

5 ZUSAMMENFASSUNG

Der Übergang von epithelialen zu mesenchymalen Zellen wurde zwar schon zu Beginn des 19. Jahrhunderts beobachtet, aber erst 1982 als epitheliale-mesenchymale Transformation (EMT) betitelt. Die EMT beschreibt einen Prozess, bei dem sich ruhende Epithelzellen aus ihrem Zellverband lösen und eine fibroblastenartige Gestalt annehmen, um nach Migration in entferntes Gewebe neue Strukturen aufzubauen. Während der EMT kommt es zur verminderten Expression spezifischer epithelialer Proteine, dagegen ist die Bildung mesenchymaler Proteine gesteigert. Dieses veränderte Expressionsmuster wird zur Charakterisierung der EMT herangezogen.

In vitro und *in vivo* konnte eine Beteiligung der EMT während der embryonalen Entwicklung und der Wundheilung, aber auch bei fibrotischen Prozessen und der Metastasierung von Karzinomen gezeigt werden. Der transformierende Wachstumsfaktor- β (TGF- β) wurde als ein bedeutender Auslöser der EMT in einer Vielzahl von Zelllinien, aber auch in einigen primären Zellen wie dem murinen Tubulusepithel und *in vivo* identifiziert. Dagegen ist wenig über die EMT in humanen primären Keratinozyten bekannt. In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass TGF- β einen migratorischen Effekt auf humane Keratinozyten besitzt. So war es von Interesse, die Zellen auch hinsichtlich ihres Transformierungspotentials nach Stimulation mit TGF- β zu überprüfen.

Der Lipidmediator Sphingosin-1-Phosphat, der lange Zeit nur als Strukturlipid betrachtet wurde, steuert ein weites Spektrum biologischer Prozesse einschließlich Zellmotilität, Ca^{2+} -Freisetzung, Umstrukturierung des Zytoskeletts und Immunität. Ähnlich wie TGF- β steigert S1P die Proliferation in Fibroblasten, hemmt dagegen das Wachstum in Keratinozyten und wirkt in beiden Zelltypen migratorisch. Als Auslöser der EMT ist S1P bislang nicht benannt worden, jedoch gibt es für das Sphingolipid Hinweise auf eine transformatorische Wirkung in Epithelzellen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl TGF- β als auch S1P die Keratinozyten in einen fibroblastoiden Phänotyp transformierte. Dies ging mit einer Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts und einer Modulation des untersuchten Protein- und mRNA-Expressionsmuster einher. Die Expression des epithelialen E-Cadherins wurde gehemmt, während die mesenchymalen Proteine α -Glattmuskelaktin (α -SMA) und Fibronectin verstärkt gebildet wurden. Die Matrixmetalloproteinasen Pro-MMP-2 und Pro-MMP-9, die nach Aktivierung die Basalmembran degradieren und den Zellen somit die Migration über die Extrazellulärmatrix ermöglichen, wurden

interessanterweise unterschiedlich reguliert. Während Pro-MMP-9 durch TGF- β und S1P gleichermaßen verstärkt exprimiert wurde, induzierte nur TGF- β eine gesteigerte Pro-MMP-2-Freisetzung, die Langzeit-Stimulation mit S1P hatte keinen Effekt auf die Pro-MMP-2-Synthese. Darüber hinaus ließ sich sogar zeigen, dass durch Vorinkubation bzw. Kostimulation mit S1P die TGF- β -induzierte Pro-MMP-2-Sekretion gesenkt werden konnte.

S1P vermittelt seine Wirkungen entweder intrazellulär oder über Bindung an die membranständigen, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren S1P₁₋₅. Alle untersuchten Parameter, einschließlich E-Cadherin- und Pro-MMP-2-Hemmung sowie Induktion von α -SMA und Pro-MMP-9, erwiesen sich als vollständig Pertussistoxin-sensitiv, intrazelluläre Signalwege schienen hier also eine untergeordnete Rolle zu spielen. Zur weiteren Charakterisierung der Beteiligung spezifischer Rezeptoren wurden die S1P-Agonisten SEW2871 und FTY720 eingesetzt. Während SEW2871 einen selektiven S1P₁-Agonisten darstellt, stimuliert FTY720 die vier S1P-Rezeptoren S1P_{1,3-5}. Es zeigte sich, dass E-Cadherin, α -SMA und Fibronectin durch die Agonisten in ähnlichem Ausmaß wie durch S1P moduliert wurden. Diese Effekte scheinen also hauptsächlich über S1P₁ vermittelt zu werden. Dagegen wurde Pro-MMP-9 durch SEW2871 und FTY720 nur in geringem Maß induziert. Dies lässt auf eine Beteiligung von S1P₂ schließen.

