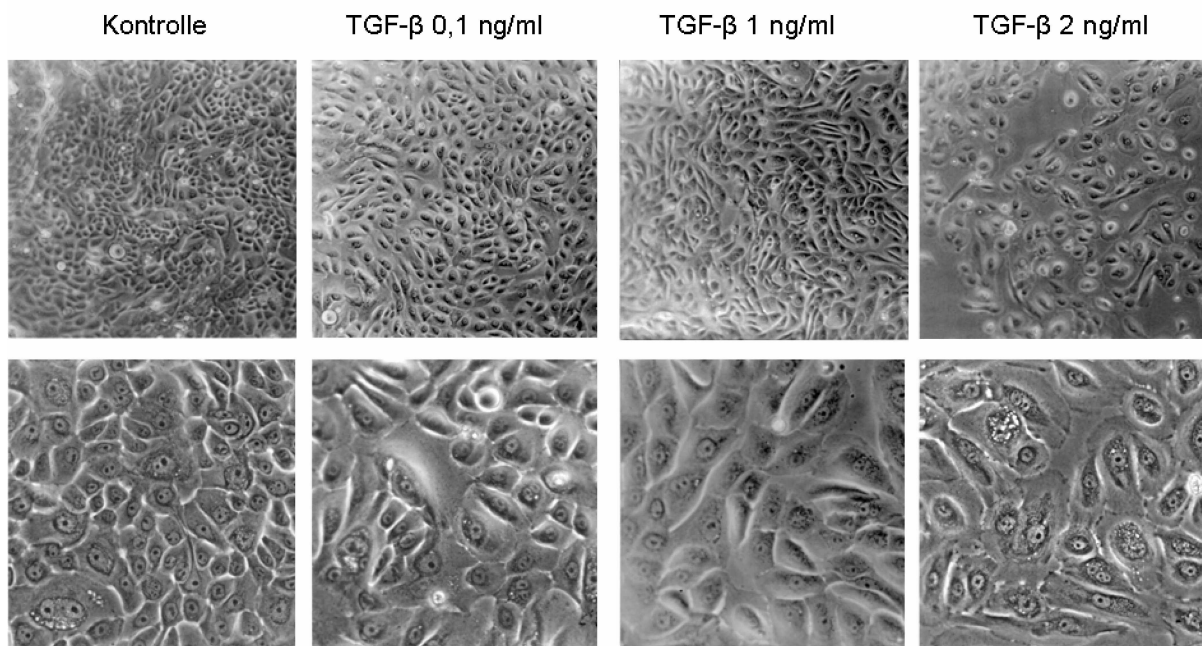
### **3 ERGEBNISSE**

---

### **3.1 Einfluss von TGF- $\beta$ und S1P auf die EMT in humanen Keratinozyten**

#### **3.1.1 Wirkung von TGF- $\beta$ auf den Phänotyp humaner Keratinozyten**

Als Auslöser der EMT in Epithelzellen sind zahlreiche Wachstumsfaktoren bzw. Zytokinen bekannt, unter denen TGF- $\beta$  für den Transformationsprozess eine bedeutende Rolle spielt (Thiery, 2002; Zavadil and Bottinger, 2005). Während die EMT in einer Vielzahl von Zelllinien gut untersucht ist, gibt es nur wenige Studien über die Transformierung durch TGF- $\beta$  in humanen primären Zellen (Oft et al., 2002; Zavadil et al., 2004). Die Stimulation von Keratinozyten mit TGF- $\beta$  in den Konzentrationen 1 ng/ml und 2 ng/ml führte zu einer klar erkennbaren Veränderung des Phänotyps. So nahmen die Zellen eine längliche, spindelartige, Fibroblasten-ähnliche Form an. Während die Kontrolle weiterhin einen dichten Verband mit festen Zell-Zell-Kontakten aufwies, schienen die TGF- $\beta$ -stimulierten Zellgruppen aufgelockert. Die einzelnen Zellen begannen, sich aus dem Verband zu lösen und mit veränderter Membranstruktur gegen die Nachbarzellen abzugrenzen. Zellen, die mit 0,1 ng/ml TGF- $\beta$  stimuliert wurden, wiesen diesen Phänotyp in abgeschwächter Form mit ansatzweise fibroblastoider Struktur und leicht reduzierten Zell-Zell-Kontakten auf (Abb. 11). Erste Veränderungen traten frühestens nach 48 h auf, während ein deutlich fibroblastoider Phänotyp erst nach drei bis fünf Tagen erkennbar war.

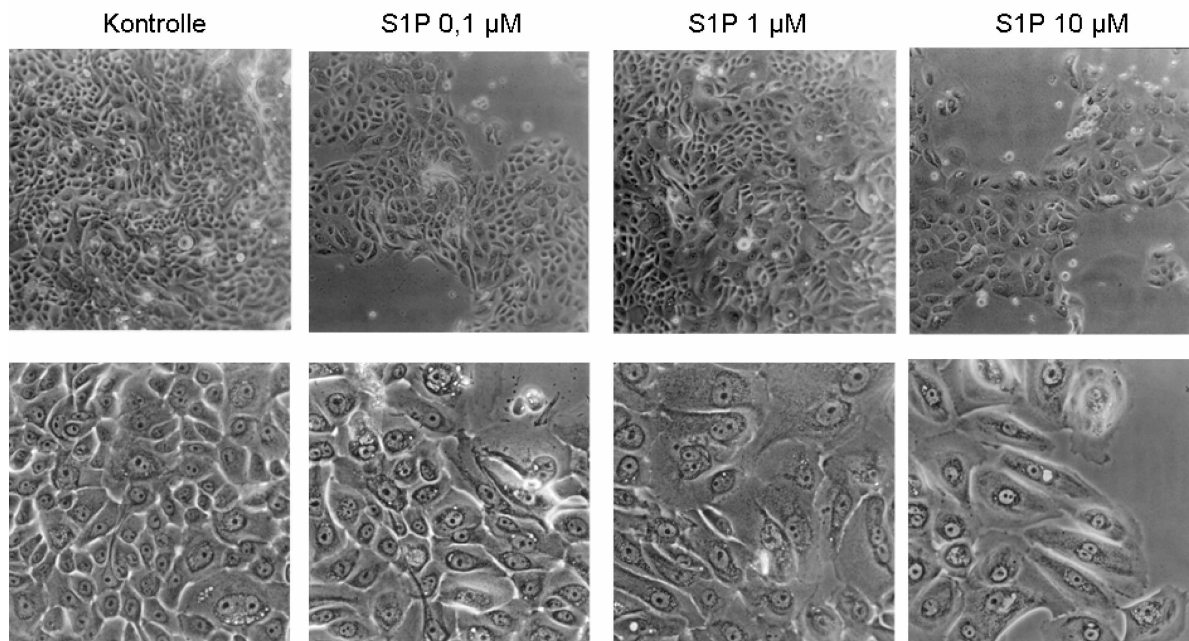


**Abb. 11:** Wirkung einer fünftägigen Stimulation mit TGF- $\beta$  in verschiedenen Konzentrationen auf den Phänotyp humaner Keratinozyten (obere Reihe: 100fache Vergrößerung; untere Reihe: 320fache Vergrößerung). Die Bilder sind charakteristisch für drei weitere Versuche.

### 3.1.2 Analoge Wirkung von S1P auf den Phänotyp humaner Keratinozyten

S1P hat in einer Reihe von Zellen hinsichtlich vieler Effekte ähnliche Wirkungen wie TGF- $\beta$ . So fördert es analog zu TGF- $\beta$  in Keratinozyten die Migration, während die Proliferation gehemmt wird (Vogler et al., 2003). Über eine S1P-induzierte EMT wurde bislang noch nichts berichtet. Nach Stimulation der Keratinozyten über einen Zeitraum bis zu sieben Tagen mit S1P in den Konzentrationen 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M zeigte sich, dass auch das Lysophospholipid eine phänotypische Veränderung der Epithelzellen induzierte. So erzeugten 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M S1P einen spindel-förmigen, fibroblastoiden Phänotyp in aufgelockertem Zellverband. Diese Veränderung war mit S1P 10  $\mu$ M am deutlichsten ausgeprägt, die Zellen wiesen eine veränderte Membranstruktur und stark reduzierte Zell-Zell-Kontakte auf. Mit S1P 0,1  $\mu$ M ließ sich im Vergleich zur Kontrolle nur eine sehr leichte Veränderung feststellen, die Zellen blieben auch über einen längeren Zeitraum im Verband und zeigten nur eine geringfügige Änderung der epithelialen Form (Abb. 12). Insgesamt war die Modulation der Zellgestalt durch die maximale Konzentration von S1P 10  $\mu$ M

im Vergleich mit TGF- $\beta$  2 ng/ml schwächer und verzögert, Veränderungen traten erst nach drei Tagen und eine deutliche Ausprägung nach fünf bis sieben Tagen auf.

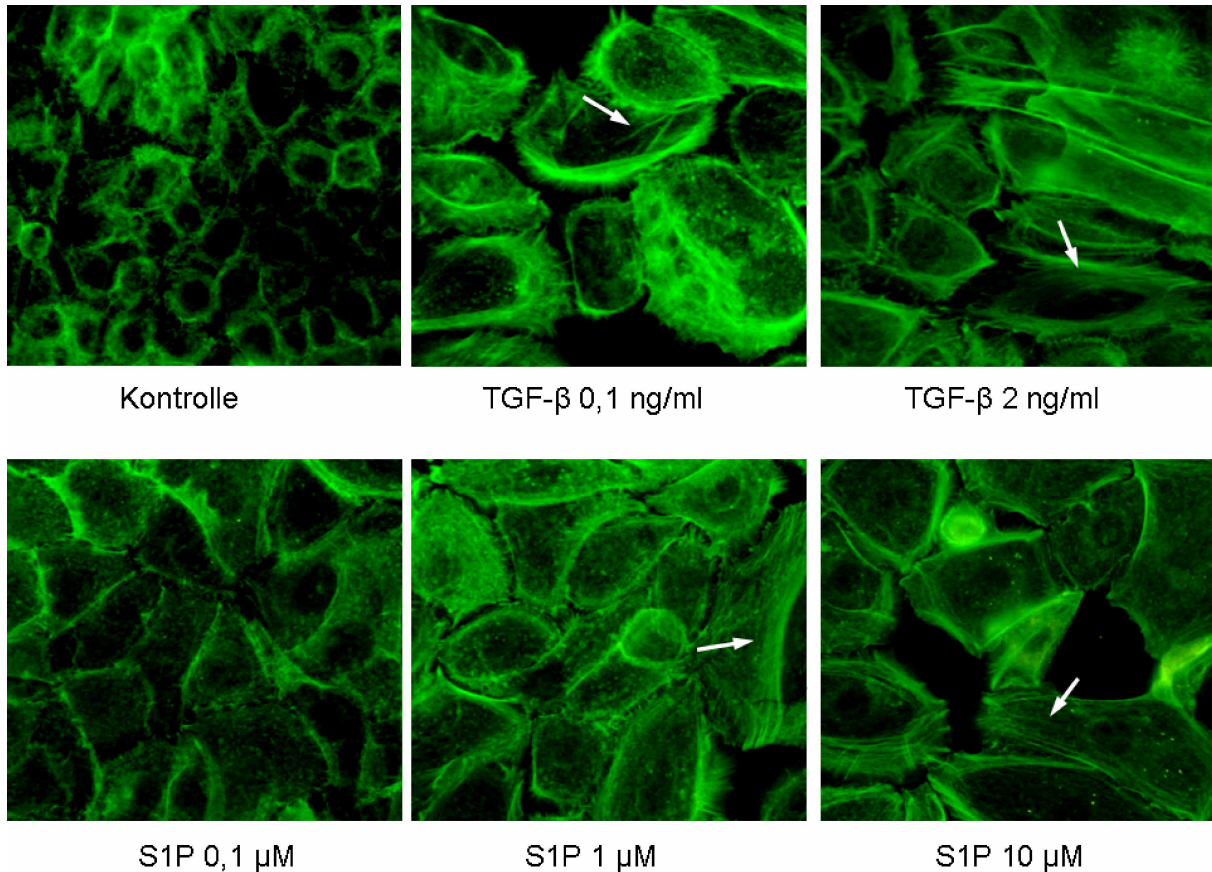


**Abb. 12:** Phänotypische Veränderung nach sechstägiger Stimulation mit S1P in den angegebenen Konzentrationen (obere Reihe: 100fache Vergrößerung; untere Reihe: 320fache Vergrößerung). Die Bilder sind charakteristisch für drei weitere Versuche.

### 3.1.3 Veränderung des Zytoskeletts durch TGF- $\beta$ und S1P

Nachdem erste Hinweise in Form des fibroblastoiden Phänotyps auf eine epitheliale-mesenchymale Transformation als Antwort auf Langzeitstimulation mit TGF- $\beta$  oder S1P hindeuteten, wurden die Keratinozyten auf weitere EMT-Merkmale geprüft. Die Ausbildung von Lamellopodien, Filopodien und Aktin-Stressfasern dient den Zellen zur Migration, deshalb wurde untersucht, ob sich das Aktin-Zytoskelett durch die Stimulation veränderte. Die Keratinozyten wurden auf Deckgläschen in Zwölflochplatten angezüchtet und nach 24 h mit TGF- $\beta$  oder S1P in verschiedenen Konzentrationen für drei bis fünf Tage stimuliert. Nach Fixierung mit einer 3,7 %igen Formaldehydlösung und Permeabilisierung mit einer 0,1 %igen Triton X-100-Lösung wurde das Aktin-Zytoskelett der Zellen mit Oregon Green 488 Phalloidin angefärbt.

Fluoreszenzmikroskopisch ließ sich nachweisen, dass es sowohl nach Stimulation mit TGF- $\beta$  0,1 ng/ml und 2 ng/ml als auch S1P in den Konzentrationen 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M zur deutlichen Ausbildung von Aktin-Stressfasern kam (Abb. 13).

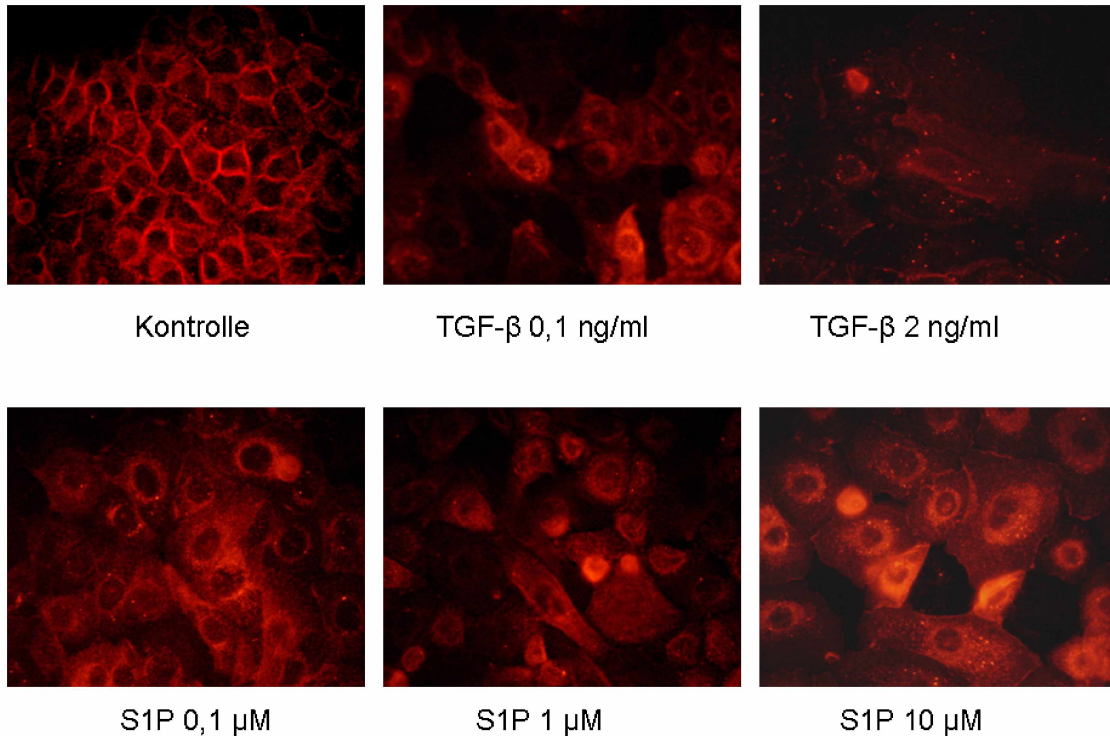


**Abb. 13:** *Fluoreszenzfärbung des Aktin-Zytoskeletts nach dreitägiger Stimulation mit TGF- $\beta$  oder S1P (400fache Vergrößerung). Die Pfeile zeigen die Aktinfasern. Die Bilder sind charakteristisch für zwei weitere Versuche.*

#### 3.1.4 Modulation von E-Cadherin durch TGF- $\beta$ und S1P

Ein wesentliches Merkmal der EMT ist die Repression des transmembranären E-Cadherins, das adhärenente Verbindungen bildet und damit den Erhalt des Zellverbands der Epithelschicht sichert (Angst et al., 2001). Durch indirekte Immunfluoreszenz wurde das Membranprotein detektiert. Nach 24 h Anwachsen auf Deckgläschen und drei bis fünf Tagen Stimulation wurden die Zellen mit 3,7 %iger Formaldehydlösung fixiert und mit 0,1 %iger Triton X-100-Lösung permeabilisiert. Daraufhin erfolgte eine halbstündige Inkubation mit dem Primärantikörper gegen

E-Cadherin und eine halbstündige Inkubation mit dem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper. Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop zeigten eine starke Fluoreszenz der Membran der Kontrollzellen, diese wurde durch Stimulation mit TGF- $\beta$  0,1 ng/ml und 2 ng/ml sowie S1P 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M deutlich gesenkt (Abb. 14).

