

## **4 DISKUSSION**

---

## 4.1 EMT in humanen primären Keratinozyten

### 4.1.1 Bedeutung der TGF- $\beta$ -induzierten EMT in humanen primären Keratinozyten

Die EMT stellt ein wichtiges *in vitro*-Korrelat zur Wundheilung, zur Fibrose und zur späten Phase der Tumorentwicklung dar. Der Großteil der *in vitro*-Untersuchungen zur EMT fand in Zelllinien statt, weniger ist dagegen über die Transformation in primären Zellen bekannt. Um die Beteiligung von S1P an der EMT epidermaler Zellen vor allem im Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz einschätzen zu können, wurde das Potential der Keratinozyten zur Transformation untersucht. Erkenntnisse über den Einfluss von TGF- $\beta$  auf die EMT im Zusammenhang mit der Metastasenbildung im Verlauf von Hautkrebserkrankungen geben Mausmodelle. Dabei wird transgenen Mäusen chemisch Hautkrebs induziert. Mittels des mutagenen Dimethylbenzanthracen (DMBA) wird der Tumor initiiert, durch regelmäßige Applikation des Tumorpromoters 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) kommt es zur Bildung gutartiger Papillome. TGF- $\beta$ , das in Keratinozyten überexprimiert wird, unterdrückt zunächst das Wachstum der benignen Tumore, steigert dann aber die Umwandlung zum malignen Plattenepithelkarzinom. Die EMT bewirkt die Transformation zum höchst invasiven Spindelzellkarzinom (Cui et al., 1996). Diese Ergebnisse sind durch weitere Studien bestätigt. So wurde gezeigt, dass Papillome, die transgen TGF- $\beta$ 1 exprimieren, aber eine verminderte Expression von TGF- $\beta$ -Rezeptoren sowie Smad2, Smad3 und Smad4 aufweisen, verstärkt metastasieren, weniger E-Cadherin in der Zellmembran aufweisen und vermehrt MMP-2 und MMP-9 bilden. TGF- $\beta$  fördert also die Tumor-Metastasierung durch die EMT (Weeks et al., 2001). Dagegen wurden im Mausmodell mit Keratinozyten, die transgen TGF- $\beta$ 1 und einen dominant negativen T $\beta$ RII exprimieren, zwar Metastasen, aber nur eine geringe Menge an Spindelzellkarzinomen gefunden (Han et al., 2005). In humanen Zellen des Plattenepithelkarzinoms wurden erhöhte Mengen an TGF- $\beta$ 1 detektiert, der T $\beta$ RII dagegen war, verglichen mit gesunder Haut, verringert (Han et al., 2005). Anhaltspunkte zum Verhalten humaner Keratinozyten

nach Exposition mit TGF- $\beta$  geben Untersuchungen an HaCaTs. Hier ist schon nach 48 h Stimulation mit TGF- $\beta$  eine Veränderung zum fibroblastoiden Phänotyp mit Bildung von Aktin-Stressfasern und reduzierten Zell-Zell-Kontakten zu beobachten (Zavadil et al., 2001). Dagegen konnte in primären Keratinozyten, wie beschrieben, erst nach 3 bis 5 Tagen die Transformation zu einem spindelförmigen Phänotyp beobachtet werden, dieser war im Vergleich zu den HaCaTs weniger ausgeprägt. Auch E-Cadherin wurde durch die Stimulation mit TGF- $\beta$  in HaCaTs stärker reduziert als in primären Keratinozyten. In der Brustkrebs-Zelllinie MCF-7, die zur Kontrolle nach Stimulation mit TGF- $\beta$  auf E-Cadherin-Expression detektiert wurde, ließ sich der EMT-Marker ebenfalls wesentlich drastischer senken. Während die erleichterte Induktion der EMT in Zellen mit tumorigenem Potential durch überaktives Ras, das zur EMT beiträgt, erklärbar ist, sind primäre Zellen offensichtlich besser gegen die EMT geschützt als die transformierte Zelllinie HaCaT. Die Untersuchung von primären Zellen lässt somit bessere Rückschlüsse auf reale Verhältnisse zu. Allerdings wurden in murinen primären Tubularepithelzellen schon nach 24 h deutliche EMT-Charakteristika gefunden wie Zelltrennung, Aktin-Stressfasern und Reduktion des membranären E-Cadherin (Zavadil et al., 2004). Dies deutet auf die große Unterschiedlichkeit des Ablaufs der EMT in verschiedenen Zellsystemen hin.

### 4.1.2 Charakterisierung der EMT

Die EMT wird als ein Übergang in einen mesenchymalen, spindelförmigen Phänotyp definiert, der mit verstärkter Expression mesenchymaler Marker und einer reduzierten Expression epithelialer Marker einhergeht. Der transformierte Phänotyp bleibt dann auch ohne weitere Stimulation erhalten, begünstigt durch eine autokrine TGF- $\beta$ -Produktion (Grunert et al., 2003). Im Gegensatz dazu steht das so genannte *scattering*, ebenfalls eine Umwandlung in einen migratorischen spindelförmigen Phänotyp, die mit einem Polaritätsverlust durch Umlagerung der epithelialen Membranproteine einhergeht. Allerdings ist hier der Gesamtproteingehalt epithelialer und mesenchymaler Marker nicht verändert. Ein wesentliches Merkmal des *scatterings* ist außerdem die vollständige Rückbildung, wenn das auslösende Stimulans entfernt wird. In der Brustdrüsenzelllinie EpH4 wird beispielsweise durch FGF, HGF sowie TGF- $\beta$  *scattering* induziert, während TGF- $\beta$  im Zusammenspiel mit

Ras EMT auslöst. Hier fördert Ras die EMT über Aktivierung der ERK, während eine Aktivierung des PI3K-Wegs nur das *scattering*, nicht aber die EMT beeinflusst (Janda et al., 2002). Daneben gibt es auch Hinweise auf eine nur durch TGF- $\beta$  induzierte EMT (Masszi et al., 2004; Zavadil et al., 2001). Dementsprechend war es wichtig, neben der Verteilung des E-Cadherins zwischen Membran und Zytoplasma auch die Gesamtkonzentration des Proteins zu berücksichtigen. Den Status der mesenchymalen Proteinexpression repräsentierte das extrazelluläre Matrixprotein Fibronectin.  $\alpha$ -SMA als ebenfalls mesenchymales Protein wird vorwiegend von Myofibroblasten gebildet und charakterisiert einen fibrotischen Zustand. Im Gegensatz zu MMP-9 ist MMP-2 ein typisches mesenchymales Protein, dennoch dienen beide Matrixmetalloproteinasen als EMT-Marker, da sie für die Degradierung der Basalmembran bedeutend sind und den Zellen die Migration bzw. die Metastasierung ermöglichen. So kann durch das Expressionsmuster der vielfältigen Marker ein differenziertes Bild vom Transformationsstatus der Zellen gewonnen werden.

Eine Überprüfung der Reversibilität der EMT nach Entzug des Stimulans ebenso wie eine Expositionsdauer mit TGF- $\beta$  oder S1P über einen Zeitraum von sieben Tagen hinaus waren aufgrund der begrenzten Kultivierbarkeit der Keratinozyten nicht möglich.

### 4.1.3 Bedeutung der S1P-induzierten EMT in humanen Keratinozyten

Über das mögliche Potential von LPL, in epithelialen Zellen eine EMT auszulösen, ist wenig bekannt. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass sowohl S1P als auch LPA auf humane primäre Keratinozyten chemotaktisch wirken (Sauer et al., 2004b; Vogler et al., 2003). In der Zelllinie MDCK aktiviert LPA über RhoA den Transkriptionsfaktor Stat5a, über diesen reguliert RhoA die E-Cadherin-Expression herunter und die Vimentin-Expression herauf (Benitah et al., 2003). Nach Stimulation mit LPA kommt es in humanen Linsenepithelzellen zur Bildung von Aktin-Stressfasern, ebenfalls durch Aktivierung von Rho (Maddala et al., 2003), im Cornea-Epithel dagegen erhöht LPA die transzelluläre Resistenz (Yin and Watsky, 2005). Während S1P die Zellbarriere in Endothelzellen durch Stärkung der *Adherens Junctions* abdichtet, hat es auf pulmonale Epithelzellen die umgekehrte Wirkung.