Die Signalwege, über die TGF- β eine EMT auslöst, unterscheiden sich in Abhängigkeit vom zellulären Kontext. Häufig sind Smads bei Induktion der EMT involviert. Durch Bindung des Liganden kommt es zur Bildung eines heteromeren Rezeptorkomplexes, in dem der TGF- β Typ I-Rezeptor durch den Typ II-Rezeptor phosphoryliert wird, um dann wiederum spezifische Substrate, die R-Smads, zu phosphorylieren. Die aktivierten R-Smads bilden mit dem Co-Smad Smad4 einen Komplex, der in den Kern wandert und dort die Genaktivität reguliert.

Auf der anderen Seite wurde auch die Beteiligung Mitogen-aktivierter Proteinkinasen bei Induktion der EMT gefunden, eine bedeutende Rolle spielen hier die extrazellulär-regulierten Kinasen (ERK). Frühere Arbeiten unseres Arbeitskreises zeigten, dass auch S1P den Smad-Signalweg aktivieren kann, so ist beispielsweise die Migration der Keratinozyten durch S1P Smad3-abhängig. Um die Relevanz des Smad-Signalwegs bei der EMT der Keratinozyten zu ermitteln, wurde spezifische siRNA gegen das Co-Smad Smad4 eingesetzt. Damit konnte nachgewiesen werden, dass die α -SMA-Induktion durch TGF- β und S1P Smad-abhängig reguliert wurde; die

TGF- β -induzierte Pro-MMP-2-Expression ließ sich durch den Einsatz der siRNA zumindest teilweise hemmen. Die Beteiligung des ERK-Signalwegs wurde durch Einsatz des spezifischen ERK-Inhibitors PD98059 geprüft. So konnte gezeigt werden, dass die Modulation des E-Cadherins und des Fibronektins durch TGF- β und S1P vollständig, die Induktion von Pro-MMP-9 dagegen teilweise ERK-abhängig war. Auch die TGF- β -induzierte Pro-MMP-2-Sekretion erwies sich zu einem großen Teil als ERK-abhängig. Die EMT in Keratinozyten durch TGF- β und S1P scheint also hauptsächlich über eine Kooperation des Smad- und des ERK-Signalwegs gesteuert zu werden.

Erwähnt werden muss allerdings, dass S1P in den Keratinozyten die EMT in geringerem Umfang als TGF- β induzierte. Während die Induktion von α -SMA und Pro-MMP-9 durch die beiden Mediatoren vergleichbar war, wurden die E-Cadherin- und Fibronektin-Expression durch S1P in deutlich schwächerem Ausmaß gesteigert als durch TGF- β . Von größerer Bedeutung scheint vor allem das Zusammenspiel zwischen S1P und TGF- β , da die Kostimulation der Keratinozyten mit TGF- β und S1P in jeweils niedrigen Konzentrationen zu additiven Effekten führte.

In dermalen Fibroblasten konnte ein ähnlich synergistischer Effekt in Bezug auf die Induktion des Plasminogenaktivator-Inhibitors-1 (PAI-1) und Pro-MMP-2 gezeigt werden. Die Bildung dieser Proteine stellt beim Aufbau neuen Gewebes im Rahmen der Wundheilung einen wichtigen Schritt dar. Auch hier wurde durch die Kombination jeweils niedriger Konzentrationen von S1P und TGF- β eine drastische Wirkungsverstärkung erzielt. Dies ist insofern von Bedeutung, als sowohl S1P als auch TGF- β in Thrombozyten gespeichert vorliegen und bei Bedarf in das Wundareal freigesetzt werden. Sowohl die S1P-induzierte PAI-1-Synthese als auch die durch Kostimulation hervorgerufene ließ sich durch einen Inhibitor des TGF- β Typ I-Rezeptors hemmen.

In der vorliegenden Arbeit wird somit erstmals das Potential von S1P zur Transformation epithelialer Zellen beschrieben. Weiterhin werden die relevanten Signalwege bei Induktion der EMT in Keratinozyten sowie die Wechselwirkungen zwischen S1P- und TGF- β -Signalwegen charakterisiert.

Interconversion between epithelial and mesenchymal cells was already described in the beginning of the 19th century, but not recognized as epithelial-to-mesenchymal transformation (EMT) until 1982. In the process of EMT epithelial cells scatter because of loss of cell-cell junctions, adopt a fibroblastic phenotype and migrate into distinct tissues to build new structures. During EMT, specific epithelial proteins are downregulated, while expression of mesenchymal proteins is enhanced. Thus, this changed expression pattern is taken to define the EMT.

EMT occurs during embryonic development and wound healing, but was also shown in fibrosis and tumour progression *in vitro* and *in vivo*. Transforming growth factor- β (TGF- β) has been identified as prominent elicitor of EMT in a variety of cell lines as well as in some primary cells like mouse tubular epithelial cells and *in vivo*. In contrast, little is known about EMT in human primary keratinocytes. Recently, our research team demonstrated a migratory effect of TGF- β on human keratinocytes. Therefore, it was of interest to investigate the effect of TGF- β on specific EMT markers in those cells.