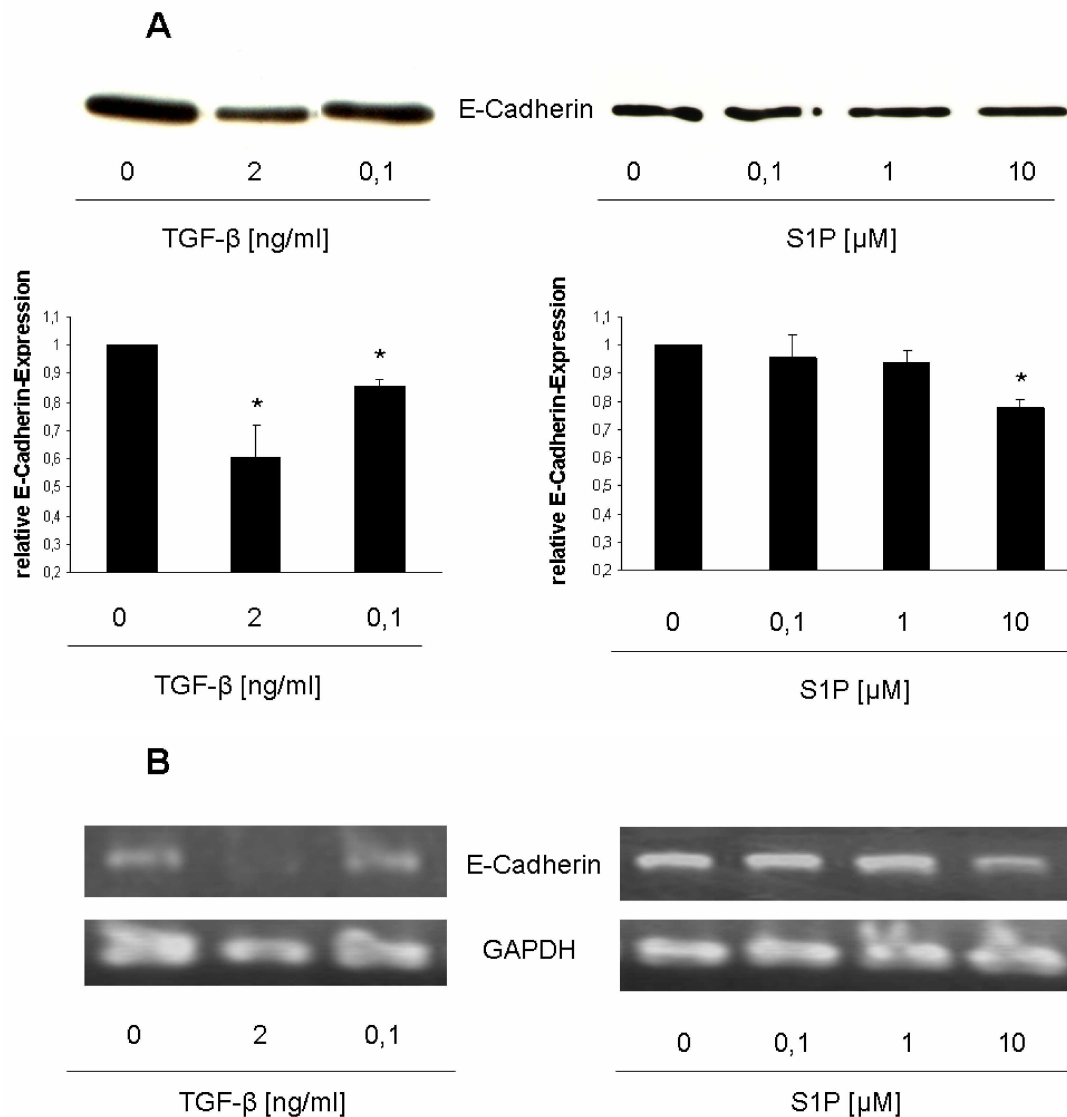


**Abb. 14:** *Indirekte Fluoreszenzfärbung von E-Cadherin nach dreitägiger Stimulation mit TGF- $\beta$  oder S1P (400fache Vergrößerung). Die Bilder sind charakteristisch für zwei weitere Versuche.*

Die Lösung der adhärenenten Verbindungen kann sowohl durch reduzierte Expression des E-Cadherins zustande kommen als auch nur durch seine Umverteilung von der Zellmembran in das Zytoplasma hinein. Dieser Unterschied ist relevant bei der Abgrenzung einer latenten, reversiblen gegen eine lang anhaltende, irreversible EMT (Grunert et al., 2003). Neben der Detektion des membrangebundenen E-Cadherins mittels Fluoreszenzmikroskopie sollte deshalb geprüft werden, ob sich der Gesamtgehalt des E-Cadherins in der Zelle ändert. So erfolgte die E-Cadherin-Bestimmung zusätzlich aus dem Zelllysate stimulierter Keratinozyten mittels Western Blot-Analytik. Es zeigte sich, dass es nach mehrtägiger Stimulation mit TGF- $\beta$  0,1 ng/ml und 2 ng/ml sowie S1P 10  $\mu$ M zu einer signifikanten Reduktion der E-Cadherin-Expression kam. Die Wirkung des Sphingolipids war allerdings schwächer als die des TGF- $\beta$  in der jeweiligen Höchstkonzentration, und durch beide

Stimulantien konnte E-Cadherin auch nur gesenkt, nicht aber vollständig eliminiert werden (Abb. 15A).

Daran schloss sich die Frage an, ob die Expression des Proteins schon durch Hemmung auf transkriptionaler Ebene reduziert wurde oder durch beispielsweise einen verstärkten Abbau zustande kam. Um das herauszufinden, wurden in Keratinozyten nach 12 h Stimulation mit TGF- $\beta$  oder S1P in verschiedenen Konzentrationen mRNA-Transkripte des E-Cadherins nachgewiesen. Die Isolation der mRNA erfolgte mit Hilfe des Aufreinigungskits QuickPrep und wurde durch Messung der UV-Absorption bei 260 nm quantifiziert, um in jedem Ansatz die gleiche Konzentration mRNA für die reverse Transkriptase einsetzen zu können. Die so erhaltene einzelsträngige cDNA wurde durch PCR mittels thermostabiler Polymerase und spezifischer Primersequenz für das E-Cadherin-Gen amplifiziert. Zur Kontrolle wurde die cDNA mit der Primersequenz für Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) amplifiziert, das als Haushaltsgen in allen Zellen unabhängig von der Stimulation exprimiert wird. So kann die Präparation intakter RNA und die erfolgreiche reverse Transkription nachgewiesen werden. Nach Auftrennung der Proben durch Elektrophorese konnten die DNA-Fragmente durch interkalierende Ethidiumbromid-Färbung und anschließende UV-Anregung detektiert werden. Es zeigte sich, dass sowohl durch TGF- $\beta$  als auch durch S1P die Transkription des E-Cadherins konzentrationsabhängig gehemmt wurde, analog zur Reduktion des Proteins (Abb. 15B).



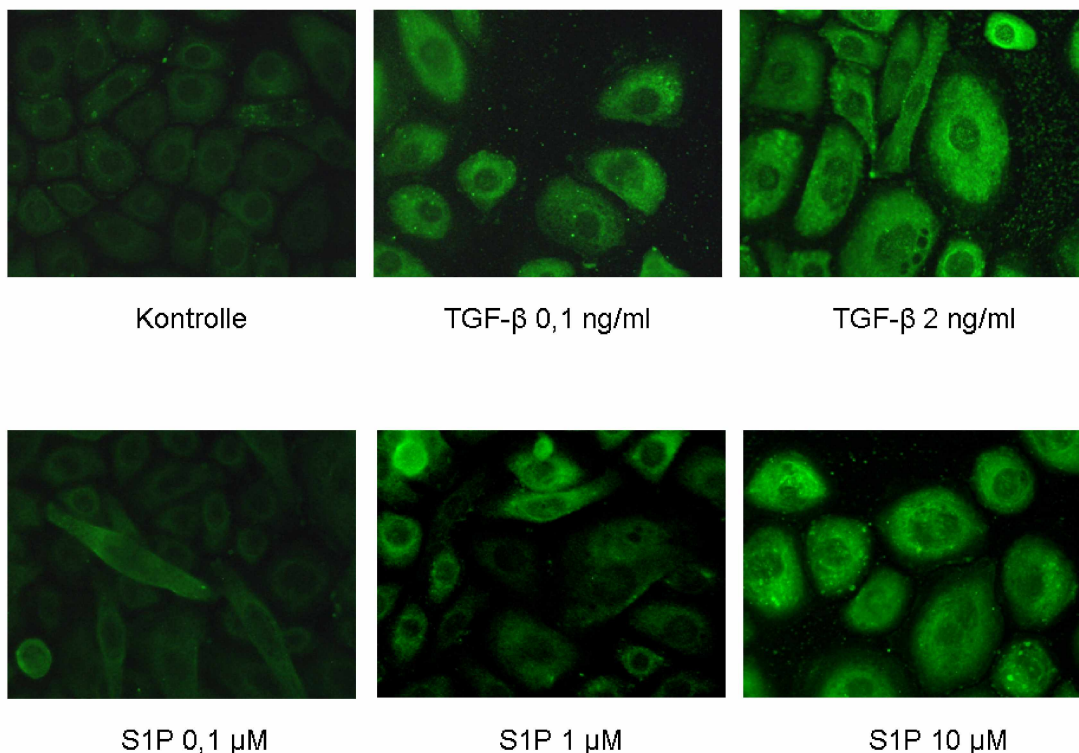
**Abb. 15:** Einfluss von TGF- $\beta$  und S1P auf die E-Cadherin-Expression. Humane Keratinozyten wurden sieben Tage stimuliert, mittels Western Blot wurde die Expression von E-Cadherin in den Zelllysaten detektiert und quantifiziert (bezogen auf die Kontrolle), die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD von drei Versuchen, \* $p \leq 0,05$  (A); oder die Stimulation erfolgte für 12 h, nach Isolation der mRNA wurde diese auf vorhandene Transkripte des E-Cadherin-Gens geprüft, als Kontrolle dienten Transkripte des Haushaltsgens GAPDH (B). Die Versuche wurden zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

### 3.1.5 Auswirkungen von TGF- $\beta$ und S1P auf die Bildung von $\alpha$ -SMA

Die Aktin-Isoform  $\alpha$ -SMA verleiht Zellen große Kontraktilität.  $\alpha$ -SMA wird beispielsweise von aktivierten Fibroblasten in hohem Ausmaß exprimiert und lässt sie eine



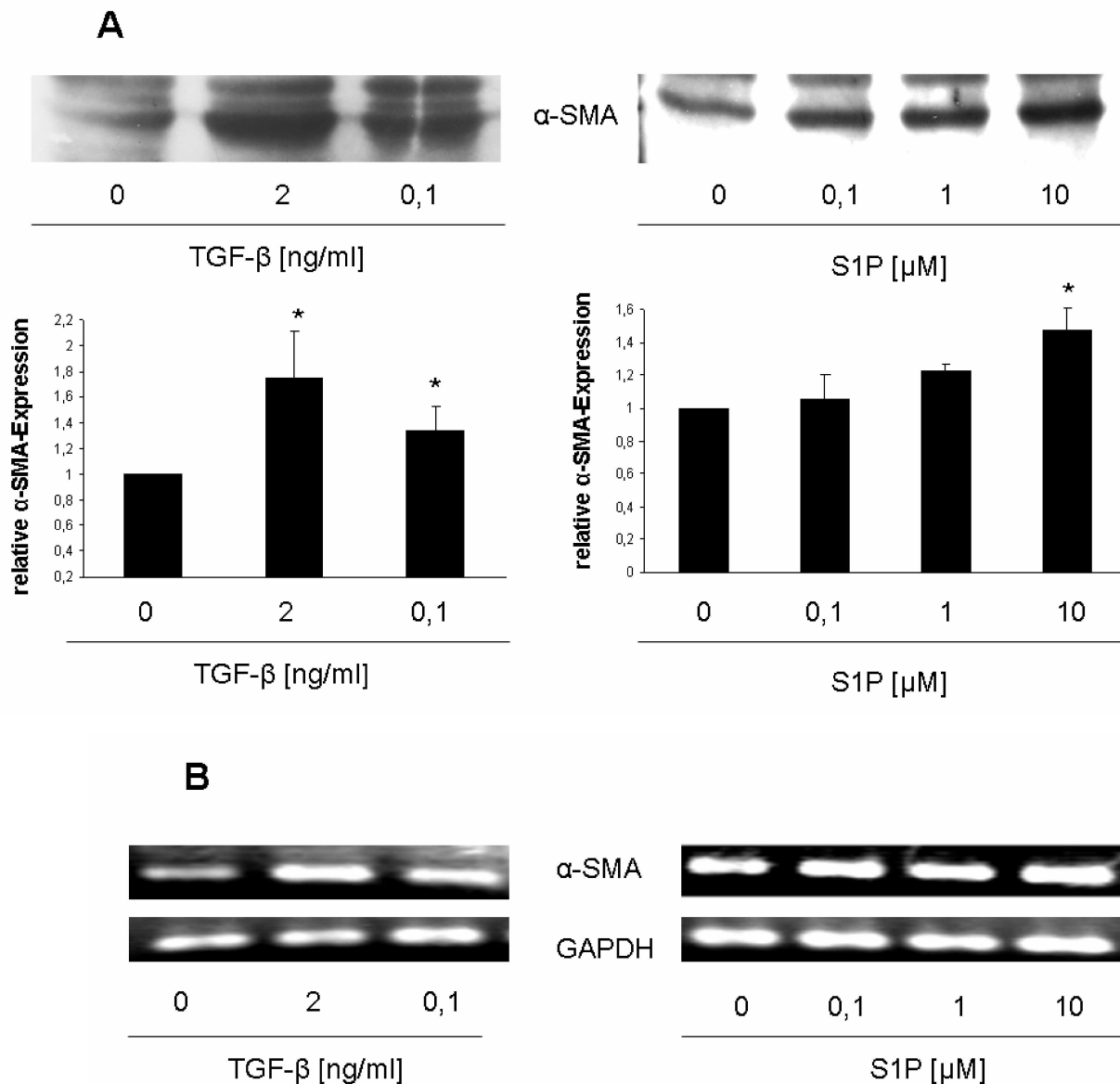
Zwischenstellung einnehmen zwischen normalen Fibroblasten und Glattmuskelzellen (Majno et al., 1971). Dies ist wünschenswert bei der Wundheilung, eine übermäßige Aktivierung kann allerdings auch zu Fibrosen führen. Während der EMT kommt es ebenfalls zur verstärkten Expression von  $\alpha$ -SMA durch die Epithelzellen. Deshalb war es von Interesse, die Auswirkung von TGF- $\beta$  und S1P auf diesen EMT-Marker in Keratinozyten zu testen. Die Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und nach 24 h Anwachsen drei bis fünf Tage stimuliert. 5 min Fixierung mit Methanol führte zur leichten Permeabilisierung der Zelle. Die Keratinozyten wurden zunächst 30 min mit einem Primärantikörper gegen  $\alpha$ -SMA inkubiert, darauf folgte die Behandlung mit einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper für 30 min. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass sowohl TGF- $\beta$  als auch S1P die  $\alpha$ -SMA-Expression steigerten. Niedrige Konzentrationen von TGF- $\beta$  und S1P führten zu einer leichten, TGF- $\beta$  2 ng/ml und S1P 10  $\mu$ M zu einer starken Zunahme der Fluoreszenz (Abb. 16).



**Abb. 16:** Indirekte Fluoreszenzfärbung zur Detektion von  $\alpha$ -SMA nach viertägiger Stimulation der Keratinozyten mit TGF- $\beta$  oder S1P (400fache Vergrößerung). Die Bilder sind charakteristisch für zwei weitere Versuche.