Hier induziert S1P über den S1P<sub>3</sub>-Rezeptor eine verminderte Expression von ZO-1 und Claudin in den *Tight Junctions* und damit eine erhöhte Durchlässigkeit des Epithels (Gon et al., 2005). Für Brustepithelzellen dagegen sind die Ansammlung von subkortikalen Aktgürteln sowie die Bildung von *Adherens Junctions* mit vermehrter Ansammlung von E-Cadherin beschrieben. Dies geschieht allerdings schon nach einer relativ kurzen Stimulationszeit von 30 Minuten (Hung et al., 2004). In Brustkrebszellen konnte im Einklang mit diesen Ergebnissen gezeigt werden, dass S1P die Zellmotilität senkt. Hier wird ein intrazellulärer Signalweg postuliert (Wang et al., 1999). Aufgrund dieser geringen und teilweise widersprüchlichen Datenlage war eine Untersuchung des transformatorischen Potentials von S1P sehr interessant.

#### 4.1.4 Einfluss von TGF- $\beta$ und S1P auf die EMT-Marker

**Tab. 6:** Gegenüberstellung des Einflusses von TGF- $\beta$  und S1P auf die EMT-Marker bezüglich Protein- und mRNA-Expression (# Induktion; ## starke Induktion; \$ Repression; \$\$ starke Repression; - kein Effekt; n. n. nicht nachgewiesen).

	Protein-Expression		mRNA-Expression	
	TGF- $\beta$	S1P	TGF- $\beta$	S1P
<b>E-Cadherin</b>	↓↓	↓	↓	↓
<b>Fibronektin</b>	↑↑	↑	↑	↑
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	↑	↑	↑	↑
<b>Pro-MMP-2</b>	↑↑	-	↑	n. n.
<b>Pro MMP-9</b>	↑↑	↑↑	↑	↑

TGF- $\beta$  und S1P beeinflussten die untersuchten EMT-Marker mit Ausnahme von Pro-MMP-2 tendenziell gleich, aber in unterschiedlichem Ausmaße. Die analogen Effekte zwischen TGF- $\beta$  und S1P auf humane Keratinozyten stehen im Einklang mit früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe. So wirkt S1P auf humane Keratinozyten wachstumshemmend und vergleichbar stark migratorisch wie TGF- $\beta$  (Vogler et al., 2003). Die Konzentrationsabhängigkeit bei der Migration als Antwort auf die Stimulation mit S1P stimmt dabei überein mit der detektierten Konzentrationsabhängigkeit bei der Regulation der EMT-Marker und nahm für S1P-Konzentrationen von 0,1  $\mu$ M bis 10  $\mu$ M zu. Die fluoreszenzmikroskopisch bestimmten

Parameter, nämlich Veränderung des Aktin-Zytoskeletts, Reduktion des membranären E-Cadherins und Zunahme von  $\alpha$ -SMA ließen sich schon nach drei Tagen detektieren und waren in TGF- $\beta$ - und S1P-stimulierten Zellen vergleichbar stark ausgeprägt. Dagegen ließ sich eine deutlich veränderte Proteinexpression des E-Cadherins erst nach vier bis fünf Tagen nachweisen. E-Cadherin wurde durch TGF- $\beta$  stärker gesenkt als durch S1P, das nur eine leichte Hemmung induzierte. Besonders auffällig waren die Unterschiede bei der Expression des Fibronektins. Hier konnte TGF- $\beta$  einen massiven Anstieg induzieren, der Effekt von S1P war dagegen moderat. Die Expression des Pro-MMP-2 nach Stimulation mit S1P unterblieb ganz. Als vergleichbar und eher schwach erwies sich die Induktion der  $\alpha$ -SMA-Proteinexpression durch TGF- $\beta$  und S1P. Hier wurde eine stärkere Zunahme der Fluoreszenz beobachtet, als es die durch Western Blot-Analytik erhaltenen Ergebnisse hätten erwarten lassen. Die Pro-MMP-9-Sekretion wurde von beiden Stimulantien im vergleichbaren Ausmaße induziert, war stark und geschah im Vergleich mit der Modulation der übrigen EMT-Markern schon sehr schnell. Bereits nach 24 h wurde eine deutliche Erhöhung detektiert. Überraschend war dagegen, dass die Pro-MMP-2-Sekretion nur durch TGF- $\beta$  induziert wurde. Bemerkenswert ist auch, dass S1P in Bezug auf die Pro-MMP-2-Sekretion einen antagonistischen Effekt zu TGF- $\beta$  aufwies, da es den durch TGF- $\beta$  erhöhten Pro-MMP-2-Spiegel senkte.

Die Ergebnisse der PCR zeigten, dass die Regulation aller EMT-Marker auf transkriptionaler Ebene erfolgte. Die Stimulation der Zellen mit S1P oder TGF- $\beta$  führte zu einer reduzierten mRNA-Expression des E-Cadherins bzw. einer verstärkten mRNA-Expression der übrigen Marker. Tendenziell ließ sich auch hier eine Konzentrationsabhängigkeit erkennen, die allerdings nicht so stark ausgeprägt war wie auf Protein-Ebene. Da die PCR mit bis zu 35 Zyklen durchgeführt wurde, lag das Endprodukt möglicherweise nicht mehr im exponentiellen Bereich, sondern in der sich anschließenden Plateauphase und ließ damit keine genaue Quantifizierung zu. Zur Kontrolle wurde als externer Standard GAPDH amplifiziert, das als Haushaltsgen konstitutiv exprimiert wird und dessen Regulation durch äußere Einflüsse wie die Stimulation durch Wachstumsfaktoren gering ist. Der Einsatz des Haushaltsgens erlaubte einen Abgleich des Unterschieds der erhaltenen Menge cDNA, der zwar durch UV-metrische Quantifizierung der zur reversen Transkription verwendete mRNA klein gehalten werden sollte, aber dennoch durch die individuelle Aktivität des Enzyms zustande kommen kann.

#### 4.1.5 Bedeutung von MMP-2 und MMP-9

Die klinische Relevanz der unterschiedlichen Expression von Pro-MMP-2 und Pro-MMP-9 durch S1P ist fraglich. Die Gelatinasen haben ähnliche Effekte und werden häufig nebeneinander verstärkt gebildet. So sind sowohl MMP-2 als auch MMP-9 bei der Wundheilung erhöht (Steffensen et al., 2001). Die Invasion und Metastasierung des oralen Plattenepithelkarzinoms wird mit erhöhten MMP-2- und MMP-9-Spiegeln assoziiert (Kurahara et al., 1999; Tsai et al., 2003). Welche der Gelatinasen bei der Migration die entscheidende Rolle spielt, ist umstritten; Makela et al. fanden, dass MMP-2, nicht aber MMP-9 einen Einfluss auf die Migration der Keratinozyten hat (Makela et al., 1999), andere Gruppen konnten nur einen Bezug zwischen MMP-9 und der Migration nachweisen (McCawley et al., 1998; Thomas et al., 2001). Auch die EMT in Keratinozyten-Zelllinien wird sowohl nur mit MMP-2 als auch nur mit MMP-9 assoziiert (Gilles et al., 1994; Papathoma et al., 2001). Weiterhin kann das Fehlen der einen Gelatinase wahrscheinlich durch verstärkte Expression der anderen kompensiert werden. So kommt es im Maus-Modell nur dann zu einer geschwächten Tumervaskularisierung und Invasion, wenn die Expression beider Gelatinasen gemindert ist (Masson et al., 2005).