The lipid mediator sphingosine 1-phosphate (S1P), long time considered only as a structure lipid, influences a broad spectrum of biological processes including cell motility, Ca^{2+} -release, reorganisation of the actin cytoskeleton and immunity. Similar to TGF- β , S1P enhances proliferation rates of fibroblasts, but significantly inhibits growth of human keratinocytes, whereas it acts as chemoattractant on both cell types. S1P has not been described as inducer of EMT so far, but there are hints at transformatory effects in epithelial cells by the sphingolipid.

Here, the ability of TGF- β as well as S1P to induce a fibroblastic phenotype in human primary keratinocytes is shown. The transformation was accompanied by formation of actin stress fibres and a switch of the investigated protein and mRNA expression pattern. Thus, repression of the epithelial E-Cadherin and a strong induction of the mesenchymal proteins α -smooth muscle actin (α -SMA) and fibronectin were found. Interestingly, the matrix metalloproteinases Pro-MMP-2 und Pro-MMP-9, which support invasion after activation by degrading epithelial basement membrane and initiate migration through the extracellular matrix were regulated differently. While stimulation with TGF- β and S1P enhanced Pro-MMP-9 expression to a similar extent, Pro-MMP-2 secretion was increased by TGF- β only. In contrast, stimulation with S1P could not raise Pro-MMP-2 expression even after exposure for a long time. Moreover,

preincubation and co-stimulation, respectively, with S1P and TGF- β repressed the TGF- β -induced Pro-MMP-2 secretion.

S1P mediates its action either intracellular or via the G-protein coupled receptors S1P₁₋₅. All investigated parameters, namely repression of E-Cadherin and Pro-MMP-2 as well as upregulation of fibronectin, α -SMA and Pro-MMP-9 were completely sensitive to pertussis toxin suggesting that intracellular targets of S1P play a minor role in mediating these effects. To address the participation of specific receptors in the EMT, cells were treated with the S1P-agonists FTY720 and SEW2871. While phosphorylated FTY720 acts as a potent agonist at four S1P receptors (S1P_{1; 3-5}), SEW2871 represents a selective agonist at S1P₁. Both agonists mimicked the effect of S1P on expression of E-Cadherin, α -SMA and fibronectin to a similar degree, suggesting a predominant involvement of S1P₁. In contrast, only a weak induction of Pro-MMP-9 by FTY720 as well as SEW2871 was observed, indicating participation of S1P₂.

Depending on the cellular context there are several pathways to mediate the EMT in response to TGF- β . One common pathway involved in EMT is the Smad pathway. Upon ligand-induced heteromeric complex formation, TGF- β type-I-receptors are phosphorylated by type-II-receptors and thereby phosphorylate specific receptor substrates, namely R-Smads. Activated R-Smads undergo complex formation with a common partner called Smad4 followed by nuclear translocation and gene modulation. On the other hand there are also reports of mitogen-activated protein kinase pathways mediating EMT, mainly extracellular signal-regulated kinases (ERK). As previous findings of our team showed activation of Smad-signalling by S1P in human keratinocytes, it was of interest to determine the impact of the Smad pathway in induction of EMT in human keratinocytes. Using specific siRNA against Smad4, the regulation of α -SMA in response to TGF- β and S1P was demonstrated to be Smad-dependent and, in part, Pro-MMP-2 induction in response to TGF- β as well. To estimate the involvement of ERK, cells were treated with PD98059, a specific ERK-inhibitor. Modulation of E-Cadherin and fibronectin in response to TGF- β and S1P appeared to be completely ERK-dependent, modulation of Pro-MMP-9 partly. Induction of Pro-MMP-2 by TGF- β was reversed using the ERK-inhibitor. Thus, EMT in human primary keratinocytes elicited by TGF- β and S1P seems to be mediated in cooperation of the Smad and the ERK signalling pathway. It has to be mentioned, that S1P was a weaker inducer of EMT compared to TGF- β . While both mediators

induced Pro-MMP-9 and α -SMA in a similar manner, E-Cadherin and fibronectin were regulated only moderately by S1P. The interaction between TGF- β and S1P seems to be more important since additive effects were observed after co-treatment of keratinocytes with TGF- β and S1P in low concentrations.

A similarly synergistic effect was shown in dermal fibroblasts regarding the induction of the plasmin activator inhibitor-1 (PAI-1) and Pro-MMP-2. During wound healing, expression of these proteins represents an important step for matrix formation and tissue remodelling. In agreement with findings in keratinocytes, co-stimulation with low concentrations of S1P and TGF- β leads to strong effect amplification. This becomes interesting with respect to the fact, that S1P as well as TGF- β are stored in platelets and released at wounded sites. Both, S1P and co-stimulation induced PAI-1 secretion was repressed using an inhibitor of the TGF- β type-I-receptor.

Thus, this work describes for the first time the ability of S1P to transform epithelial cells. Furthermore, signalling pathways for induction of EMT in human primary keratinocytes are identified as well as interactions between S1P and TGF- β signalling.