Zur Verifizierung der Ergebnisse wurde auch hier eine Western Blot-Analyse aus den Zelllysaten der Keratinozyten durchgeführt. Es zeigte sich, dass es durch beide Stimulantien zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Proteinexpression

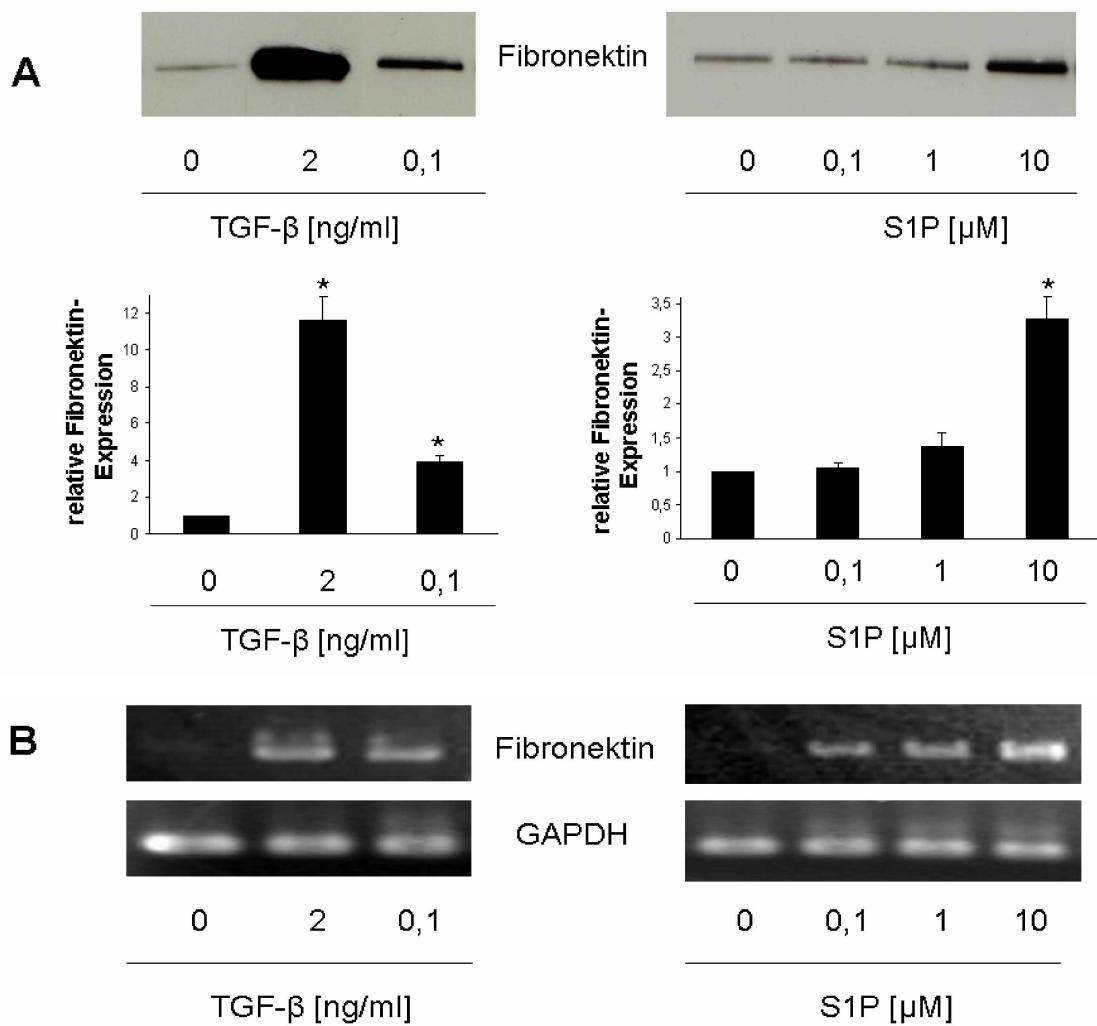
kam (Abb. 17A). Die Analyse der mRNA-Transkripte stimulierter Keratinozyten mittels PCR ergab, dass die Steigerung der  $\alpha$ -SMA-Expression durch eine vermehrte Transkription des  $\alpha$ -SMA-Gens zustande kam, da die Quantität der mittels spezifischer Primer erhaltenen DNA-Stränge durch Stimulation mit TGF- $\beta$  oder S1P erhöht wurde (Abb. 17B).



**Abb. 17:** *Detektion der  $\alpha$ -SMA-Expression in Keratinozyten mittels Western Blot aus dem Zelllysat nach viertägiger Stimulation und Quantifizierung bezogen auf die Kontrolle (die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD von drei Versuchen,  $p^* \leq 0,05$ , A) oder mittels PCR von isolierter RNA nach 12 h Stimulation (B) mit TGF- $\beta$  oder S1P in den angegebenen Konzentrationen. Die Versuche wurden zweimal wiederholt und zeigten vergleichbare Ergebnisse.*

### 3.1.6 Einfluss von TGF- $\beta$ und S1P auf Fibronektin

Fibronektin gehört zu den Proteinen der extrazellulären Matrix, die vorwiegend von migratorischen, mesenchymalen Zellen sekretiert werden. Fibronektin unterstützt die Fixierung der Zellen in der Matrix und veranlasst sie zu Migrationsprozessen (Magnusson and Mosher, 1998). Für TGF- $\beta$  ist die Induktion des Proteins aus der Nektin-Familie bekannt, sie wurde sowohl in mesenchymalen als auch in transformierten epithelialen Zellen nachgewiesen (Rhyu et al., 2005; Tsuchida et al., 2003). In vorhergehenden Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass S1P in Fibroblasten nach 12 h Stimulation die Fibronektin-Expression in mit Stimulation durch TGF- $\beta$  vergleichbarem Umfang steigert (Vogler et al., 2003). Von Interesse war es nun zu untersuchen, ob TGF- $\beta$  und S1P die Fibronektin-Sekretion auch in humanen primären Keratinozyten steigern. Hierzu wurden die Zellen drei bis sechs Tage stimuliert, lysiert und äquivalente Proteinmengen elektrophoretisch aufgetrennt. Fibronektin wurde dann mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Auf diese Weise wurde neben dem intrazellulären auch der membranassoziierten Proteinanteil, also auch das Fibronektin, das durch Bindung an transmembranäre Rezeptoren, hauptsächlich  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin, an die Zelle bindet, erfasst. TGF- $\beta$  2 ng/ml induzierte eine sehr starke Fibronektin-Expression. Dagegen war der Effekt durch S1P-Stimulation vergleichsweise schwach. Während S1P 10  $\mu$ M eine signifikante Steigerung der Fibronektin-Expression erzeugte, lagen die Gehalte des ECM-Proteins in Zellen, die mit S1P 0,1 und 1  $\mu$ M behandelt worden waren, nur leicht über Gehalten in Kontrollzellen (Abb. 18A). Auch hier wurde analysiert, ob die Änderung des Proteinstatus durch verstärkte Transkription des für Fibronektin kodierenden Gens zustande kam. Eine PCR mit spezifischen Primern zeigte, dass die Stimulation von humanen Keratinozyten die Bildung der Fibronektin-mRNA erhöhte und somit eine vermehrte Synthese des Proteins bewirkte (Abb. 18B).

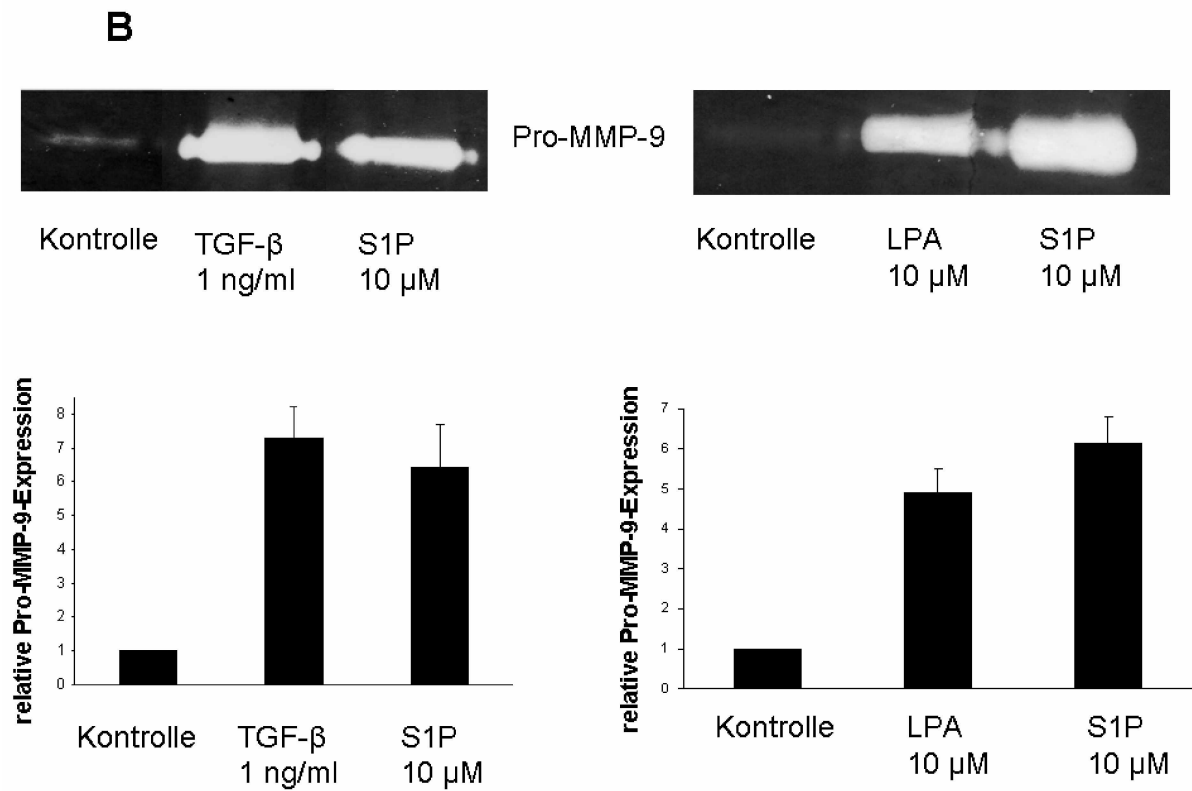
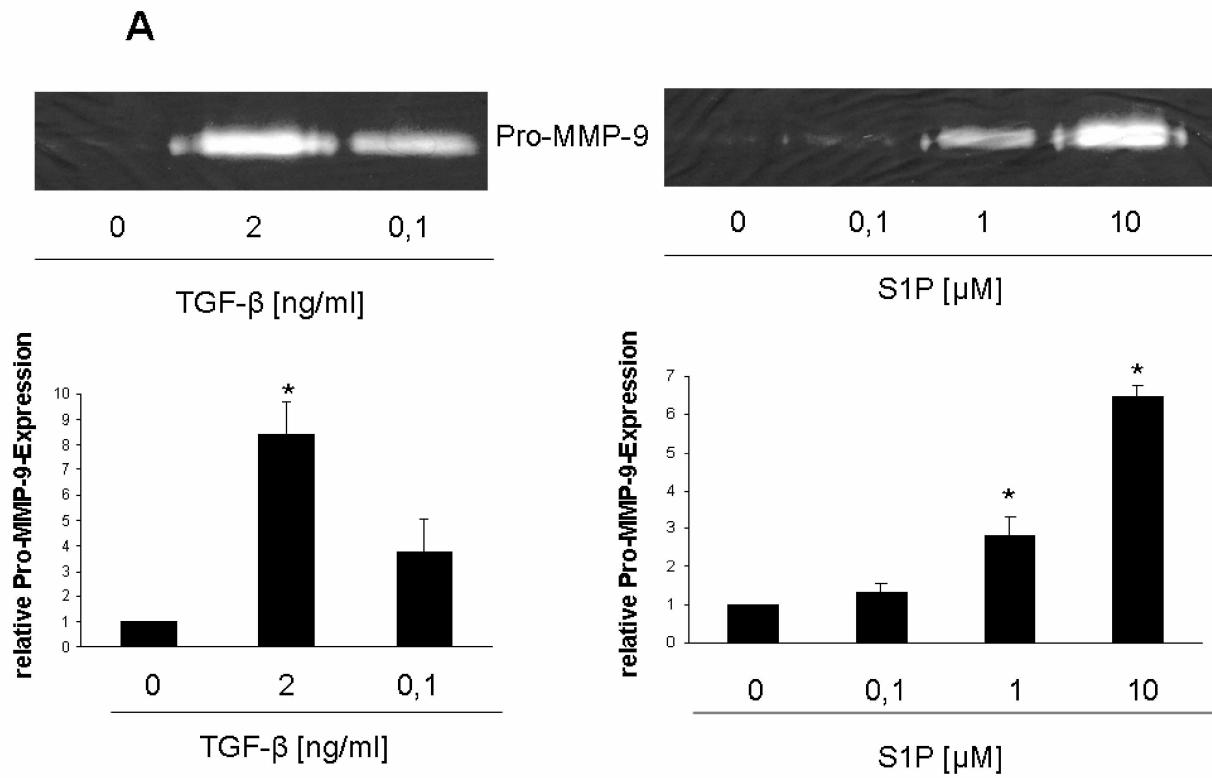


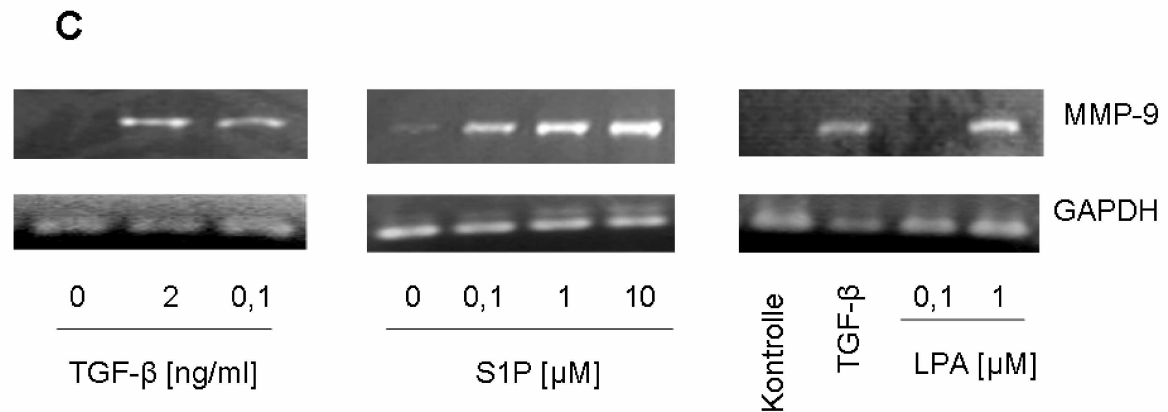
**Abb. 18:** Einfluss von TGF- $\beta$  und S1P auf die Synthese von Fibronectin. Humane Keratinozyten wurden sechs Tage stimuliert, mittels Western Blot wurde die Fibronectin-Expression analysiert und quantifiziert (bezogen auf die Kontrolle, die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD von drei Versuchen,  $*p \leq 0,05$ , A); oder die Keratinozyten wurden für 12 h stimuliert und mittels PCR die mRNA-Transkripte des Fibronectin-Gens detektiert (B). Die Versuche wurden zweimal wiederholt und lieferten vergleichbare Ergebnisse.

### 3.1.7 Regulation von Pro-MMP-2 und Pro-MMP-9 durch TGF- $\beta$ und LPL

Den Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 kommt während der EMT große Bedeutung zu. Sie werden von den transformierenden Zellen in verstärktem Maße synthetisiert und sekretiert um die ECM zu degradieren und den Zellen damit die Migration durch das Interstitium zu ermöglichen (Curran and Murray, 1999). Erhöhte