Auffällig ist, dass in den Hautkeratinozyten zwar die Proformen der Gelatinasen, aber nicht deren Aktivierung detektiert wurde. Möglicherweise lag die aktivierte Form in zu geringer Menge vor, um nachgewiesen zu werden; nach viertägiger Stimulation zeigte sich unterhalb der Pro-MMP-9-Bande eine weitere, schwache Bande, die vermutlich aktiviertes MMP-9 darstellt. Denkbar ist auch eine unzureichende Bildung aktivierender Agentien wie aktivierte MMPs, beispielsweise MT1-MMP oder weitere Proteasen, die ebenfalls MMPs spalten und damit aktivieren können, z. B. Plasmin und die Plasminogenaktivatoren. Auch eine erhöhte Bildung von Inhibitoren ist denkbar, so binden TIMP-1 und TIMP-2 spezifisch an die aktiven Seiten von MMP-9 bzw. MMP-2 und verhindern eine weitere autokalytische Spaltung. Sowohl TGF- $\beta$  als auch S1P erhöhen PAI-1 in Keratinozyten (nicht gezeigt), eine Hemmung des Pro-MMP-9-aktivierenden Plasmins ist möglich. *In vivo* kann sich das Verhältnis zwischen inhibierenden und aktivierenden Faktoren durch den Einfluss weiterer Zytokine und Wachstumsfaktoren verschieben. Darüber hinaus zeigten *in vitro*-Untersuchungen mit benignen und malignen oralen Keratinozyten eine zunehmende

Invasivität der Zellen mit steigendem Gelatinasen-Gehalt, diese Korrelation erwies sich als unabhängig von der Aktivierung der Pro-MMPs (Robinson et al., 2003).

Neben Invasion und Migration werden MMP-9 weitere Effekte zugesprochen, so kommt es nach der Behandlung humaner Keratinozyten mit neutraler Sphingomyelinase über eine verstärkte Bildung von MMP-9 zur Wachstumshemmung, während die MMP-2 Spiegel konstant bleiben (Buisson-Legendre et al., 1999).

Bei der Regulation der Pro-MMP-2-Sekretion durch S1P könnte der  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsel beteiligt sein. In Keratinozyten gibt es Hinweise auf eine geschwächte Freisetzung von MMP-2 nach Stimulation mit  $\text{Ca}^{2+}$  (Kobayashi et al., 1998). S1P setzt in Epithelzellen unter der Beteiligung von  $G_i$ -gekoppelten Rezeptoren  $\text{Ca}^{2+}$  frei (Orlati et al., 1998), dies wurde auch für primäre Keratinozyten gezeigt (Manggau, 2002). Auch LPA, das ebenfalls die TGF- $\beta$ -induzierte Pro-MMP-2-Freisetzung hemmte, steigert in Epithelzellen die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung (Zhao et al., 2005). Die MMP-9-Freisetzung dagegen wird durch Stimulation mit  $\text{Ca}^{2+}$  erhöht (Kobayashi et al., 1998). Dies steht im Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen, da sowohl S1P als auch LPA die Freisetzung von Pro-MMP-9 in ähnlichem Ausmaße steigerten wie TGF- $\beta$ . Diese wurde durch Kostimulation von S1P und TGF- $\beta$  in submaximalen Konzentrationen, die selber nur einen schwachen Effekt auf die MMP-9-Freisetzung hatten, stark gesteigert. Das spricht dafür, dass die beiden Stimulantien die Pro-MMP-9-Freisetzung synergistisch fördern. Sowohl die TGF- $\beta$ - als auch die S1P-induzierte Pro-MMP-9-Induktion wurde durch den T $\beta$ RI-Inhibitor vollständig gehemmt. Allerdings wurden auch die basale sowie die TNF- $\alpha$ -induzierte Pro-MMP-9-Produktion gesenkt.

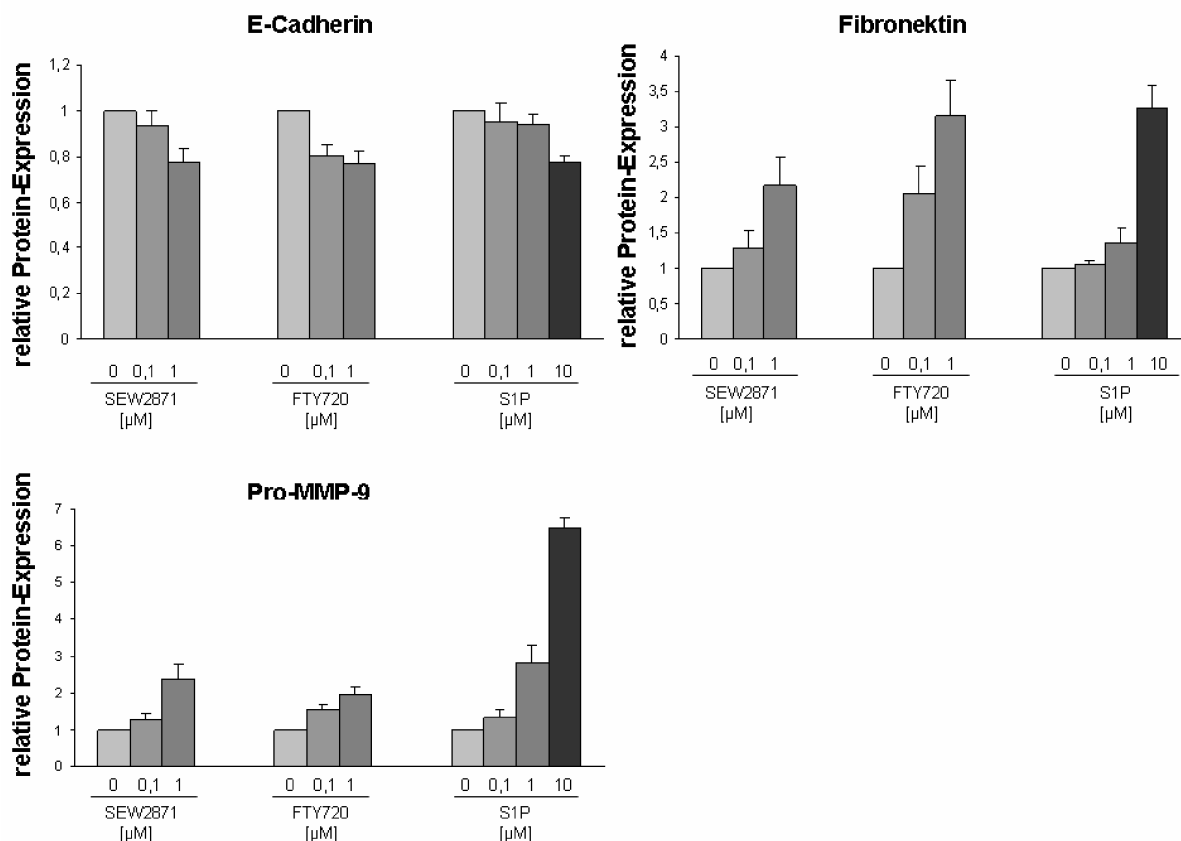
Die Expression von E-Cadherin, Fibronectin und  $\alpha$ -SMA durch TGF- $\beta$  und S1P erfolgte analog zur Pro-MMP-9-Freisetzung synergistisch. Auch hier zeigte die Kombination jeweils submaximaler Konzentrationen der beiden Stimulantien einen deutlich verstärkten Effekt. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen, die in unserer Arbeitsgruppe bereits an dendritischen Zellen gefunden wurden. Hier bewirkt die Kostimulation mit TGF- $\beta$  und S1P eine gesteigerte Migration und Smad-Phosphorylierung der Zellen (Von Wenckstern, 2006).