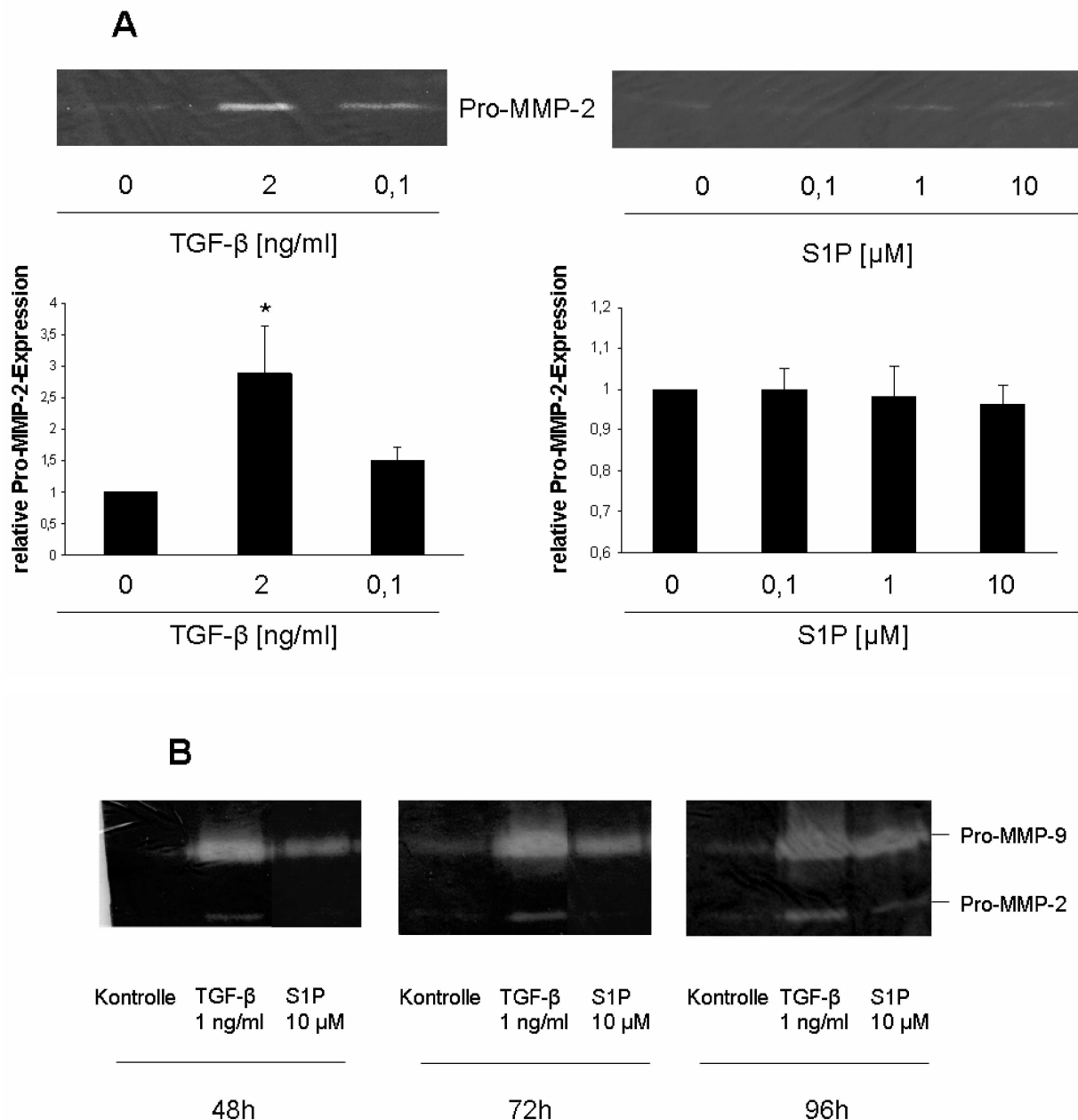
MMP-9-Spiegel korrelieren auch *in vivo* mit der Invasivität eines Tumors. Aufgrund dessen wurden die Matrixmetalloproteinasen als weiteres Charakteristikum für die EMT herangezogen. Nach Stimulation mit TGF- $\beta$ , S1P und LPA, die hinsichtlich einer Reihe von Effekten, z. B. Migration und Proliferation humaner Keratinozyten, ähnliche Eigenschaften wie S1P hat (Sauer et al., 2004b), wurden die von den Keratinozyten ins Medium sezernierten MMPs mittels Zymographie bestimmt. Dabei erfolgte zunächst die elektrophoretische Auftrennung der Medialiquots mit gelatinehaltigen Polyacrylamidgelen. Die Enzyme werden als Proform sezerniert und können durch Abspaltung eines N-terminalen Propeptids aktiviert werden. *In vivo* geschieht dies durch Proteasen, diese spalten latentes Pro-MMP-9 (92 kDa) in aktives MMP-9 (86 kDa) bzw. Pro-MMP-2 (72 kDa) in MMP-2 (62 kDa). Um bei der Zymographie auch die inaktiven Vorstufen detektieren zu können, wurden die Proben mit dem Detergens SDS in Kontakt gebracht, das die Proformen durch Konformationsänderung nicht-proteolytisch aktiviert. Während der Inkubation der Gele bei 37 °C für mindestens 12 h zersetzen die MMPs die inkorporierte Gelatine, bei nachfolgender Behandlung mit Coomassieblau bleibt dieser Teil des Gels ungefärbt. Die Identifizierung von Pro-MMP-2 und Pro-MMP-9 erfolgte anhand ihres Molekulargewichts, zusätzlich wurden kommerziell erworbene Proteinstandards mitaufgearbeitet. 24 - 48 h Stimulation mit TGF- $\beta$  2 ng/ml, S1P 1  $\mu$ M oder 10  $\mu$ M ließ die Pro-MMP-9-Spiegel signifikant ansteigen. Mit TGF- $\beta$  0,1 ng/ml wurde noch eine deutliche Sekretion erzielt, während S1P 0,1  $\mu$ M fast keinen Effekt mehr hatte (Abb. 19A). TGF- $\beta$  1 ng/ml, S1P 10  $\mu$ M und LPA 10  $\mu$ M zeigten vergleichbar starke Effekte (Abb. 19B). TGF- $\beta$  2 ng/ml konnte die Sekretion nicht wesentlich verstärken im Vergleich zu TGF- $\beta$  1 ng/ml (nicht gezeigt). Eine PCR-Analyse der mRNA mittels spezifischer Primer ergab, dass die Keratinozyten nach Stimulation mit TGF- $\beta$ , S1P und LPA konzentrationsabhängig einen erhöhten Gehalt an MMP-9-mRNA aufwiesen (Abb. 19C).





**Abb. 19:** Einfluss von TGF- $\beta$ , S1P und LPA auf die Synthese von Pro-MMP-9 humaner Keratinozyten. Nach 48 h Stimulation der Zellen wurde die Pro-MMP-9-Expression in Medienaliquots zymographisch detektiert und quantifiziert (bezogen auf die Kontrolle, die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD von drei Versuchen,  $*p \leq 0,05$ , A, B) oder die mRNA nach 12 h Stimulation mittels PCR auf MMP-9-Transkripte untersucht (C). Die Versuche wurden zweimal wiederholt und zeigten vergleichbare Ergebnisse.

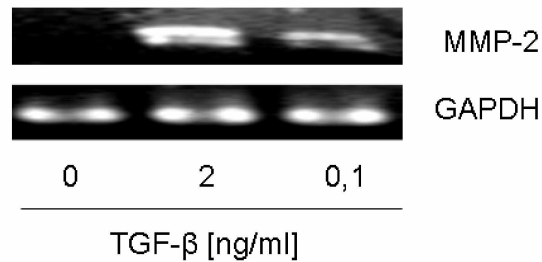
Im Gegensatz dazu kam es nach Stimulation mit TGF- $\beta$  2 ng/ml nur zu einer moderaten Erhöhung von Pro-MMP-2 im Medium. TGF- $\beta$  0,1 ng/ml zeigte nur einen sehr schwachen Effekt (Abb. 20A). Überraschenderweise hatte die Stimulation mit S1P keine Auswirkung auf die Pro-MMP-2-Sekretion, durch keine der getesteten Konzentrationen konnte der Pro-MMP-2-Gehalt im Medium erhöht werden (Abb. 20A). In Analogie zu S1P konnte die Pro-MMP-2-Sekretion auch durch Stimulation mit LPA nicht erhöht werden (nicht gezeigt). Eine längere Stimulationsdauer brachte diesbezüglich keine Veränderung. Während das durch TGF- $\beta$  ins Medium freigesetzte Pro-MMP-2 über einen Zeitraum von vier Tagen anstieg bzw. kumulierte, ebenso wie das durch TGF- $\beta$  oder S1P freigesetzte Pro-MMP-9, unterschied sich das Medium der mit S1P-behandelten Zellen hinsichtlich Pro-MMP-2 auch nach vier Tagen nicht von dem Medium der Kontrollzellen (Abb. 20B).



**Abb. 20:** Einfluss von TGF-β und S1P auf die Freisetzung des Pro-MMP-2 von humanen Keratinozyten ins Medium nach 48 h Stimulation in verschiedenen Konzentrationen (A) oder in fixen Konzentrationen über einen Zeitraum von 48 - 96 h im Vergleich zur Pro-MMP-9-Freisetzung (B). Die Detektion erfolgte zymographisch, die Quantifizierung wurde auf die jeweilige Kontrolle bezogen (die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD aus drei Versuchen, \* $p \leq 0,05$ ). Die Versuche wurden jeweils zweimal wiederholt und lieferten vergleichbare Ergebnisse.

Die PCR-Analyse ergab in diesem Fall, dass auch die Pro-MMP-2-Sekretion durch TGF-β auf mRNA-Ebene reguliert wurde, da in TGF-β-stimulierten Keratinozyten die MMP-2-Transkripte konzentrationsabhängig zunahm (Abb. 21).

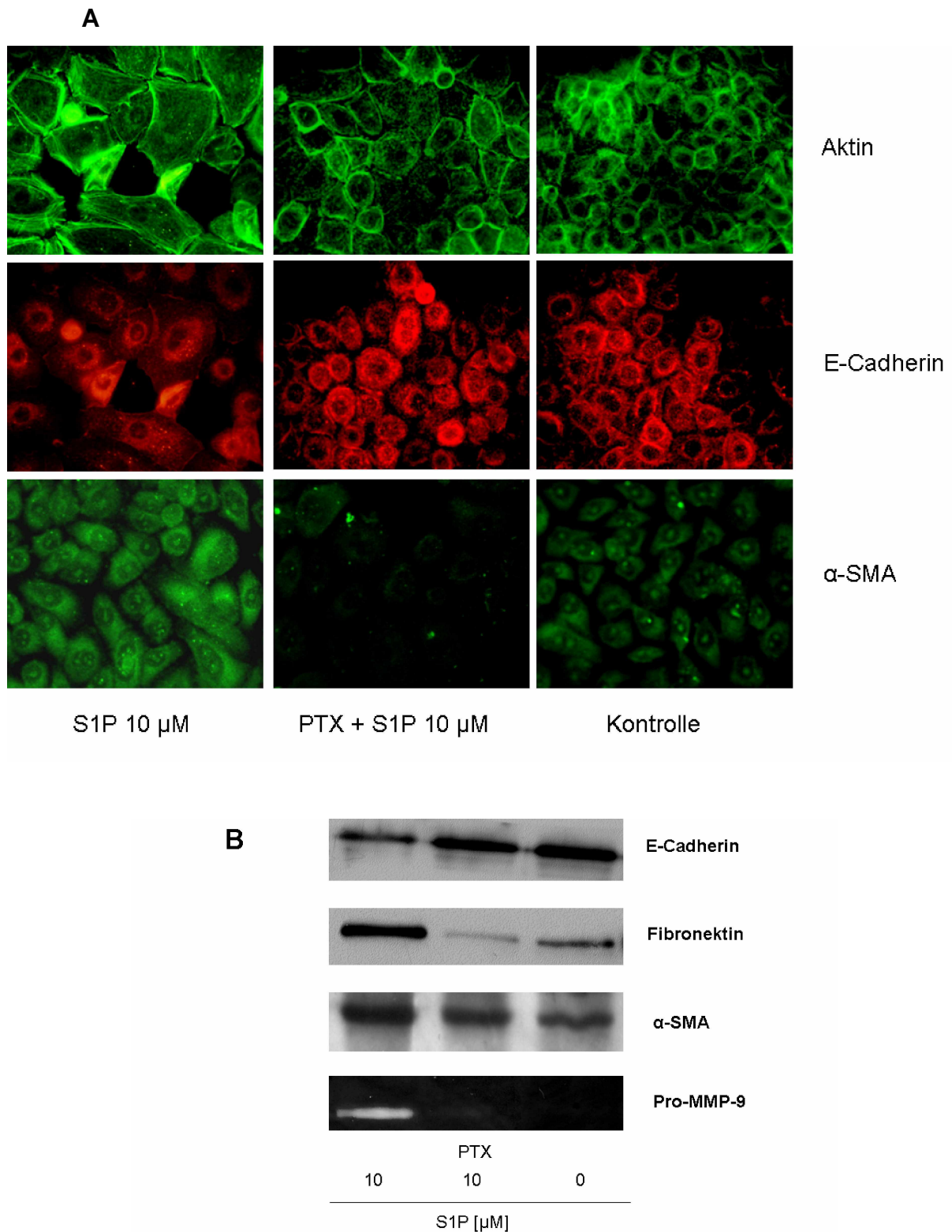




**Abb. 21:** Einfluss von TGF- $\beta$  auf die mRNA-Expression von MMP-2 in angegebenen Konzentrationen nach 12 h Stimulation. Der Versuch wurde zweimal wiederholt und lieferte vergleichbare Ergebnisse.

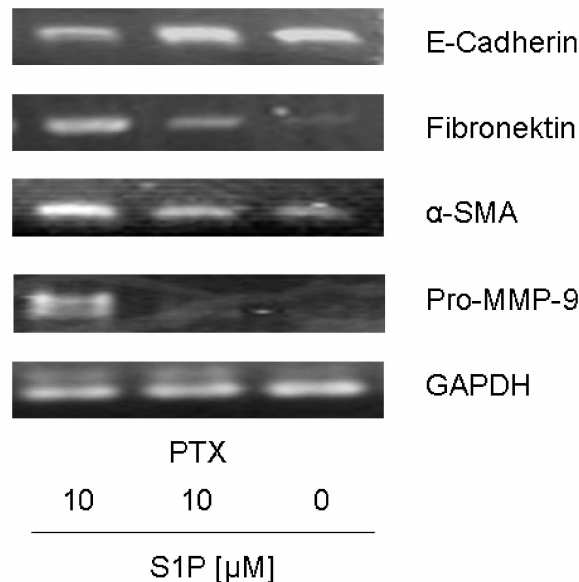
### 3.1.8 Beteiligung G<sub>i</sub>-gekoppelter Rezeptoren an der S1P-induzierten EMT

Die Wirkungen von S1P werden zum Teil über die membranständigen Rezeptoren, aber teilweise auch intrazellulär vermittelt (Spiegel and Milstien, 2003a). Es war daher von Interesse zu charakterisieren, auf welchem Weg S1P die EMT in Keratinozyten induziert. Um eine Beteiligung von S1P-Rezeptoren zu untersuchen, wurde die Expression der EMT-Marker in Gegenwart von PTX durchgeführt, das ADP an den G<sub>i/o</sub>-Untereinheiten der G-Proteine ribolysiert. Dadurch bleibt GDP gebunden, so dass keine intrazellulären Signalkaskaden aktiviert werden können (Murayama and Ui, 1983). Alle fünf S1P-Rezeptoren (deren mRNA in humanen Keratinozyten nachgewiesen wurde (Vogler et al., 2003) interagieren mit G<sub>i</sub>-Rezeptoren, S1P<sub>1</sub> sogar ausschließlich. Es zeigte sich, dass die untersuchten EMT-Marker extrazellulär durch S1P reguliert wurden. So konnte fluoreszenzmikroskopisch gezeigt werden, dass die Umstrukturierung des Aktinskeletts, die Repression des E-Cadherins in der Zellmembran und die verstärkte Expression von  $\alpha$ -SMA durch Vorinkubation mit PTX 200 ng/ml aufgehoben wurden (Abb. 22A). Mittels Western Blot und Zymographie wurde ebenfalls die PTX-Abhängigkeit der S1P-induzierten Modulation der EMT-Marker E-Cadherin,  $\alpha$ -SMA, Fibronectin und Pro-MMP-9 nachgewiesen, die Regulation der Marker ließ sich durch Vorinkubation mit PTX vollständig unterdrücken (Abb. 22B).



**Abb. 22:** Humane Keratinozyten wurden mit PTX 200 ng/ml 3 h vorinkubiert, daraufhin folgte die Stimulation mit S1P 10  $\mu$ M für fünf Tage. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde die Expression von Aktin, E-Cadherin und  $\alpha$ -SMA bestimmt (400fache Vergrößerung, A) sowie die Expression der angegebenen EMT-Marker durch Western Blot-Analytik bzw. Zymographie (B). Die Versuche wurden zweimal wiederholt und lieferten vergleichbare Ergebnisse.

Dieses Ergebnis wurde auf Transkriptionsebene verifiziert. Die Analyse der isolierten mRNA stimulierter Keratinozyten, die gegebenenfalls vorher mit PTX inkubiert worden waren, ergab, dass S1P die EMT-Marker E-Cadherin, Fibronektin,  $\alpha$ -SMA und Pro-MMP-9 auf Gen-Ebene durch membranständige Rezeptoren regulierte (Abb. 23).



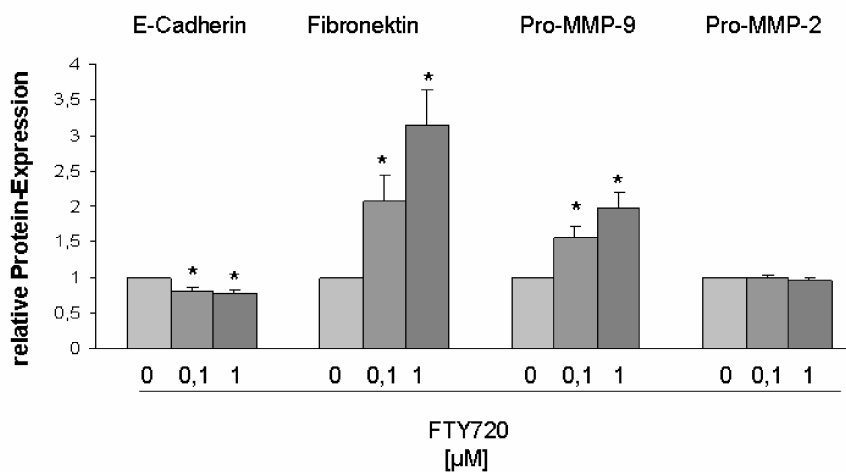
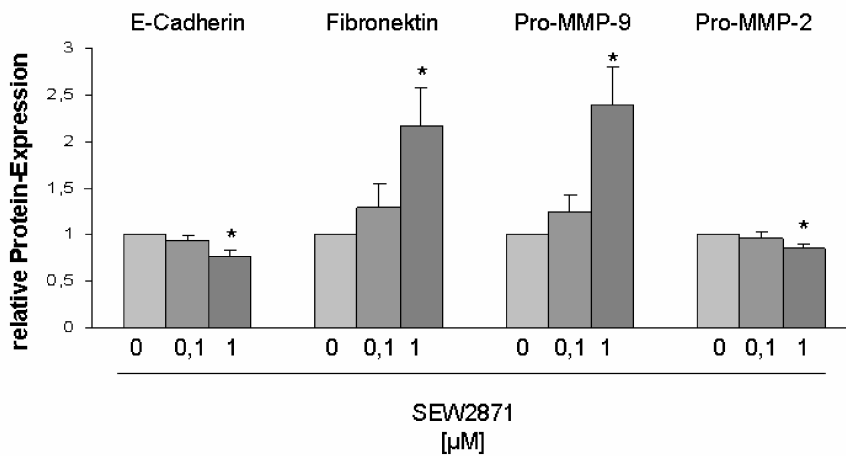
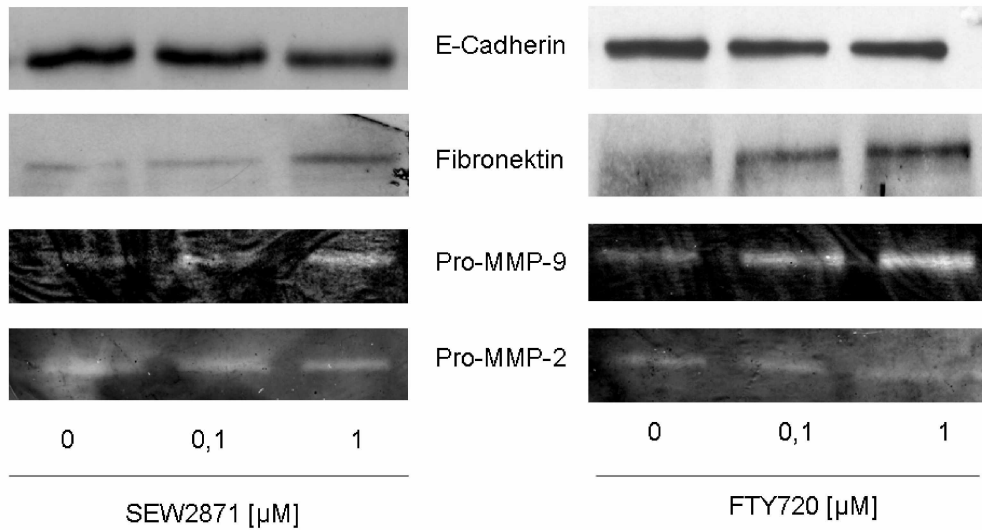
**Abb. 23:** mRNA-Expression der EMT-Marker-Gene nach 3 h Vorinkubation mit PTX 200 ng/ml und 12 h Stimulation mit S1P 10  $\mu$ M. Der Versuch wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

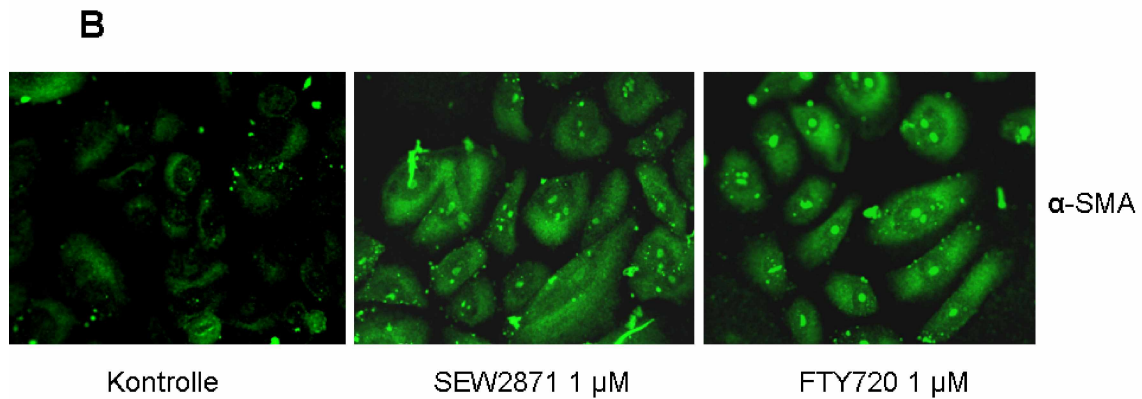
### 3.1.9 Effekte von SEW2871 und FTY720 auf die Keratinozyten

In einem weiteren Schritt sollte nun überprüft werden, welche S1P-Rezeptoren an der EMT in humanen Keratinozyten beteiligt sind. Hierzu wurden die Zellen mit den Rezeptoragonisten FTY720 und SEW2871 stimuliert. SEW2871 greift selektiv am S1P<sub>1</sub>-Rezeptor an (Jo et al., 2005). FTY720 wirkt dagegen nach Phosphorylierung an vier der fünf S1P-Rezeptoren agonistisch (S1P<sub>1; 3-5</sub>) (Brinkmann et al., 2002). Beide Substanzen konnten nur in den Konzentrationen 0,1  $\mu$ M und 1  $\mu$ M eingesetzt werden, da 10  $\mu$ M schon nach kurzer Zeit toxisch auf die Keratinozyten wirkte. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Behandlung mit FTY720 als auch mit SEW2871 die EMT-Marker moduliert. Während FTY720 in beiden Konzentrationen die E-Cadherin-Expression reduzierte sowie die Pro-MMP-9- und Fibronektin-Synthese steigerte, zeigte SEW2871 erst in Konzentration von 1  $\mu$ M einen Effekt. In

Analogie zu S1P wurde die Sekretion von Pro-MMP-2 durch keins der beiden Stimulantien gesteigert (Abb. 24A). Dagegen regten beide Agonisten in den Konzentrationen 1  $\mu\text{M}$  die Keratinozyten zur  $\alpha\text{-SMA}$ -Expression an (Abb. 24B).

**A**

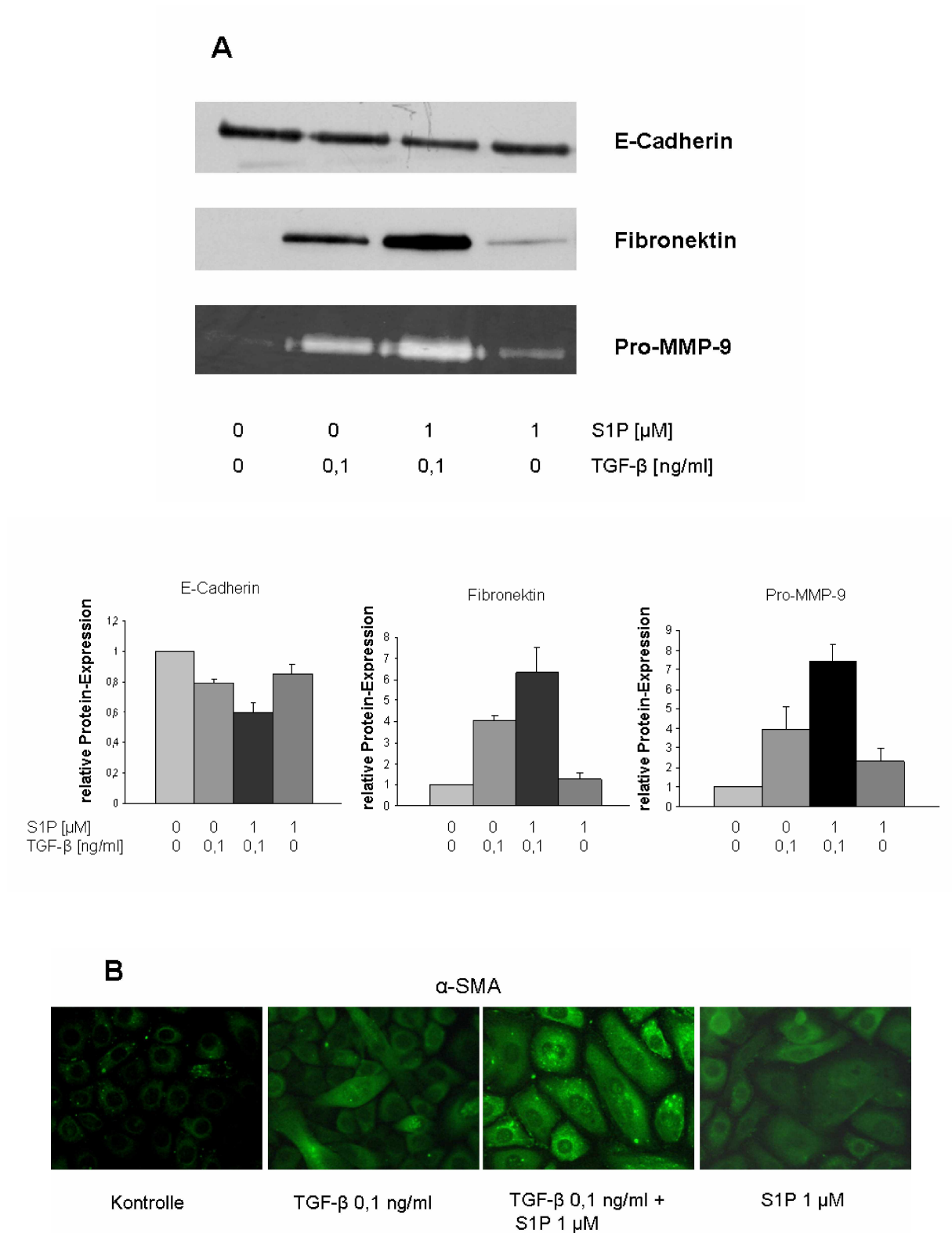




**Abb. 24:** Einfluss von SEW2871 und FTY720 nach fünftägiger Stimulation auf die Expression der EMT-Marker, bestimmt mittels Western Blot-Analytik bzw. Zymographie und quantifiziert bezogen auf die Kontrolle (die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD von drei Versuchen,  $*p \leq 0,05$ ; A) oder fluoreszenzmikroskopisch bestimmt (400fache Vergrößerung, B). Die Versuche wurden zweimal wiederholt und zeigten vergleichbare Ergebnisse.

### 3.1.10 Interaktion von S1P und TGF- $\beta$ bei Induktion der EMT

S1P hat, von der fehlenden Induktion des Pro-MMP-2 abgesehen, tendenziell den gleichen Einfluss auf den Prozess der EMT wie TGF- $\beta$ , wenn auch in einem schwächeren Ausmaß. Ähnlichkeiten zwischen S1P und TGF- $\beta$  konnten auch bei anderen Effekten auf humane Keratinozyten sowie im gemeinsamen Signalweg nachgewiesen werden, darüber hinaus wurde in unserer Arbeitsgruppe ein Crosstalk zwischen dem S1P<sub>1</sub>-Rezeptor und T $\beta$ RI gezeigt (Sauer et al., 2004a; Vogler et al., 2003). Um potentielle Wechselwirkungen zwischen S1P und TGF- $\beta$  bei der Induktion der EMT zu charakterisieren, wurde eine Kostimulation der Keratinozyten mit jeweils kleinen Konzentrationen von TGF- $\beta$  und S1P, die allein nur einen geringen Effekt auf die Modulation der EMT-Marker hatten, durchgeführt. Durch die Kombination von TGF- $\beta$  0,1 ng/ml und S1P 1  $\mu$ M ließ sich der Effekt auf die E-Cadherin-, Fibronektin- und Pro-MMP-9-Expression (Abb. 25A) sowie auf die Expression von  $\alpha$ -SMA (Abb. 25B) deutlich verstärken, verglichen mit dem Effekt durch Stimulation mit den einzelnen Substanzen.

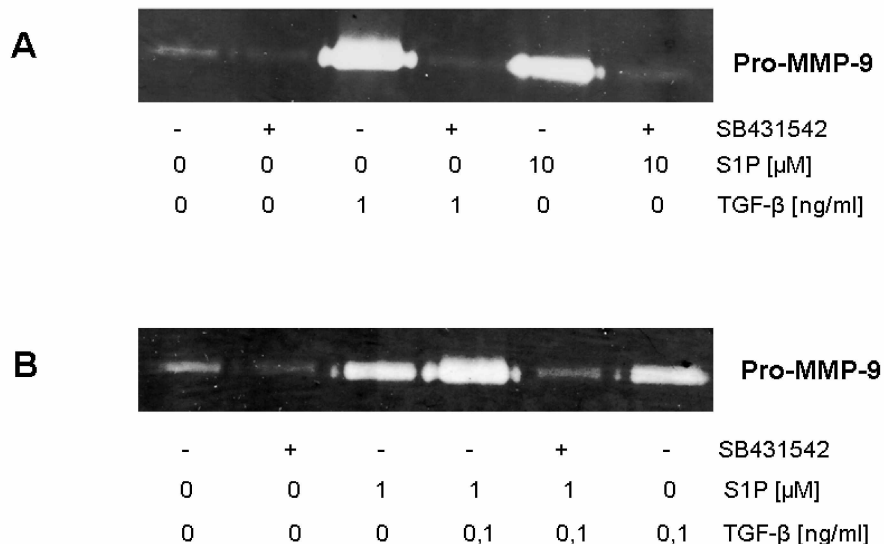


**Abb. 25:** Auswirkung der kombinierten Stimulation von TGF- $\beta$  und S1P auf die EMT-Marker über fünf Tage, ermittelt durch Western Blot-Analytik bzw. Zymographie (Quantifizierung erfolgte bezogen auf die Kontrolle, die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD von drei Versuchen, \* $p \leq 0,05$ ; A) oder Immunfluoreszenz (400fache Vergrößerung, B). Die

Versuche wurden jeweils zweimal wiederholt und zeigten vergleichbare Ergebnisse.

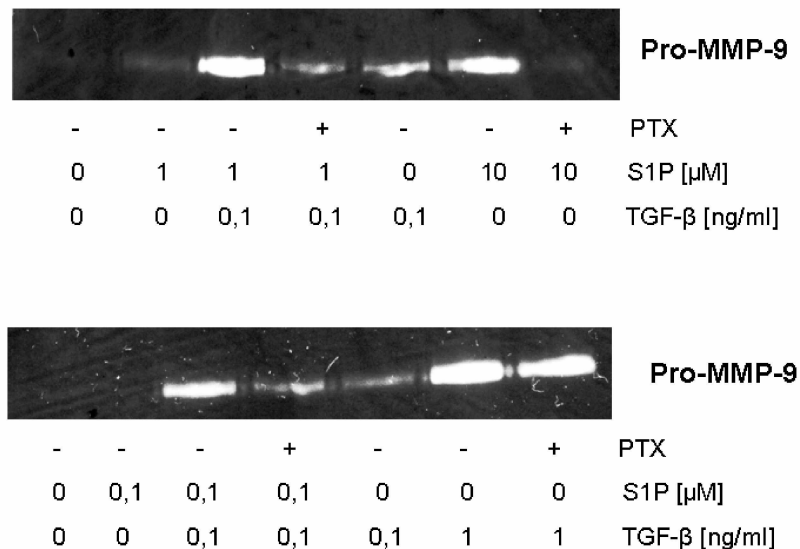
### 3.1.11 Rezeptorinteraktionen bei der Pro-MMP-9-Expression

Um die Beteiligung des T $\beta$ RI bei der S1P-induzierten Pro-MMP-9-Synthese zu überprüfen, wurden die Keratinozyten mit dem T $\beta$ RI-Kinase-Inhibitor SB431542 eine halbe Stunde inkubiert. SB431542 bindet mit hoher Selektivität an die ATP-Bindungsstelle von T $\beta$ RI/ALK5. Auch ALK4 und ALK7, die eine hohe Homologie zu ALK5 aufweisen, werden durch SB431542 in ihrer Kinase-Funktion gehemmt, nicht aber ALK2, ALK3 und ALK6. Ebenso werden ERK, JNK und die p38 MAPK durch den Inhibitor nicht beeinflusst (Inman et al., 2002; Laping et al., 2002). Tatsächlich kam es durch Einsatz von SB431542 7,5  $\mu$ M zu einer Reduktion der Pro-MMP-9-Expression auf Kontrollniveau sowohl nach Stimulation mit TGF- $\beta$  als auch mit S1P (Abb. 26A), auch der Effekt der Kostimulation wurde vollständig unterdrückt (Abb. 26B). Um auszuschließen, dass die Wirkung des Inhibitors durch Unspezifität infolge einer zu hoher Konzentration des Hemmstoffs zustande kam, wurde er auch in der Konzentration 2  $\mu$ M eingesetzt, dies führte zu den gleichen Ergebnissen.



**Abb. 26:** Beteiligung des T $\beta$ RI an der Induktion von Pro-MMP-9 durch TGF- $\beta$  oder S1P (A) sowie Kombination der Stimulantien (B), ermittelt durch Zymographie. Die Zellen wurden 30 min mit SB431542 7,5  $\mu$ M vorinkubiert und 48 h stimuliert. Der Versuch wurde zweimal wiederholt und lieferte vergleichbare Ergebnisse.

Hemmung der  $G_i$ -gekoppelten Rezeptoren mit PTX dagegen konnte zwar die S1P-induzierte, nicht aber die TGF- $\beta$ -induzierte Pro-MMP-9-Bildung inhibieren. Die Wirkung der Kostimulation wurde durch Vorbehandlung mit PTX ebenfalls nicht komplett unterdrückt, sondern auf das Ausmaß der TGF- $\beta$  0,1 ng/ml-induzierten Sekretion reduziert (Abb. 27).