#### 4.1.6 Beteiligung der S1P-Rezeptoren an der EMT durch S1P

Die Regulation der untersuchten EMT-Marker durch S1P sowie die Veränderung des Phänotyps zum fibroblastoiden, spindelförmigen Zelltyp hin ließ sich durch Vorinkubation mit PTX nahezu vollständig aufheben. Auch die Hemmung der Pro-MMP-2-Freisetzung erwies sich als PTX-abhängig. Die Veränderungen durch TGF- $\beta$  dagegen waren, soweit untersucht, PTX-insensitiv. Eine Beteiligung intrazellulärer Signalwege bei der S1P-induzierten EMT in humanen primären Keratinozyten kann demnach ausgeschlossen werden. Dieses Ergebnis ist insofern interessant, als die S1P-induzierte Wachstumshemmung und Differenzierung in den Keratinozyten nur teilweise über PTX-sensitive Rezeptoren vermittelt wird, eine intrazelluläre Beteiligung an der Proliferationshemmung konnte gezeigt werden (Kim, 1999). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche zeigten, dass die Vorinkubation der Keratinozyten mit PTX und die nachfolgende Stimulation mit S1P zu einem stark differenzierten Erscheinungsbild der Zellen führten. Im  $\text{Ca}^{2+}$ -armen Milieu scheint das Gleichgewicht zwischen Transformation und Differenzierung als Zellantwort auf S1P also über Stimulation der  $G_i$ -gekoppelten Rezeptoren zugunsten der Transformation auszufallen.

Um die bei der EMT beteiligten S1P-Rezeptoren zu identifizieren, wurden die Keratinozyten mit den S1P-Rezeptoragonisten FTY720 und SEW2871 stimuliert. Die Auswirkungen der Agonisten auf die Marker E-Cadherin, Fibronectin und Pro-MMP-9 sind in Abb. 42 im Vergleich mit S1P dargestellt. Die Agonisten regulierten die E-Cadherin-Expression im gleichen Maße wie S1P, dies deutet auf die Involvierung des  $\text{S1P}_1$ -Rezeptors hin. Die Fibronectin-Expression wurde durch FTY720 vollständig, durch SEW2871 allerdings nur teilweise imitiert, dies lässt Rückschlüsse auf eine mögliche Beteiligung der Rezeptoren  $\text{S1P}_{3-5}$  zu. Auffallend ist die Expression von Pro-MMP-9, diese wurde sowohl durch FTY720 als auch durch SEW2871 induziert, aber im Vergleich mit S1P nur in sehr schwachem Ausmaße. Aufgrund des Rezeptorbindungsprofils von FTY720 kann daher davon ausgegangen werden, dass MMP-9 zu einem kleinen Teil über  $\text{S1P}_1$  gesteuert wird, der größte Teil der Regulation aber über  $\text{S1P}_2$  läuft.



**Abb. 42:** Einfluss von SEW2871, FTY720 und S1P auf die Expression der EMT-Marker E-Cadherin, Fibronectin und Pro-MMP-9, dargestellt ist die Bandenintensität bezogen auf die jeweilige Kontrolle.

#### 4.1.7 Einfluss von FTY720 auf Keratinozyten

Die Wirkung von FTY720 ist auch deshalb von Interesse, weil sich FTY720 als Immunmodulator derzeit in der klinischen Prüfung befindet. Zur ersten Abschätzung möglicher Nebenwirkungen sind Untersuchungen an der Zelle als *in vitro*-Modell hilfreich; die Übertragbarkeit auf *in vivo*-Verhältnisse ist zu prüfen. FTY720 bewirkt in Lymphozyten eine lang anhaltende Internalisierung des S1P<sub>1</sub>-Rezeptors und antagonisiert somit den migratorischen Effekt des S1P auf die Zellen (Matloubian et al., 2004). In unserer Arbeitsgruppe konnte in dendritischen Zellen ein Crosstalk zwischen S1P<sub>1</sub> und TβRI nachgewiesen werden, so dimerisieren die Rezeptoren nach Stimulation mit S1P. Beide Rezeptoren werden daraufhin internalisiert, so dass 30 min Vorinkubation mit S1P die Migration von TGF-β auf die Dendriten hemmt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass TβRI auch durch die Stimulation mit FTY720

in dendritischen Zellen internalisiert wird (Von Wenckstern, 2006). In Keratinozyten wurde die Dimerisierung des S1P<sub>1</sub> mit TβRI ebenfalls gezeigt (Sauer et al., 2004a), fraglich ist, ob es nach Stimulation mit S1P oder FTY720 ebenfalls zur Internalisierung dieser Rezeptoren kommt. Die Pro-MMP-9-Expression, die zumindest teilweise über S1P<sub>1</sub> reguliert wurde, war nach Vorinkubation mit S1P über Zeiträume von 30 min, 5 h und 24 h und anschließender Stimulation mit TGF-β bzw. Kostimulation mit S1P und TGF-β unverändert hoch; dies spricht gegen eine Internalisierung. Auch nach Vorinkubation mit FTY720 führte die anschließende Stimulation mit TGF-β und FTY720 zur Sekretion von Pro-MMP-9.

Interessant ist ebenfalls, dass FTY720 in Keratinozyten ähnliche Effekte wie S1P hat. In Mesangiumzellen konnten nach Aktivierung des FTY720 zu FTY720-P analoge Effekte zu S1P gezeigt werden (Xin et al., 2006). Auch in HUVECs sind die Effekte von FTY720-P und S1P ähnlich, FTY720-P steigert beispielsweise die Migration und verstärkt durch Translokation von VE-Cadherin und β-Catenin die *Adherens Junctions* (Sanchez et al., 2003; Tolle et al., 2005). In Immunzellen weist FTY720 einen antagonistischen Effekt zu S1P auf, auch in der Zelllinie HEK293 kommt es durch Vorinkubation mit FTY720 zur Internalisierung des S1P<sub>1</sub>-Rezeptors, infolgedessen sind Migration und Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung als Antwort auf S1P gehemmt (LaMontagne et al., 2006).

*In vivo* zeigt FTY720 antionkogenes Potential und unterdrückt Wachstum und Metastasierung im murinen Brustkrebsmodell; *in vitro* sind Migration, Aktin-Stressfaser-Formation und Integrin-Bildung reduziert (Azuma et al., 2002). Auch das Wachstum des Prostata-Krebses kann durch FTY720 gehemmt werden, hier zeigt sich mit der verstärkten Bildung von *Adherens Junctions* durch E-Cadherin und β-Catenin ebenfalls eine tendenzielle Reduktion der Metastasenbildung (Chua et al., 2005). Die vorliegenden *in vitro*-Ergebnisse stehen dazu im Widerspruch, da FTY720 ähnliche Effekte aufwies wie S1P und die Zellen in einen migratorischen Phänotyp transformierte.

#### 4.1.8 Bedeutung des Smad- und des MAPK-Signalwegs für die EMT

**Tab. 7:** Einfluss des Smad- und des ERK-Signalwegs auf die Regulation der EMT-Marker (# schwache Beteiligung; ## starke Beteiligung; - keine Beteiligung; n. n. nicht nachgewiesen).

	TGF- $\beta$		S1P	
	Smad	ERK	Smad	ERK
<b>E-Cadherin</b>	-	##	-	##
<b>Fibronektin</b>	-	##	n. n.	##
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	##	-	##	-
<b>Pro-MMP-2</b>	#	##	n. n.	n. n.
<b>Pro-MMP-9</b>	-	##	-	#

Das Netzwerk der bei der EMT beteiligten Signalwege ist sehr umfangreich, und die Erkenntnis über immer weitere Strukturen, die involviert sind, wächst beständig. Die Beteiligung der Signalwege an der Ausprägung der EMT-Merkmale ist in der Literatur vielfältig und teilweise widersprüchlich beschrieben. Oft wird die EMT nur als Gesamtprozess betrachtet, die einzelnen Marker werden aber nicht differenziert auf ihre Regulierung hin getestet. Auch werden häufig in Ermangelung einer allgemein gültigen Definition für die EMT unterschiedliche Merkmale zur Beurteilung herangezogen, teilweise auch nur eine geringe Anzahl an Markern, die eventuell nicht repräsentativ ist. In den letzten Jahren wurden häufig EMT-Prozesse beschrieben, die durch das Wechselspiel verschiedener Signalwege induziert werden (Davies et al., 2005; Rhyu et al., 2005). Eine Kooperation zwischen dem Smad- und dem ERK-Signalweg wird oft beobachtet, dabei spielt neben der Stimulation mit TGF- $\beta$  überaktives bzw. onkogenes Ras als Aktivator der Raf/MEK/ERK-Kaskade eine bedeutende Rolle (Janda et al., 2002; Jechlinger et al., 2003; Oft et al., 2002).