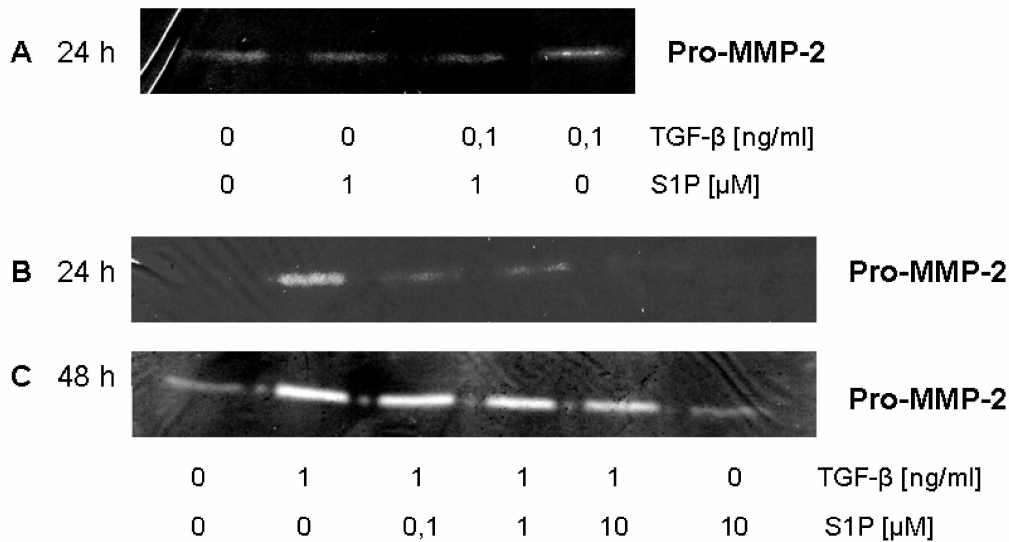


**Abb. 27:** *Beteiligung der  $G_i$ -gekoppelten Rezeptoren bei der Pro-MMP-9-Induktion durch TGF- $\beta$ , S1P sowie Kombination beider Stimulantien, ermittelt durch Zymographie. Die Zellen wurden 3 h mit PTX 200 ng/ml vorinkubiert und 24 h stimuliert. Der Versuch wurde zweimal wiederholt und lieferte vergleichbare Ergebnisse.*

### 3.1.12 Interaktion von S1P und TGF- $\beta$ bei der Pro-MMP-2-Regulation

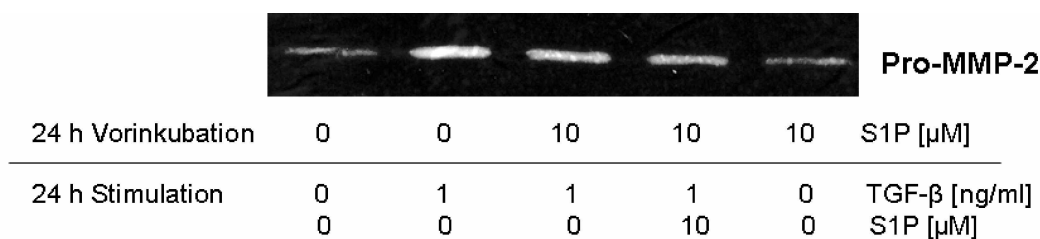
Wie schon beschrieben, erhöhte S1P im Gegensatz zu TGF- $\beta$  nicht die Freisetzung von Pro-MMP-2 ins Medium. Des Weiteren ließ sich bei der Kostimulation von TGF- $\beta$  0,1 ng/ml und S1P 1  $\mu$ M beobachten, dass die durch TGF- $\beta$  hervorgerufene Pro-MMP-2-Sekretion durch S1P abgeschwächt wurde (Abb. 28A). Um diesen gegenläufigen Effekt weiter zu untersuchen, der im Widerspruch zu dem häufig beobachteten Synergismus von TGF- $\beta$  und S1P steht, wurden die Keratinozyten mit höheren TGF- $\beta$ -Konzentrationen stimuliert, kombiniert mit variierenden S1P-Konzentrationen. Dabei zeigte sich, dass S1P die Pro-MMP-2-Sekretion nach 24 h und 48 h konzentrationsabhängig senkte (Abb. 28B und 28C).





**Abb. 28:** Einfluss von S1P 1  $\mu\text{M}$  auf die Pro-MMP-2-Sekretion durch TGF- $\beta$  0,1 ng/ml nach 24 h (A) sowie variierender S1P-Konzentrationen auf die Pro-MMP-2-Sekretion durch TGF- $\beta$  1 ng/ml nach 24 h (B) und 48 h (C). Die Versuche wurden zweimal wiederholt und zeigten vergleichbare Ergebnisse.

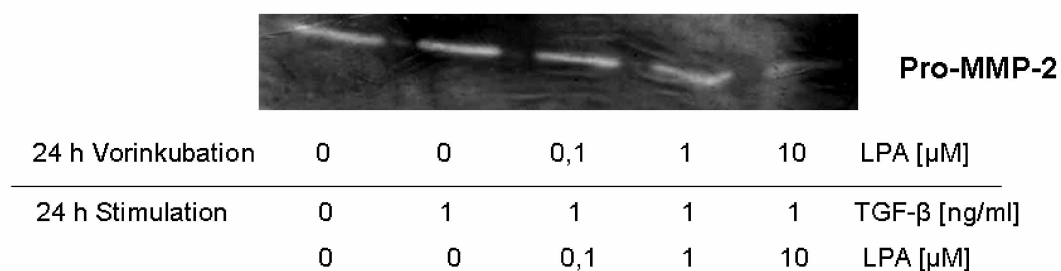
Um den hemmenden Effekt durch S1P zu verdeutlichen, wurde zunächst versucht, die durch TGF- $\beta$  sekretierte Menge an Pro-MMP-2 durch Kostimulation mit TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder Lipopolysacchariden zu erhöhen. Da dies keinen deutlichen Effekt zeigte, wurde getestet, ob sich der hemmende Einfluss von S1P durch Vorinkubation der Zellen mit S1P verstärken ließ. Tatsächlich reduzierte die Vorinkubation mit S1P für 24 h das durch nachfolgende TGF- $\beta$ -Stimulation sekretierte Pro-MMP-2 deutlich. Dieser Effekt konnte zusätzlich durch die Kombination von TGF- $\beta$  mit S1P intensiviert werden (Abb. 29).



**Abb. 29:** Effekt der Vorinkubation mit S1P. Die Keratinozyten wurden zunächst 24 h inkubiert, dann wurde das Medium gewechselt und die Keratinozyten erneut 24 h stimuliert. Aus diesem Medium erfolgte die Pro-MMP-2-Bestimmung mittels Zymographie. Der Versuch wurde zweimal mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt.

### 3.1.13 Interaktion von LPA und TGF- $\beta$ bei der Pro-MMP-2-Regulation

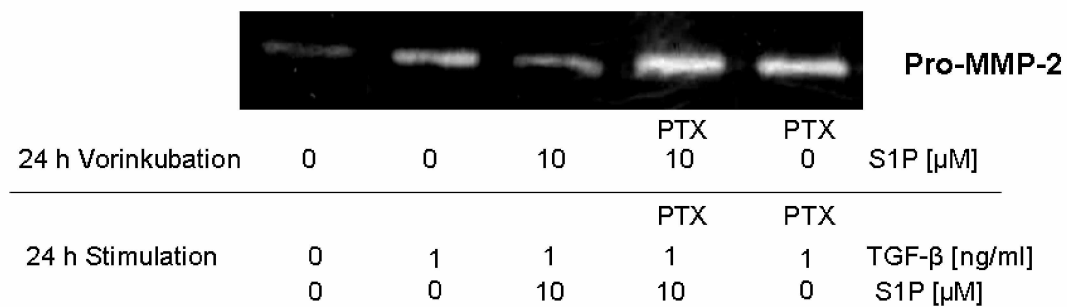
Auch durch LPA konnte die Sekretion von Pro-MMP-2 durch TGF- $\beta$  gemindert werden. Die Keratinozyten wurden mit LPA in verschiedenen Konzentrationen inkubiert, nach 24 h folgte dann die Stimulation mit TGF- $\beta$  1 ng/ml, kombiniert mit der vorhergegangenen LPA-Konzentration. In Analogie zu S1P war LPA 10  $\mu$ M die effizienteste Konzentration, aber auch mit LPA 1  $\mu$ M war noch ein Effekt erkennbar (Abb. 30).



**Abb. 30:** Wirkung von LPA auf die Pro-MMP-2-Sekretion durch TGF- $\beta$ . Die Keratinozyten wurden zunächst 24 h vorinkubiert, dann wurde das Medium gewechselt und die Keratinozyten erneut 24 h stimuliert. Aus diesem Medium erfolgte die Pro-MMP-2-Bestimmung mittels Zymographie. Das Zymogramm ist charakteristisch für zwei weitere Versuche.

### 3.1.14 Beteiligung G<sub>i</sub>-gekoppelter Rezeptoren an der Pro-MMP-2-Hemmung

Die Inhibition der Pro-MMP-2-Freisetzung durch S1P ließ sich durch Hemmung der G<sub>i</sub>-Proteine aufheben. Dazu wurden die Zellen zunächst 3 h mit PTX vorinkubiert, dann folgte die Zugabe von S1P 10  $\mu$ M. Nach 24 h wurden die Zellen erneut mit S1P 10  $\mu$ M und TGF- $\beta$  1 ng/ml stimuliert. PTX hatte allein keinen Einfluss auf die Pro-MMP-2-Synthese, weder auf die basale noch auf die TGF- $\beta$ -induzierte (Abb. 31). Der hemmende Effekt des S1P wird demzufolge über seine membranständigen Rezeptoren vermittelt.

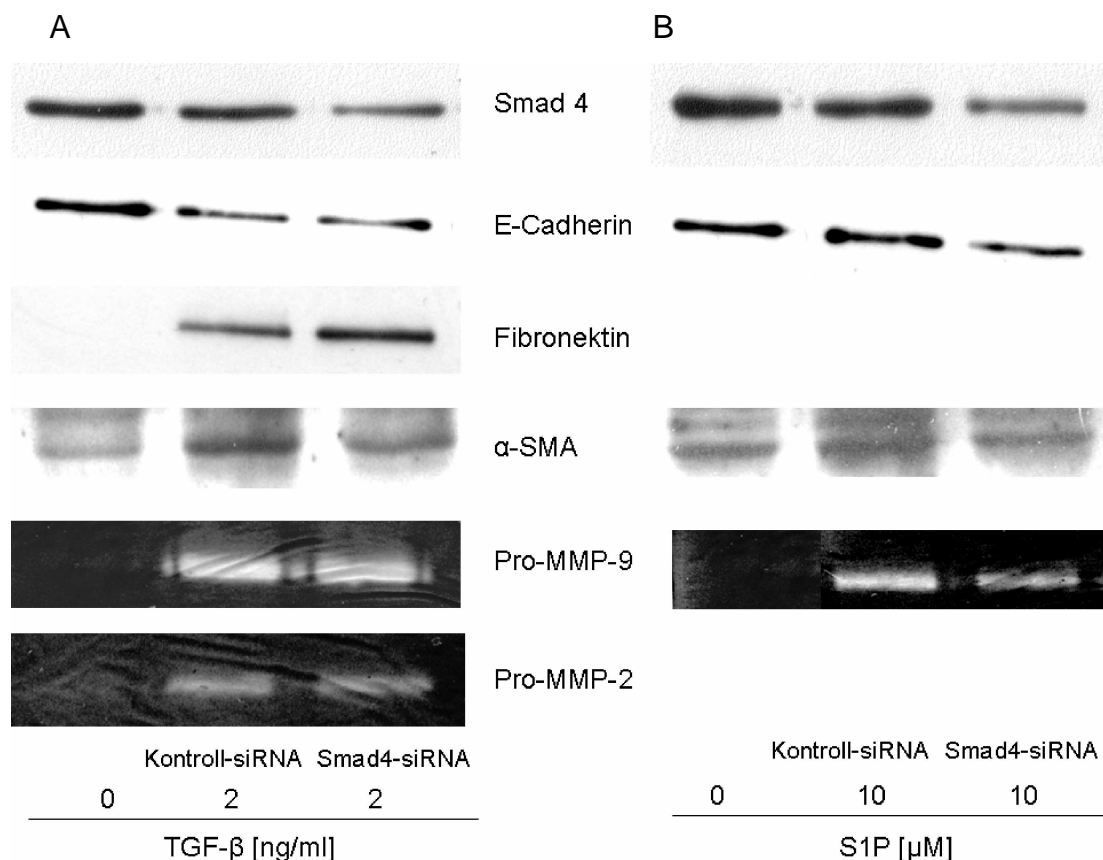


**Abb. 31:** Einfluss der mit PTX 200 ng/ml für 3 h auf die Interaktionen von S1P und TGF- $\beta$  bei der Pro-MMP-2-Sekretion, zymographisch ermittelt. Das Zymogramm ist charakteristisch für zwei weitere Versuche.

### 3.1.15 Relevanz des Smad-Signalwegs bei Modulation der EMT-Parameter

Die Signalwege, über die TGF- $\beta$  die EMT auslöst, sind vom zellulären Kontext abhängig und differieren stark. Bei der EMT wurde eine Beteiligung Smad-unabhängiger MAPK-Signalwege gefunden, häufig sind aber auch Smads involviert (Davies et al., 2005; Santibanez et al., 2003). Auch die Migration humaner Keratinozyten durch S1P erwies sich als Smad3-vermittelt (Sauer et al., 2004a). Um zu ermitteln, welche Bedeutung der Smad-Signalweg bei der EMT in humanen primären Keratinozyten hat, wurde Smad4 ausgeschaltet, das als Co-Smad sowohl mit Smad2 als auch mit Smad3 interagiert. Dies geschah mit spezifischer siRNA gegen Smad4. Kleine interferierende RNA-Moleküle werden seit 2001 in Säugerzellkulturen zur effizienten Ausschaltung von Zielgenen eingesetzt. Dabei sind sie potenter und langlebiger als beispielsweise Antisense-ODN sowie weniger toxisch und spezifischer durch Einsatz geringer Konzentrationen (Dorsett and Tuschl, 2004). Der Einsatz der siRNA ist bislang hauptsächlich in Zelllinien erprobt, die Transfektion der primären Keratinozyten gestaltete sich als schwierig. Da das vom Hersteller empfohlene Transfektionsreagenz toxisch auf die Keratinozyten wirkte, wurde stattdessen FuGENE 6 eingesetzt. Die Translation der Smad4-mRNA konnte durch siRNA-Konzentrationen von 25 - 50 nM effektiv gemindert werden. Um unspezifische Effekte durch die Smad4-siRNA auszuschließen, wurden Zellen mit Kontroll-siRNA transfiziert, einem Nukleotidduplex gleicher Größe mit zufälliger Sequenz, der selbst nicht zum Abbau einer bekannten zellulären mRNA führt. Nach

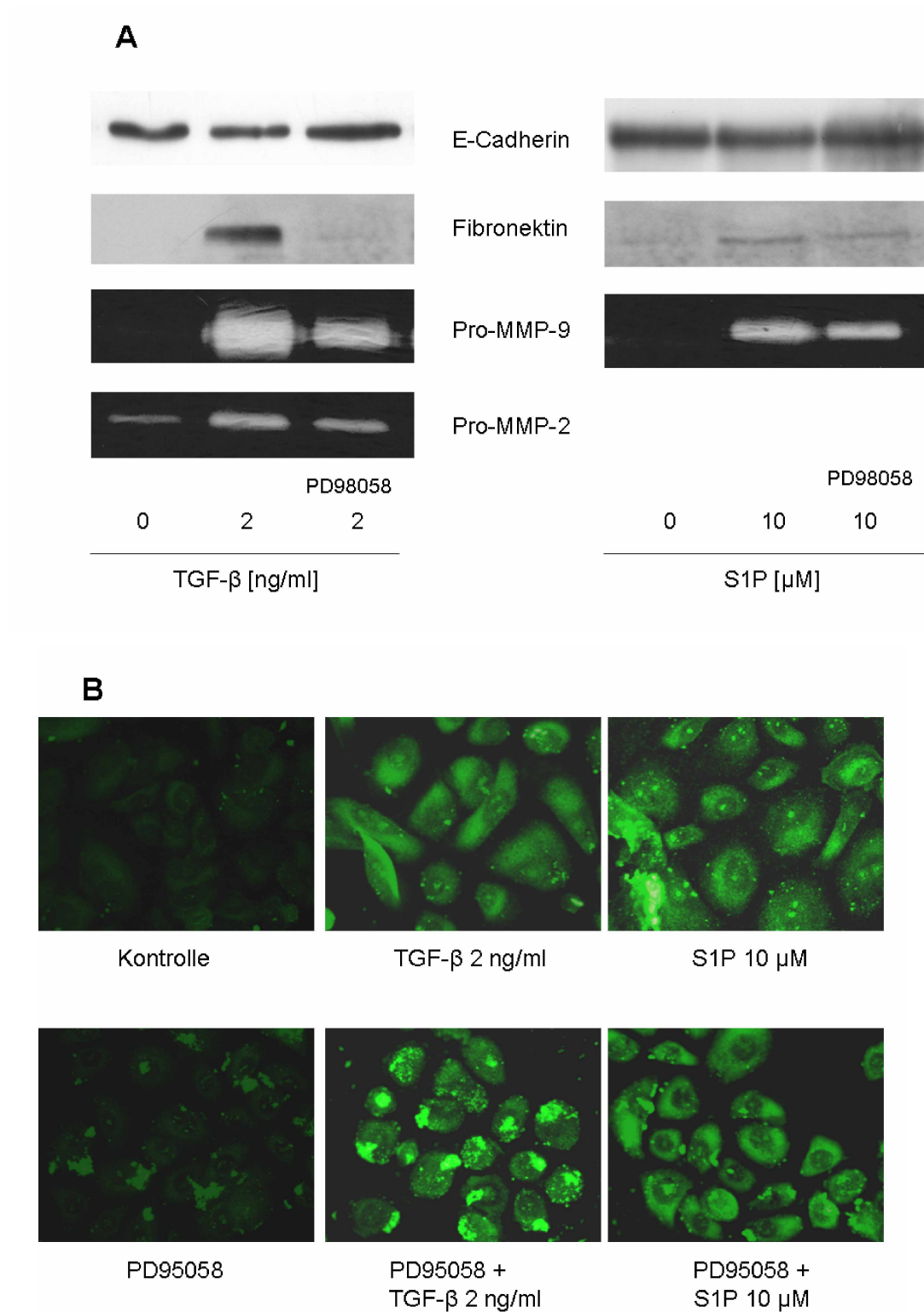
36 - 48 h Transfektion erfolgte die Stimulation der Zellen mit S1P 10  $\mu$ M oder TGF- $\beta$  2 ng/ml für vier bis sechs Tage. Die Keratinozyten waren durch die Transfektion allerdings leicht geschädigt, und die Protein-Expression war auch in den Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen schwächer als in untransfizierten Zellen. So ließ sich die Fibronektin-Bildung durch S1P, die auch in untransfizierten Zellen gering ist, in transfizierten Zellen gar nicht mehr induzieren. Western Blot-Analytik und Zymographie zeigten, dass Smad4 nur bei der Synthese des  $\alpha$ -SMA durch S1P und TGF- $\beta$  notwendig war. Die Modulation von E-Cadherin und Pro-MMP-9 als Reaktion auf die Stimulation mit TGF- $\beta$  oder S1P wurde durch die geminderte Expression von Smad4 dagegen nicht aufgehoben (Abb. 32). Ebenso konnte die verstärkte Fibronektin-Bildung durch TGF- $\beta$  mittels Smad4-Minderung nicht gesenkt werden. Die TGF- $\beta$ -induzierte Synthese von Pro-MMP-2 war in den Smad4-defizienten Zellen leicht gemindert, der Smad-Signalweg scheint hier also zumindest teilweise involviert zu sein (Abb. 32A).



**Abb. 32:** *Beteiligung von Smad4 bei der Expression der EMT-Marker, ermittelt durch Western Blot-Analytik bzw. Zymographie. Die Zellen wurden 36 h mit siRNA transfiziert und danach fünf Tage mit TGF- $\beta$  (A) oder S1P (B) stimuliert. Der Versuch wurde zweimal wiederholt und zeigte vergleichbare Ergebnisse.*

### 3.1.16 Bedeutung des MAPK-Signalwegs bei der Transformation in Keratinozyten

Da die Smads eine eher untergeordnete Rolle bei der EMT in den humanen Keratinozyten zu spielen schienen, wurde ein alternativer Signalweg untersucht. In einer Reihe von Zelllinien konnte die Beteiligung von MAPK, hauptsächlich ERK, bei der Auslösung von EMT durch TGF- $\beta$  nachgewiesen werden (Ellenrieder et al., 2001; Janda et al., 2002; Santibanez et al., 2003). Auch in HaCaTs wurde die Abhängigkeit verschiedener EMT-Parameter von ERK gezeigt (Zavadil et al., 2001). Der Ras/ERK-Signalweg wird durch Stimulation der S1P-Rezeptoren S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> oder S1P<sub>3</sub> aktiviert (Radeff-Huang et al., 2004) und stellt somit einen potentiellen Weg dar, über den die Transformation sowohl durch S1P als auch durch TGF- $\beta$  vermittelt werden könnte. In unserer Arbeitsgruppe wurde an Keratinozyten die Aktivierung der ERK nach Stimulation mit S1P gezeigt (Manggau, 2002). Um die Bedeutung der ERK bei der EMT zu ermitteln, wurden die Keratinozyten 2 h mit PD98059 50  $\mu$ M vorinkubiert. Dieser spezifische Inhibitor hemmt selektiv die ERK-Kinase und damit die nachgeschaltete ERK, nicht aber die verwandten Kinasen JNK und die p38 MAPK (Dudley et al., 1995). Die Inkubation vor der Langzeitstimulation mit TGF- $\beta$  oder S1P schützte die Keratinozyten vor der phänotypischen Transformation verglichen mit den Kontrollzellen. Weiterhin wurde die Repression des E-Cadherins durch TGF- $\beta$  2 ng/ml oder S1P 10  $\mu$ M aufgehoben und die Synthese des Fibronektins fast vollständig unterdrückt (Abb. 33A). Die Expression von Pro-MMP-2 und Pro-MMP-9, hervorgerufen durch TGF- $\beta$ , wurde deutlich gemindert, aber nicht komplett aufgehoben, hier schienen weitere Signalwege beteiligt zu sein. Gleiche Ergebnisse fanden sich für die S1P-induzierte MMP-9-Expression (Abb. 33A). Dagegen blieb die  $\alpha$ -SMA-Expression, gesteigert durch S1P oder TGF- $\beta$ , von der ERK-Inhibition unbeeinträchtigt, wie durch Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden konnte (Abb. 33B).



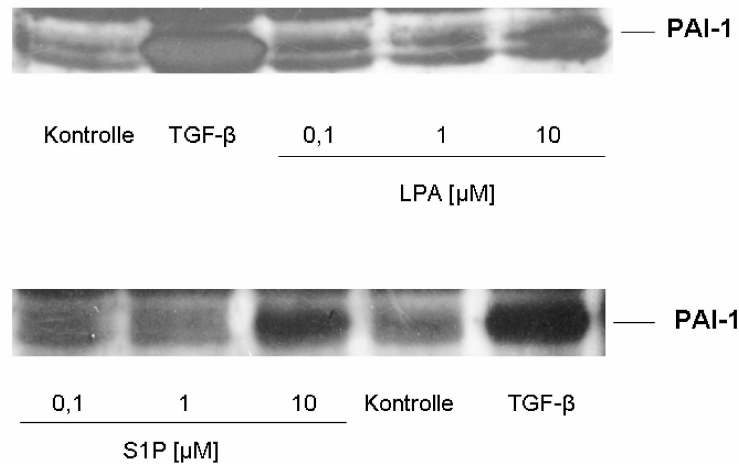
**Abb. 33:** Einfluss des ERK-Inhibitors PD98058. Nach 2 h Vorinkubation mit dem Inhibitor wurden die Zellen entweder mit S1P oder TGF-β fünf Tage in den angegebenen Konzentrationen stimuliert und mittels Western Blot-Analytik oder Zymographie die EMT-Marker getestet (A) oder nach drei Tagen Inkubation fluoreszenzmikroskopisch auf α-SMA-Expression untersucht (400fache Vergrößerung, B). Die Versuche wurden zweimal wiederholt und zeigten ähnliche Ergebnisse.

## 3.2 Einfluss von LPL auf humane dermale Fibroblasten

Mesenchymales Gewebe wird durch TGF- $\beta$  zur verstärkten Produktion von ECM-Proteinen angeregt und ist somit maßgeblich an physiologischen Prozessen wie der Wundheilung, aber auch an fibrotischen Prozessen beteiligt (Flanders, 2004; Roberts and Sporn, 1993). MMPs strukturieren die ECM um und ermöglichen durch spezifische Protein-Degradation Zellmigration und ECM-Invasion, darüber hinaus kann MMP-2 TGF- $\beta$  vom TGF- $\beta$ -LAP abspalten und damit aktivieren (Yu and Stamenkovic, 2000). Die Synthese von ECM-Proteinen wie Kollagen und Fibronectin durch die Fibroblasten und Sekretion in das Wundbett dient dem Aufbau von neuem Bindegewebe. Dem vermehrt sezernierten Plasminogenaktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) kommt dabei die Bedeutung zu, die Degradation der neu gebildeten Matrixproteine einzuschränken (Bajou et al., 2001). Wurde ausreichend Matrix angereichert, wird die ECM-Produktion eingestellt, bleibt diese Inhibition aus oder ist das Gewebe einer chronischen Verletzung ausgesetzt, kann eine pathologisch fortschreitende Fibrose entstehen (Flanders, 2004).

### 3.2.1 Einfluss von LPL auf die Bildung von PAI-1

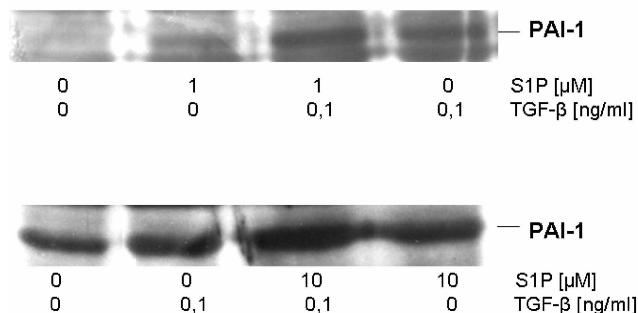
Ebenso wie TGF- $\beta$  steigerten S1P und LPA die PAI-1 Bildung in humanen Fibroblasten konzentrationsabhängig, wie mittels Western Blot-Analytik gezeigt werden konnte. Dabei wurde mit Konzentrationen von 10  $\mu$ M jeweils der größte Effekt erzielt, 1  $\mu$ M zeigte noch eine schwache Wirkung, während mit 0,1  $\mu$ M keine Unterschiede mehr zur Kontrolle nachweisbar waren. Im Vergleich zu TGF- $\beta$  war der Effekt allerdings auch bei den maximalen Konzentrationen von S1P und LPA deutlich schwächer (Abb. 34).



**Abb. 34:** *Effekt von S1P und LPA auf die PAI-1-Synthese in Fibroblasten. Diese wurden für 24 h mit den LPL in den angegebenen Konzentrationen oder TGF- $\beta$  1 ng/ml stimuliert. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und zeigte vergleichbare Ergebnisse.*

### 3.2.2 Wirkungsverstärkung von S1P durch Kombination mit TGF- $\beta$

Interessanterweise konnte die PAI-1-Expression durch S1P mittels Zugabe schon sehr geringer Konzentrationen von TGF- $\beta$ , die selber nur sehr schwach stimulierend wirkten, stark gesteigert werden. Durch Kombination von S1P 1  $\mu$ M oder 10  $\mu$ M mit TGF- $\beta$  0,1 ng/ml konnte eine deutliche Wirkungsverstärkung der PAI-1-Bildung erzielt werden (Abb. 35).

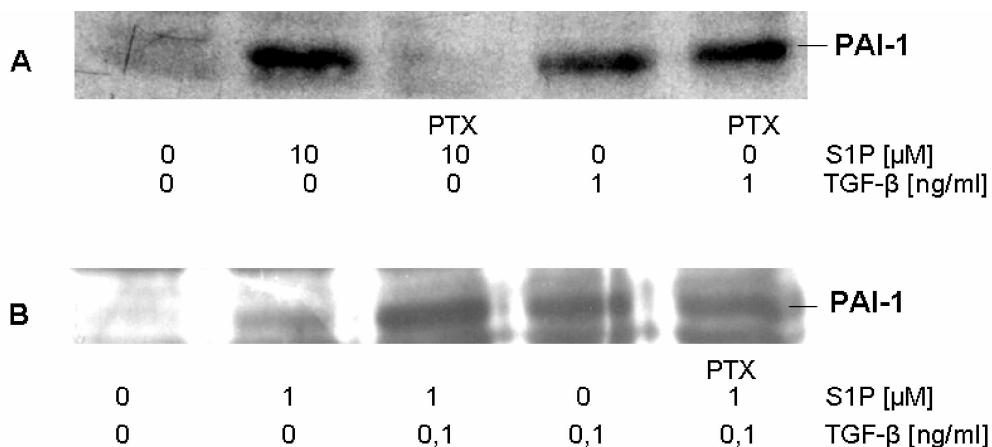


**Abb. 35:** *Effekt der kombinierten Stimulation von S1P und TGF- $\beta$  auf die Bildung von PAI-1 in humanen Fibroblasten. Diese wurden für 24 h mit den Stimulantien in den angegebenen Konzentrationen behandelt und die Zelllysate mittels Western Blot-Analytik auf PAI-1-Expression geprüft. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und zeigte vergleichbare Ergebnisse.*



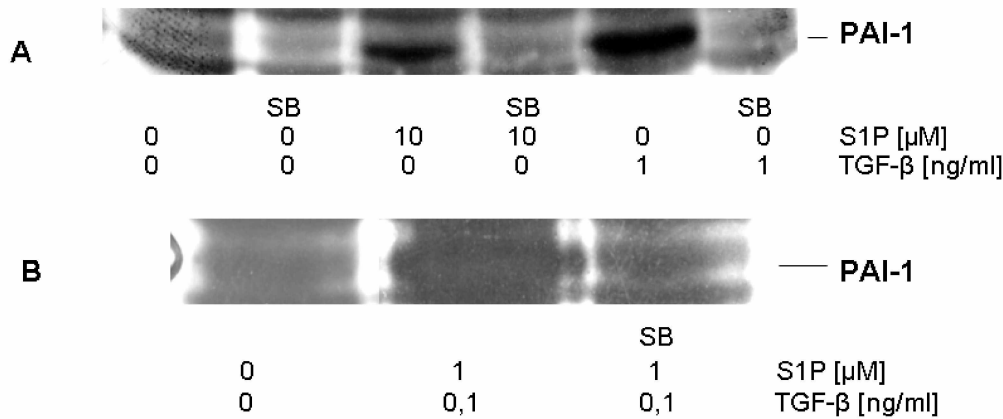
### 3.2.3 Beteiligung G<sub>i</sub>-gekoppelter Rezeptoren an der PAI-1-Bildung

Durch Hemmung der G<sub>i</sub>-gekoppelten Rezeptoren mittels Vorinkubation durch PTX 200 ng/ml ließ sich die PAI-1-Bildung der Fibroblasten nach Stimulation mit S1P, nicht aber nach Stimulation mit TGF- $\beta$  hemmen. Die durch Kostimulation hervorgerufene PAI-1-Bildung wurde infolge der Vorinkubation mit PTX ebenfalls auf das Ausmaß der TGF- $\beta$ -Komponente reduziert (Abb. 36).



**Abb. 36:** Einfluss von PTX auf die PAI-1-Bildung. Humane Fibroblasten wurden mit PTX 200 ng/ml 3 h vorinkubiert und mit S1P oder TGF- $\beta$  alleine (A) oder in Kombination (B) für 24 h stimuliert, mittels Western Blot wurden die Zelllysate analysiert. Der Versuch wurde zweimal wiederholt und zeigte vergleichbare Ergebnisse.

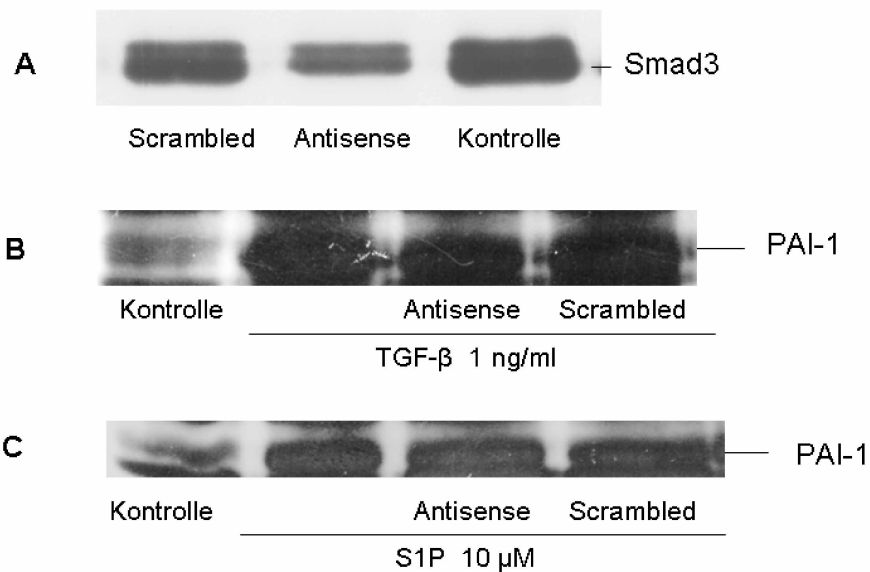
Auch der T $\beta$ RI wurde auf seine Beteiligung bei der PAI-1-Synthese untersucht. Interessanterweise erwies er sich dabei nicht nur für den durch TGF- $\beta$ -vermittelten Effekt, sondern auch für die Wirkung durch S1P als essentiell notwendig. So unterblieb die Expression von PAI-1, die durch Stimulation mit TGF- $\beta$ , S1P oder Kombination der beiden Stimulantien hervorgerufen wurde, nach Vorinkubation mit dem T $\beta$ RI-Inhibitor SB431542 (Abb. 37).



**Abb. 37:** Einfluss von SB431542 (SB) auf die PAI-1-Bildung. Humane Fibroblasten wurden mit SB431542 5  $\mu$ M 30 min vorinkubiert und mit S1P oder TGF- $\beta$  alleine (A) oder in Kombination (B) für 24 h stimuliert, die Zelllysate wurden mittels Western Blot-Analytik auf PAI-1 geprüft. Der Versuch wurde zweimal wiederholt und zeigte vergleichbare Ergebnisse.