Die vorliegenden Ergebnisse in primären Keratinozyten weisen ebenfalls auf eine Kooperation zwischen dem Smad- und dem ERK-Signalweg bei der Induktion der EMT hin. Die Beteiligung des ERK-Signalwegs steht im Einklang mit Untersuchungen an HaCaTs. Hier zeigt ein Genarray, dass nach Stimulation mit TGF- $\beta$  ERK-abhängige Gene vorwiegend in den Gen-Clustern zu finden sind, die mit

der Zell-Matrix-Adhäsion und der Zell-Beweglichkeit assoziiert sind, nicht aber in Clustern assoziiert mit der Umstrukturierung des Aktinskeletts (Zavadil et al., 2001). Der Smad-Signalweg spielt jedoch bei der Transformation der HaCaTs auch eine bedeutende Rolle, so wird die Aufrechterhaltung der *Adherens Junctions* über E-Cadherin und der Zell-Zusammenhalt in HaCaTs als Smad3-abhängig beschrieben (Zavadil et al., 2004). Für eine vollständige Transformation scheint ein Zusammenspiel zwischen Smad- und ERK-Signalweg erforderlich zu sein. So fand eine andere Gruppe, dass die Behandlung von HaCaTs mit TGF- $\beta$  nur dann in EMT resultiert, wenn die Zellen mutiertes Ras aufweisen. Alternativ kann EGF in hohen Konzentrationen (100 ng/ml) die Wirkung des überaktiven Ras ersetzen (Davies et al., 2005).

Während Ras und TGF- $\beta$  bei der Induktion der EMT und der Invasion von malignen Tumorzellen kooperieren, verhindert Ras die TGF- $\beta$ -induzierte Wachstumshemmung und Apoptose in epithelialen Zellen und trägt damit zum onkogenen Potential der Zelle bei (Jechlinger et al., 2003; Lehmann et al., 2000). Die Wechselwirkungen der Smads mit ERK sind umstritten: Kretschmar et al. fanden in Epithelzellen von Brust und Lunge, dass sowohl onkogenes Ras als auch in einem schwächeren Ausmaß EGF über ERK zu einer Phosphorylierung der Linkerregion von Smad2 und Smad3 führt, dadurch wird der Transport der Smads in den Kern verhindert (Kretschmar et al., 1999). Oft et al. zeigten dagegen, dass in squamösen Krebszellen mutiertes Ras zu einer gesteigerten Ansammlung von phosphoryliertem Smad2 im Kern führt (Oft et al., 2002). Auch hier ist eine vollständige EMT nur in Kooperation mit Ras zu erreichen, obwohl TGF- $\beta$  über die Smads Migration und Umverteilung des E-Cadherins vermittelt.

Interessanterweise ist bei der TGF- $\beta$ - und S1P-induzierten EMT in primären Keratinozyten der Einfluss der Smads relativ gering, eine größere Rolle scheint hier ERK zuzufallen. Während einige Effekte, wie beispielsweise die Migration, in diesen Zellen in Abhängigkeit von den Smads vermittelt werden (Sauer et al., 2004a), hat bei der Regulation der EMT-Marker jedoch ERK die größere Bedeutung (dargestellt in Tab.7). Durch die Inhibition von ERK blieb der Zellverband weitgehend aufrechterhalten und die Zellen behielten ihre epitheliale Form. Auch die Wirkung von TGF- $\beta$  und S1P auf E-Cadherin und Fibronektin konnte durch ERK-Hemmung fast vollständig aufgehoben werden. Bei der Induktion von Pro-MMP-2 durch TGF- $\beta$  schienen sowohl ERK als auch der Smad-Signalweg beteiligt zu sein, wobei auch

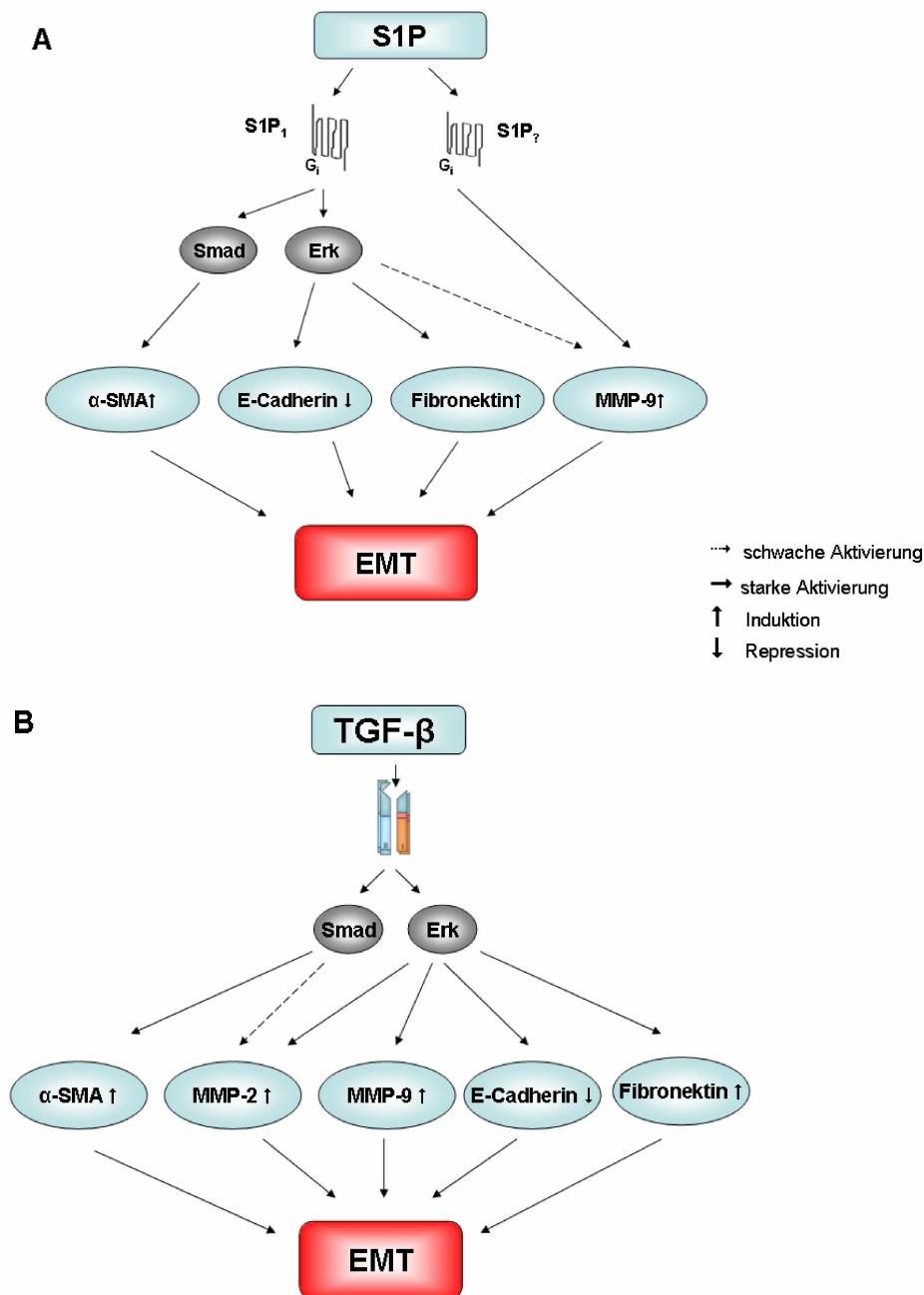
hier ERK der größere Anteil zukam. Die ERK-Beteiligung an der Regulation des Pro-MMP-9 war nach Stimulation mit TGF- $\beta$  hoch, nach Stimulation mit S1P dagegen gering. Hier ist die Beteiligung weiterer, Smad-unabhängiger Signalwege nicht auszuschließen. Allerdings darf auch nicht übersehen werden, dass sich die Transfektion primärer Keratinozyten als schwierig erwies, und obwohl die Ausschaltung spezifischer Gene mittels siRNA eine sehr effektive Methode ist, gelang es nicht, die Smad4-Expression vollständig zu unterdrücken. Als Gegenbeispiel dienen primäre Fibroblasten, hier gelang die Gen-Ausschaltung mittels siRNA sehr effizient.

Die Regulation des E-Cadherins ist in der Literatur kontrovers beschrieben. In verschiedenen Zelllinien wurde der Zusammenhang mit dem Smad-Signalweg gezeigt (Kondo et al., 2004; Tian et al., 2003; Zeisberg et al., 2003), aber auch die Beteiligung von ERK wurde gefunden (Janda et al., 2002; Santibanez et al., 2003; Xie et al., 2004), ebenso wie eine Kooperation beider Signalwege bei der Induktion des EMT-Markers (Oft et al., 2002; Rhyu et al., 2005). Auch bei den HaCaTs wurde sowohl über eine Smad- als auch über eine ERK-Abhängigkeit berichtet (Davies et al., 2005; Zavadil et al., 2001). Andererseits wurde E-Cadherin ebenfalls als Smad4-unabhängig beschrieben (Peinado et al., 2003), und in Darmkrebszellen konnte sogar die Wiederherstellung des epithelialen Phänotyps durch Induktion der E-Cadherin-Expression nach Reexpression von Smad4 gezeigt werden (Muller et al., 2002). Da der dominierende Signalweg stark vom Zelltyp abhängig zu sein scheint, war die Untersuchung an primären Keratinozyten von großer Bedeutung. Interessant ist, dass hier die Reduktion des E-Cadherins, ein wesentlicher Faktor bei der EMT, offensichtlich hauptsächlich vom ERK-Signalweg abhängt. Gezeigt werden konnte weiterhin, dass in den Keratinozyten die Regulation des E-Cadherins auf transkriptionaler Ebene erfolgte. Die Aufklärung der beteiligten Transkriptionsfaktoren steht noch aus; eine mögliche Zielstruktur stellt c-Fos dar, ein Regulatorprotein mit Einfluss auf die Transkription des E-Cadherins, das ERK-abhängig durch TGF- $\beta$  aktiviert werden kann (Reichmann et al., 1992; Zavadil et al., 2001).

Die Regulation von  $\alpha$ -SMA in epithelialen Zellen wird als Smad-abhängig beschrieben, teilweise auch in Kooperation mit Ras bzw. Aktivierung der ERK (Ahmed et al., 2006; Li et al., 2002; Oft et al., 2002; Rhyu et al., 2005; Saika et al., 2004). In primären Keratinozyten konnte die Induktion von  $\alpha$ -SMA als Smad-abhängig identifiziert werden, eine Beteiligung der ERK konnte nicht gezeigt werden.

Fibronectin wurde in malignen Keratinozyten als Smad-unabhängig beschrieben (Paterson et al., 2002), in Lungenepithelzellen dagegen als Smad-abhängig (Itoh et al., 2003). Aber auch für die Induktion dieses EMT-Markers wird über einen Synergismus zwischen dem Smad- und ERK-Signalweg berichtet (Rhyu et al., 2005). In HaCaTs konnte eine ERK-abhängige Aktivierung des Fibronectin-Gens gezeigt werden (Zavadil et al., 2001). Die gefundenen Ergebnisse ließen erkennen, dass die Signaltransduktion von Fibronectin in humanen primären Keratinozyten nach Stimulation mit TGF- $\beta$  Smad4-unabhängig stattfindet. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Induktion von Fibronectin sowohl durch TGF- $\beta$  als auch durch S1P nahezu vollständig ERK-abhängig ist.

Bei der Induktion von Pro-MMP-9 durch TGF- $\beta$  und S1P konnte zwar eine Smad-Unabhängigkeit nachgewiesen werden, allerdings scheinen hier weitere Signalwege involviert zu sein, da die Inhibition der ERK nicht zu einer vollständigen Reduktion der Pro-MMP-9-Sekretion führte. Bei der TGF- $\beta$ -induzierten Expression von Pro-MMP-2 wiederum scheinen sowohl Smad- als auch ERK-Signalwege beteiligt zu sein. Über die Signaltransduktion der Gelatinasen nach Stimulation mit TGF- $\beta$  ist bislang wenig bekannt. In der Brustepithelzelllinie MCF10A wird sie als p38 MAPK-abhängig und ERK-unabhängig beschrieben (Kim et al., 2004), auch in HaCaTs ist die Aktivierung des MMP-2-Gens ERK-unabhängig (Zavadil et al., 2001). In Nierenepithelzellen wurde die MMP-2-Induktion als Smad2-abhängig beschrieben (Phanish et al., 2006), die MMP-9-Induktion dagegen in transformierten Mäusekeratinozyten als ERK-abhängig (Santibanez et al., 2002). Zwar weisen beide Gelatinasen ein Smad-bindendes Element in der Promoterregion auf, andererseits wurde durch die Transfektion einer humanen oralen Karzinomzelllinie mit einem dominant negativen T $\beta$ RII die Expression der beiden Gelatinasen nicht beeinträchtigt (Huntley et al., 2004), was auf eine Smad-unabhängige Regulation hindeutet. Unterschiede bei der Gen-Aktivierung zwischen den beiden MMPs sind insofern wahrscheinlich, als MMP-9, nicht aber MMP-2 eine AP-1 Bindungsseite besitzt. Während in humanen primären Keratinozyten bei Induktion von MMP-2 durch TGF- $\beta$  Smad und ERK eine Rolle spielen, bleibt herauszufinden, welcher Signalweg neben Aktivierung der ERK für die Regulation der MMP-9 relevant ist. In Abb. 43 sind die wichtigsten beteiligten Signalwege bei Regulation der einzelnen EMT-Marker als Reaktion auf Stimulation mit S1P oder TGF- $\beta$  noch einmal zusammenfassend dargestellt.



**Abb. 43:** Regulation der EMT in humanen primären Keratinozyten nach Stimulation mit S1P (A) oder TGF- $\beta$  (B).

#### 4.1.9 Bewertung der transformatorischen Wirkung von S1P

S1P und TGF- $\beta$  induzieren in primären Keratinozyten der Haut einen Fibroblasten-ähnlichen, migratorischen Phänotyp mit charakteristischen EMT-Merkmalen. Die S1P-induzierte Veränderung ist jedoch moderat gegenüber der TGF- $\beta$ -induzierten. Beachtet werden muss auch, dass die Stimulation der Zellen in  $\text{Ca}^{2+}$ -reduziertem



Medium erfolgte,  $\text{Ca}^{2+}$ -Mangel fördert die EMT und hemmt die Differenzierung der Epithelzellen (Hennings et al., 1980; Masszi et al., 2004). In primären Hautkeratinozyten wurde eine differenzierungsfördernde Wirkung des S1P mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen von 0,15 mM gezeigt (Kim, 1999; Vogler et al., 2003). Auch eine verstärkte Ausbildung von *Adherens Junctions* durch S1P kann nach Zugabe von 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  erzielt werden (Hung et al., 2004). Inwiefern die *in vitro*-Ergebnisse bezüglich der EMT klinisch relevant sind, wird sich erst durch *in vivo*-Versuche abklären lassen. Von größerer Bedeutung scheint dagegen das Zusammenspiel zwischen S1P und TGF- $\beta$ , da es hier schon durch jeweils niedrige Konzentrationen zu einer starken Transformation der Zelle kommt. Von Bedeutung kann dieser Synergismus bei der Wundheilung sein, da im Wundareal sowohl TGF- $\beta$  als auch S1P aus Thrombozyten freigesetzt werden und die Keratinozyten durch die EMT den Heilungsprozess beschleunigen könnten.

Zu erwarten ist jedoch auch eine transformatorische Wirkung auf onkogene Zellen und damit eine Tumorprogression, sowohl durch S1P als auch durch die Kombination von S1P und TGF- $\beta$ . Zur Abklärung sollte ebenfalls eine Prüfung an malignen Zelllinien stattfinden.