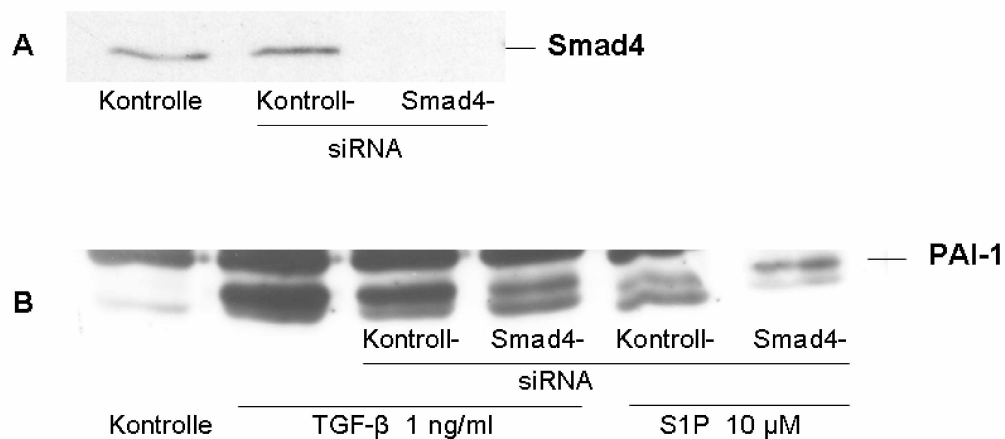
### 3.2.4 Bedeutung des Smad-Signalwegs an der Induktion von PAI-1

In der Literatur wurde die Abhängigkeit der PAI-1-Synthese durch TGF- $\beta$  von Smad3 beschrieben (Piek et al., 2001). Um herauszufinden, ob auch die PAI-1-Bildung durch S1P über diesen Mechanismus abläuft, wurden Antisense-ODN gegen Smad3 eingesetzt. Diese binden die mRNA spezifisch an der Translationsinitiationsstelle und inhibieren so die Proteinbildung. Transfektion der Fibroblasten mit 500 nM Antisense-ODN über vier Tage führte zu einer deutlichen Senkung des Smad3-Proteins, während die Behandlung mit Scrambled-ODN, die die gleichen Nukleotide in zufälliger Sequenz enthielten, keine Wirkung auf die Smad3-Expression zeigte (Abb. 38A). Das Transfektionsreagenz FuGENE 6 wirkte allerdings leicht schädigend auf die Zellen und die durch Stimulation hervorgerufene PAI-1-Bildung war in den transfizierten Zellen schwächer als in untransfizierten. TGF- $\beta$  konnte aber in den Scrambled-ODN-Zellen eine stärkere PAI-1-Produktion auslösen als in Zellen inkubiert mit Antisense-ODN (Abb. 38B). Die PAI-1-Bildung durch S1P war in den mit Antisense-ODN transfizierten Zellen nicht reduziert verglichen mit den Scrambled-ODN-transfizierten Zellen (Abb. 38C).



**Abb. 38:** *Beteiligung von Smad3 an der PAI-1-Expression, ermittelt durch Western Blot-Analytik. Die viertägige Vorbehandlung mit Smad3-Antisense-ODN 500 nM minderte die Smad3-Bildung in den Fibroblasten (A). Darauf folgten 24 h Stimulation mit TGF-β 1 ng/ml (B) oder S1P 10 μM (C). Mit Scrambled-ODN transfizierte Zellen und untransfizierte Zellen dienten als Kontrolle. Der Versuch wurde zweimal wiederholt und zeigte vergleichbare Ergebnisse.*

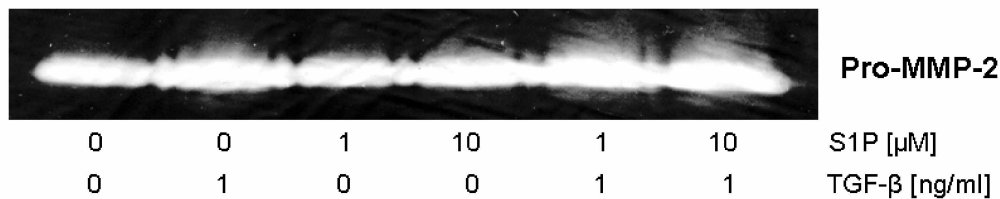
Zur Verifizierung wurden die Zellen mit spezifischer siRNA gegen das Co-Smad Smad4 inkubiert. Dies führte zu einer effizienten Senkung des Smad4-Proteins, während die Behandlung mit Kontroll-siRNA, einem Nukleotidduplex gleicher Größe mit zufälliger Sequenz, keine Auswirkung auf die Protein-Expression hatte (Abb. 39A). Die PAI-1-Expression war allerdings schon in den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen eingeschränkt im Gegensatz zu unbehandelten Zellen. Durch TGF-β als sehr potenten PAI-1-Induktor ließ sich die PAI-1-Bildung in den Kontroll-siRNA-Zellen immer noch deutlich erhöhen und im Gegensatz dazu in den Smad4-siRNA-Zellen senken (Abb. 39B), dies steht im Einklang mit der verminderten PAI-1-Synthese in Smad3-defizienten Fibroblasten. Die PAI-1-Bildung durch S1P war in den Smad4-siRNA-Zellen jedoch nicht reduziert im Vergleich zu den S1P-stimulierten Kontroll-siRNA-Zellen (Abb. 39B). Auch dies stimmt mit den in Smad3-defizienten Fibroblasten erzielten Ergebnissen überein.



**Abb. 39:** *Beteiligung des Co-Smads Smad4 an der PAI-1-Expression. Die Smad4-Bildung wurde durch zweitägige Transfektion mit Smad4-siRNA unterdrückt (A) und in den Zellen nach 12 h Stimulation mit TGF-β 1 ng/ml oder S1P 10 μM die PAI-1-Expression mittels Western Blot-Analytik detektiert. Als Positivkontrolle dienten untransfizierte Zellen, stimuliert mit TGF-β 1 ng/ml (B). Die Blots sind charakteristisch für zwei weitere Versuche.*

### 3.2.5 Einfluss von S1P auf die Synthese von Pro-MMP-2

Die Synthese der Matrixmetalloproteinase Pro-MMP-2 wurde in ähnlicher Weise beeinflusst wie PAI-1-Synthese. Mittels Zymographie konnte nachgewiesen werden, dass S1P die Pro-MMP-2-Bildung in der Konzentration 1 μM schwach, aber in der Konzentration 10 μM fast genauso stark steigerte wie TGF-β 1 ng/ml. Eine Wirkungsverstärkung konnte durch Kombination von S1P und TGF-β in jeweils schwachen Konzentrationen erzielt werden. Da die Grundsekretion von Pro-MMP-2 durch Fibroblasten allerdings schon relativ hoch war, erwies sich der Nachweis einer Sekretionssteigerung als schwierig (Abb. 40).



**Abb. 40:** Einfluss von S1P, allein oder in Kombination mit TGF-β 1 ng/ml, auf die Pro-MMP-2-Sekretion in humanen Fibroblasten, ermittelt durch Zymographie. Die Zellen wurden vier Tage stimuliert, TGF-β 1 ng/ml diente als Positivkontrolle. Das Zymogramm ist charakteristisch für drei weitere Versuche.

### 3.3 Untersuchungen zu S1P-Topika

#### 3.3.1 Herstellung von S1P-haltigen halbfesten Zubereitungen

Eine therapeutische Anwendung von S1P bei Hauterkrankungen scheint aufgrund vorangegangener *in vitro*-Versuche sinnvoll zu sein. So wirkt S1P in Fibroblasten proliferationsfördernd, außerdem hat es auf Keratinozyten, analog zu Vitamin D<sub>3</sub>, proliferationshemmende und differenzierungsfördernde Eigenschaften (Vogler et al., 2003). Die Zulassung von S1P als Therapeutikum bei der Psoriasis vulgaris ist deshalb angestrebt; derzeit befindet sich S1P in der präklinischen Testphase. Voraussetzung für eine topische Anwendung an der Haut ist die Überwindung mehrerer Schichten des Stratum Corneum mittels eines geeigneten Trägersystems. Für Sphingosin als Vorstufe des S1P hatten sich in Penetrationsuntersuchungen feste Lipidnanopartikel (solid lipid nanoparticles, SLN) und Nanoemulsionen als geeignete Träger erwiesen, den inkorporierten Wirkstoff in Hauttiefen bis zu 500 μM einzubringen (Ruwisch, 2002). SLN bestehen aus einer festen Lipidmatrix, mit der der Arzneistoff assoziiert ist; sie liegen, stabilisiert durch ein Tensid, dispergiert in einer wässrigen Lösung vor. Es sollte nun ein stabiles Trägersystem mit erleichterter Wirkstoffpenetration für S1P gefunden werden. Dazu wurde zunächst ein Lipidscreening zur Löslichkeit von S1P in der Lipidphase durchgeführt. Die insgesamt sechs getesteten Lipide Compritol, Miglyol, Precirol, Imwitor, Monosteol

und Geleol wurden jeweils mit S1P im Wasserbad bei 95°C erhitzt, dabei konnte S1P nur in Compritol, Imwitor oder Geleol gelöst werden (Tab. 3). Im Gegensatz zu Sphingosin war S1P nur schlecht lipidlöslich, der Lipidanteil der SLN wurde daher mit 12,5 % hoch angesetzt.

**Tab. 3:** Lipidlöslichkeit von S1P (0,4 % S1P mit 99,6 % Lipid)

Lipid	Löslichkeit S1P bei 95° C
Compritol	löslich, aber Rekristallisation bei RT
Geleol	löslich
Imwitor	löslich
Monosteol	nicht löslich
Miglyol	nicht löslich
Precirol	nicht löslich

Die SLN-Zubereitungen mit 0,05 % S1P waren dennoch nicht stabil. Wurden Imwitor oder Geleol als Grundlage gewählt, traten bereits nach einem Tag makroskopisch erkennbare Fettaggregate auf. Zubereitungen mit Compritol zeigten zwar makroskopisch keine Ausfällungen, lichtmikroskopisch waren aber Kristallnadeln des Wirkstoffs zu erkennen. Um die Einbettung des Sphingolipids in die Lipidphase zu verbessern, wurde daher neben dem für SLN üblichen Herstellungsverfahren auch ein Ansatz gewählt, bei dem das S1P zunächst in einer NaOH-Lösung (10 mM) gelöst wurde. Diese diente nach Zusatz des Emulgators Poloxamer 188 als wässrige Phase bei der SLN-Produktion, als Lipidphase wurde Compritol gewählt. S1P löste sich bei ca. 85 °C in NaOH-Lösung (10 mM). Folgende Rezeptur wurde hergestellt:

<b>S1P</b>	<b>0,05 %</b>
<b>Poloxamer 188</b>	<b>2,50 %</b>
<b>Compritol</b>	<b>12,50 %</b>
<b>NaOH (10 mM)</b>	<b>ad 100 %</b>

Makroskopisch wie auch mikroskopisch konnten keine Unterschiede zur ebenfalls hergestellten wirkstofffreien Zubereitung entdeckt werden. Da innerhalb des Beobachtungszeitraums in den SLN keine Kristalle zu erkennen waren, S1P aus einer 0,05 %igen NaOH-Lösung (10 mM) mit Zusatz von 2,5 % Poloxamer 188 beim

Abkühlen aber sofort auskristallisierte, wurde angenommen, dass sich das Sphingolipid aufgrund seiner amphiphilen Struktur in der Grenzphase der Partikel angereichert hat. Dies muss in weitergehenden Arbeiten durch physikalische Methoden wie der Raman-Spektroskopie nachgewiesen werden. Als problematisch ist der hohe pH-Wert des Trägersystems anzusehen, der bei 8 - 9 lag.

#### **3.3.2 Physikalische Charakterisierung der S1P-haltigen SLN**

Die physikalische Stabilität der SLN wurde anhand ihrer Partikelgrößen mittels Laserdiffraktometrie (LD) und Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) näher charakterisiert.

Die LD dient der Partikelgrößenbestimmung von 0,04 bis 2000  $\mu\text{m}$ , anhand der Gesamtverteilungskurve kann der prozentuale Anteil bestimmter Partikelgrößen an der Gesamtpopulation ermittelt werden. Der Wert LD95 sagt aus, dass 95 % der Gesamtpopulation unterhalb des angegebenen Größenwerts liegen.

Die PCS hat einen Messbereich von ca. 5 nm bis 5  $\mu\text{m}$  und gibt Aufschluss über die mittlere Partikelgröße (mP) und den Polydispersitätsindex (PI) als Maß für die Breite der Verteilung. Der Polydispersitätsindex ist dimensionslos und liegt zwischen 0 und 1. Dispersionen mit einem  $\text{PI} < 0,06$  werden als monodispers bezeichnet, Dispersionen mit einem  $\text{PI} > 0,50$  deuten dagegen auf eine breite Verteilung unbestimmter Form hin und sind somit nicht auswertbar. Mit diesen Untersuchungen wurde die Stabilität der Zubereitungen über einen Zeitraum von drei Monaten charakterisiert (Tab. 4).

**Tab. 4:** Partikelcharakterisierung der S1P- und Kontroll-SLN mittels PCS und LD. Dargestellt sind die Mittelwerte der LD-Analysen (Durchmesser 95% und 99%), PCS-Analysen (mittlere Partikelgröße mP) und der Polydispersitätsindex (PI).

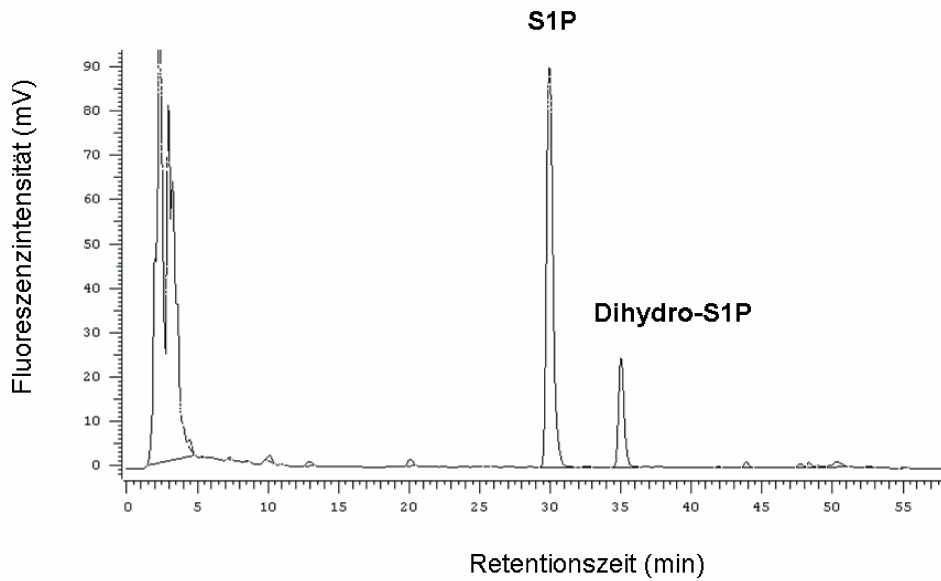
	LD-Werte				PCS-Werte			
	95 [ $\mu\text{m}$ ]		99 [ $\mu\text{m}$ ]		mP [nm]		PI	
SLN	S1P	Kontr.	S1P	Kontr.	S1P	Kontr.	S1P	Kontr.
Tag 1	0,56	0,63	0,68	1,82	193,7	218,9	0,431	0,299
Tag 14	0,56	0,64	0,68	1,84	221,3	224,1	0,329	0,293
Tag 44	0,56	0,64	0,68	1,90	224,9	215,0	0,286	0,367
Tag 87	0,54	1,77	0,65	2,67	229,7	232,6	0,286	0,304

Die ermittelten Werte zeigten, dass unter den angewandten Bedingungen die Teilchengröße der gewählten Rezeptur im nm-Bereich liegt. Das mit S1P beladene System erwies sich über einen Zeitraum von drei Monaten als stabil. Die Teilchengröße des wirkstofffreien Systems nahm dagegen mit der Lagerungsdauer zu, nach drei Monaten hatten mehr als 5 % der gemessenen SLN Durchmesser im  $\mu\text{m}$ -Bereich. Dieser Unterschied könnte darin begründet sein, dass S1P das Trägersystem durch seine amphiphile Struktur zusätzlich stabilisiert.

### 3.3.3 Gehaltsbestimmung der S1P-haltigen SLN

Um die Stabilität des S1P in dieser Zubereitung über einen Lagerungszeitraum von sechs Monaten bei 4 - 8 °C zu überprüfen, wurde der Gehalt in regelmäßigen Abständen mittels HPLC bestimmt. Dazu wurden die Zubereitungen 1:100 mit Aqua bidest. verdünnt und nach Zugabe des internen Standards Dihydro-S1P extrahiert (Abb. 41). Der Gehalt wurde anhand frischer Standardlösungen berechnet (Tab. 5).





**Abb. 41:** HPLC-Chromatogramm der extrahierten S1P-haltigen SLN mit Dihydro-S1P als internen Standard.

**Tab. 5:** Gehaltsbestimmung der S1P-haltigen SLN durch HPLC-Analytik. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD von Dreifachbestimmungen. Die Gehaltsbestimmung wurde mit vergleichbaren Ergebnissen zweimal wiederholt.

Gehalt Soll [nmol/ $\mu$ l]	Gehalt Ist		Zeit nach Herstellung
	[nmol/ $\mu$ l]	[%]	
1,206	1,103 $\pm$ 0,013	91,5 $\pm$ 1,1	2 Wochen
1,206	0,899 $\pm$ 0,033	74,6 $\pm$ 2,7	6 Wochen
1,206	0,875 $\pm$ 0,002	72,5 $\pm$ 0,2	3 Monate
1,206	0,680 $\pm$ 0,025	56,4 $\pm$ 2,0	6 Monate

S1P erwies sich in diesem Trägersystem als relativ instabil, nach drei Monaten wurden noch mehr als 70 % des Wirkstoffs wiedergefunden, nach sechs Monaten war der Gehalt allerdings um fast die Hälfte reduziert.