### 4.2 Bedeutung der Wirkung von LPL auf dermale Fibroblasten

LPL weisen bezüglich der Wundheilung paradoxe Effekte auf. So regt die Stimulation mit S1P und LPA Keratinozyten zwar zur Migration und, wie gezeigt, zur Produktion von Matrixproteinen an, wirkt aber gleichzeitig proliferationshemmend (Sauer et al., 2004b; Vogler et al., 2003). Auf Fibroblasten dagegen hat S1P sowohl migrations- als auch proliferationsfördernde Effekte und fördert ebenfalls die Produktion von Proteinen der ECM sowie die Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten (Vogler et al., 2003). Der wundheilungsfördernden Wirkung des S1P steht der wachstumshemmende Effekt auf die Keratinozyten gegenüber. Dieses Wirkprofil ist dem des TGF- $\beta$  ähnlich; auch der Wachstumsfaktor wirkt chemotaktisch auf Keratinozyten und Fibroblasten (Ashcroft et al., 1999; Roberts and Sporn, 1987). Fibroblasten und glatte Muskelzellen werden zur Proliferation angeregt (Goodman and Majack, 1989; O'Kane and Ferguson, 1997), das Wachstum der Keratinozyten dagegen durch die vermehrte Expression der inhibitorischen Zellzyklusproteine p15

und p21 gehemmt (Akiyoshi et al., 2001; Inohara et al., 1995). LPA und S1P werden ebenso wie TGF- $\beta$  in Blutplättchen gespeichert und im Wundbereich verstärkt freigesetzt. Aus diesem Grund ist es sehr interessant, dass TGF- $\beta$  und S1P nicht nur analoge Wirkungen auf die Fibroblasten aufwiesen, sondern, ebenso wie bei den Keratinozyten gezeigt, in Kombination eine mindestens additive Wirkung auf die Produktion der Matrixproteine hatten. Die Produktion des PAI-1 als Antwort auf die Stimulation mit S1P erwies sich als Rezeptor-vermittelt, da sie mit PTX vollständig hemmbar war im Gegensatz zur TGF- $\beta$  induzierten PAI-1-Synthese. Allerdings ließ sich die S1P-Antwort ebenfalls mit dem Inhibitor des T $\beta$ IR hemmen. Dies deutet darauf hin, dass S1P auch in Fibroblasten seine Zellantworten über einen Crosstalk zwischen dem S1P-Rezeptor und dem T $\beta$ RI hervorruft. Eine alternative Möglichkeit besteht darin, dass S1P selbst durch einen autokrinen Effekt die Freisetzung von TGF- $\beta$  bewirkt und seine Effekte somit indirekt vermittelt. Die extreme Wirkungsverstärkung zwischen den beiden Stimulantien ist dadurch allerdings nicht zu erklären. Nicht außer Acht gelassen werden darf daher die Möglichkeit, dass S1P regulatorisch auf Proteine wirkt, die die TGF- $\beta$ -Signaltransduktion verstärken. Beispielsweise steigert T $\beta$ RIII/Betaglykan die Wirkung des TGF- $\beta$ , indem er die Affinität von TGF- $\beta$  zu T $\beta$ RII erhöht (Blobe et al., 2001; Letamendia et al., 1998). Die Transfektion von Fibroblasten mit Syndecan-2 führt zur gesteigerten Expression der TGF- $\beta$ -Rezeptoren Typ I und Typ II (Chen et al., 2004). Eine Signalbeeinflussung durch diesen indirekten Weg ist denkbar. Alternativ ist auch sowohl eine Wirkung über die Regulation von Proteinen möglich, die über Interaktion mit dem TGF- $\beta$ -Rezeptorkomplex die Bindung der R-Smads stabilisieren, als auch eine Beeinflussung der Transkriptionsfaktoren.

Widersprüchlich in Bezug auf die Signaltransduktion bei der Induktion von PAI-1 durch S1P ist die Unabhängigkeit vom Smad-Signalweg. Die Steigerung durch TGF- $\beta$  konnte mittels effizienter Ausschaltung des Smad4-Gens durch siRNA reduziert werden. Diese Ergebnisse wurden durch Behandlung der Fibroblasten mit Smad3-Antisense-ODN verifiziert und stehen im Einklang mit der Literatur. In Smad-3-Knockout-Fibroblasten wird der PAI-1-Promoter nach Stimulation mit TGF- $\beta$  nicht mehr aktiviert im Gegensatz zu Wildtyp-Fibroblasten (Datto et al., 1999; Piek et al., 2001). Sowohl in unserer als auch in anderen Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass S1P die Signalwege in Analogie zu TGF- $\beta$  aktivieren kann und in der Lage ist, über eine Phosphorylierung der Smads zu agieren (Sauer et al., 2004a; Xin

et al., 2004). So war es überraschend, dass sich die PAI-1-Aktivierung als Smad-unabhängig erwies. Allerdings wurde in der Literatur auch eine Steigerung der PAI-1-Expression in Smad4-defizienten Fibroblasten beschrieben. Hier wurde gezeigt, dass der PAI-1-Promoter zwei verschiedene TGF- $\beta$ -abhängige regulatorische Regionen aufweist, von denen nur eine den Smad-Komplex zur Aktivierung benötigt (Sirard et al., 2000). Möglicherweise sind auch bei der S1P-induzierten PAI-1-Bildung stärker noch als bei der durch TGF- $\beta$  hervorgerufenen Smad-unabhängige Signalwege beteiligt.

Auch die Pro-MMP-2-Spiegel waren nach Stimulation mit TGF- $\beta$  oder S1P als auch nach Kombination der beiden Stimulantien erhöht. Dies unterstreicht die regulatorische Rolle von TGF- $\beta$  und S1P bei der Wundheilung, da es bei dieser zu einer verstärkten Freisetzung von Proteinen der ECM kommt; neben MMP-2 und PAI-1 werden vermehrt Kollagene gebildet, aber auch die Expression der TIMPs ist erhöht (Wang et al., 2000). Durch die Bildung von proteolytischen Enzymen kommt es somit zur Gewebeumstrukturierung in der Narbe, die durch die verstärkte Sekretion der Inhibitoren begrenzt wird. Chronische Wundheilungsstörungen können daher sowohl die Folge einer überschießenden Proteinase-Aktivität sein als auch durch verminderte Aktivität der Inhibitoren entstehen (Edwards et al., 1996; Lobmann et al., 2002).

Die synergistische Wirkung von TGF- $\beta$  und S1P auf die Fibroblasten und die damit verbundene Förderung der Wundheilung wird durch den immunmodulatorischen Einfluss der beiden Stimulantien ergänzt. So werden durch die Ausschüttung von TGF- $\beta$  Monozyten in den Wundbereich gelockt, und auch S1P hat eine chemotaktische Wirkung auf Immunzellen (Ashcroft et al., 1999; Idzko et al., 2002). Fraglich ist, ob der wachstumshemmende Effekt der Stimulantien auf die Keratinozyten die Wundheilung negativ beeinflusst oder einer überschießenden Gewebswucherung entgegen wirkt; zu bedenken ist auch, dass physiologischerweise weitere Wachstumsfaktoren im Wundbereich vorhanden sind, die dem proliferationshemmenden Einfluss von TGF- $\beta$  und S1P entgegenwirken könnten.

### 4.3 Topische Arzneiformen mit S1P

S1P hat in einer Reihe von Untersuchungen Eigenschaften gezeigt, die es für eine topische Anwendung interessant erscheinen lassen. Ausgeprägt sind die antiproliferativen und differenzierungsfördernden Wirkungen auf dermale Keratinozyten, während in dermalen Fibroblasten die Proliferation gefördert wird; in beiden Zelltypen wirkt S1P migratorisch und zytoprotektiv (Hammer et al., 2004; Manggau et al., 2001; Vogler et al., 2003). Deshalb ist der Einsatz von S1P als Therapeutikum bei hyperproliferativen Hautkrankheiten wie der Psoriasis vulgaris denkbar. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass S1P in dermalen Zellen die Synthese von Matrixproteinen induziert, im Einklang damit konnte in unserer Arbeitsgruppe die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten nachgewiesen werden, die für die Kontraktion und damit den Verschluss von Wundgewebe zuständig sind. Allerdings wurden in dieser Arbeit auch Tendenzen des S1P zur Transformation der Keratinozyten gezeigt. Da diese im Vergleich zu TGF- $\beta$  eher schwach ausgeprägt sind und vor allem in Kombination mit TGF- $\beta$  relevant werden, wird sich die klinische Bedeutung erst durch *in vivo*-Studien abklären lassen. Nicht nur in Keratinozyten konnte gezeigt werden, dass Vitamin D<sub>3</sub> seine antiapoptotische Wirkung teilweise über eine Stimulierung der Sphingosinkinase entfaltet, auch in Melanozyten wirkt S1P zytoprotektiv. Dagegen hat S1P in Melanomzellen eine Apoptose-induzierende Wirkung (Manggau et al., 2001; Sauer et al., 2003). Dies lässt die Anwendung von S1P als topisches Therapeutikum ebenfalls attraktiv erscheinen.

Als Trägersystem für S1P wurden SLN gewählt. Diese stellen eine innovative Arzneiform mit adhäsiven Eigenschaften aufgrund ihrer geringen Partikelgröße dar. Die Folge ist ein okklusiver Effekt, der eine erhöhte Hydratation der Haut und eine bessere Penetration des Arzneistoffes ermöglicht (Walters, 1989). Außerdem bietet dieses Trägersystem den Wirkstoffen, die gelöst, dispergiert oder an der Oberfläche absorbiert vorliegen können, einen Schutz vor chemischer Zersetzung (Müller et al., 1995). Denkbar ist auch eine retardierte Freisetzung nach erfolgter Penetration der SLN, die allerdings eher dann zu erwarten ist, wenn der Wirkstoff im Lipid eingeschlossen ist. Vorteile gegenüber anderen topischen Trägerstoffen sind weiterhin eine geringe Toxizität und damit eine gute Hautverträglichkeit sowie die

Möglichkeit des *drug targeting* (Müller et al., 1997; Munster et al., 2005; Santos Maia et al., 2002). Für Sphingosin-haltige SLN-Zubereitungen konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits eine Anreicherung in der Epidermis gezeigt werden, aber keine Penetration durch die Haut, was auf eine geringe systemische Belastung *in vivo* hoffen lässt (Ruwisch, 2002). Auch für die Behandlung mit S1P ist es erstrebenswert, die systemische Exposition aufgrund des breiten Wirkspektrums des Sphingolipids möglichst niedrig zu halten, zumal bei hyperproliferativen Hautkrankheiten mit einer Therapie über einen längeren Zeitraum zu rechnen ist. Die Psoriasis vulgaris ist durch eine erhöhte Zellteilungsrate der basalen Keratinozyten gekennzeichnet, daher ist die Penetration des Wirkstoffs durch das Stratum Corneum zu den undifferenzierten Zellen der Basalschicht angestrebt. Dies soll durch die Assoziation des S1P an das Trägersystem erreicht werden. Eine Herausforderung stellt dabei die amphiphile Struktur des Sphingolipids dar. S1P besitzt neben dem langkettigen lipophilen Schwanz eine polare Kopfgruppe und ist im wässrigen neutralen Medium und in Fetten nicht bzw. sehr schwer löslich. Dementsprechend waren SLN, bei denen die Lösung des S1P in der heißen Fettphase erfolgte, nicht stabil und es kam nach kurzer Zeit zur Auskristallisation des Wirkstoffs. Aus diesem Grund wurde das S1P zunächst in einer NaOH-Lösung (10 mM), die als Tensid Poloxamer 188 enthielt, durch Erhitzen gelöst, nach Zugabe der Fettphase erfolgte die Herstellung der SLN nach dem Prinzip der Heißhomogenisation (Mehnert and Mader, 2001). Es wurde angenommen, dass sich das Sphingophospholipid dabei aufgrund seiner amphiphilen Struktur im Grenzbereich der SLN anreichert, hierdurch könnte auch eine zusätzliche Stabilisierung der Partikel erfolgen. Wurde S1P bei 85 °C in einer Poloxamer 188-haltigen NaOH-Lösung (10 mM) gelöst, kristallisierte das Sphingolipid beim Abkühlen der Lösung aus, dagegen erwiesen sich die so produzierten SLN über einen Zeitraum von mehreren Monaten als makroskopisch und mikroskopisch stabil. Als problematisch ist jedoch der recht starke Wirkstoffverlust während der Lagerung anzusehen. So betrug der Wirkstoffgehalt nach sechs Monaten nur noch ca. 50 % des Ausgangswerts.

## 4.4 Ausblick

S1P stellt aufgrund seines vielfältigen Wirkungsspektrums einen Ansatz für eine Reihe neuartiger Therapieoptionen dar. Als topische Arzneiform bietet sich S1P bei hyperproliferativen Erkrankungen wie beispielsweise der Psoriasis vulgaris an, da hier der wachstumshemmende und differenzierungsfördernde Einfluss auf die Keratinozyten im Vordergrund steht. Nachdem die Herstellung S1P-haltiger SLN gelang, steht nun eine Optimierung der Arzneiform bezüglich Stabilität und pH-Wert aus, auch die Wirkstoffverteilung in dem Trägersystem ist zu charakterisieren. Zur Abschätzung, ob sich S1P durch Adhäsion an die Partikel wie angestrebt in den oberen Hautschichten anreichern und eine systemische Belastung vermeiden lässt, müssen Penetrationsstudien mittels der Franz-Zell-Technik (Franz, 1975) an exzidierten Humanhaut oder alternativ an künstlichen Hautmodellen erfolgen.

Ein weiteres Einsatzgebiet für S1P könnte die Wundheilung darstellen. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, regt das Sphingolipid vor allem in der Kombination mit TGF- $\beta$  die Hautzellen zum Aufbau neuen Gewebes und zum Wundverschluss an. Interessant ist es nun, die Übertragbarkeit auf *in vivo*-Verhältnisse zu testen, hierzu sind Wundheilungsassays im Mausmodell angedacht, durch die auch die Relevanz des proliferationshemmenden Einflusses auf die Keratinozyten abgeklärt werden kann.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist das in dieser Arbeit erstmals gezeigte transformatorische Potential des S1P. Sollte sich herausstellen, dass das Sphingolipid ebenso wie TGF- $\beta$  die EMT in Tumorzellen stark forciert, bietet sich hier eine Antagonisierung des S1P-Signalwegs in invasiven Krebsformen an. Eine Option ist dabei die Hemmung des S1P<sub>1</sub>-Rezeptors, der nicht nur an der Induktion der EMT beteiligt ist, sondern auch Angiogenese und Vaskularisierung durch S1P vermittelt (Lee et al., 1999; Paik et al., 2004). Auf diese Weise wird die Metastasenbildung an unterschiedlichen Punkten gehemmt, was eine erhöhte Effektivität der Therapie erwarten lässt. Ein weiterer viel versprechender Ansatz ist den vorliegenden Ergebnissen zufolge die gleichzeitige Hemmung des TGF- $\beta$ - und des S1P-Signalwegs, da diese eine stark synergistische Wirkung auf die EMT der Epithelzellen zeigten. Hier bietet sich eine Blockade von gemeinsamen Zielstrukturen an; eine genaue Charakterisierung des Zusammenspiels zwischen TGF- $\beta$  und S1P

ist wünschenswert. Daran schließt sich die Frage nach der Signaltransduktion bei Regulation der Pro-MMP-2-Sekretion an, weil S1P und TGF- $\beta$  hier interessanterweise gegenläufige Effekte aufweisen.

Da auch FTY720 als Immunmodulator systemisch zum Einsatz kommen soll, scheint den vorliegenden Ergebnissen zufolge eine Prüfung auf metastasierendes und fibrotisches Potential an weiteren Zellsystemen sinnvoll, da auch FTY720 in Analogie zu S1P einen moderaten transformierenden Effekt aufwies.