

1 Einleitung

1.1 Die Apoptose

1.1.1 Apoptotischer Signalweg

In allen Geweben besteht ein regulierendes Gleichgewicht zwischen Zellteilung und Zellsterben. Damit ist für das Überleben eines mehrzelligen Organismus der Zelltod von entscheidender Bedeutung. Man unterscheidet zwischen der Apoptose (programmierter Zelltod) und der Nekrose. Die Nekrose tritt nach Zellschädigung auf und ist charakterisiert durch den Verlust der Funktionsfähigkeit der Zytoplasmamembran, der Entleerung des zytoplasmatischen Inhalts in den Extrazellularraum und einer folgenden Entzündungsreaktion. Dagegen ist die Apoptose ein festgeschriebenes „*Suizidprogramm*“ in der Zelle, das zur Eliminierung der Zelle führt und somit die Möglichkeit gibt, kontrolliert defekte oder entartete Zellen aus dem Zellverband zu entfernen. Die Apoptose wurde 1972 erstmalig beschrieben (Kerr et al. 1972). Sie ist das Resultat energieabhängiger, regulierter zellulärer Reaktionswege. Apoptotische Zellen lassen sich morphologisch durch ein Abrunden und Ablösen der Zellen und eine Reduktion des Zellvolumens charakterisieren (Abb. 1). Während der Apoptose kommt es zur Kondensation des Chromatins und zur Fragmentierung der nukleären DNA durch gezielte Spaltung zwischen den Nukleosomen. Die Zellmembran bleibt bis zum Ende der Apoptose intakt, zeigt aber eine Vesikelbildung („*blebbing*“). Abschließend wird die Zelle fragmentiert und kleine, membranumschlossene Abschnürungen („*apoptotic bodies*“) gebildet, welche durch Phagozyten aufgenommen und eliminiert werden (Chang et al. 2000).

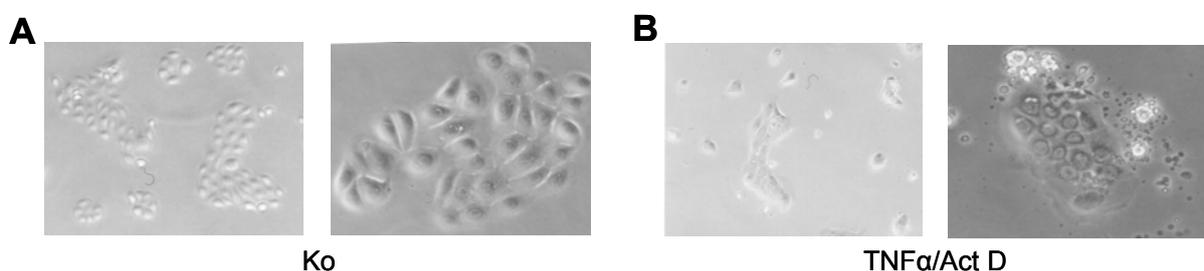


Abb. 1: Morphologie apoptotischer Zellen. Dargestellt ist der Phänotyp un behandelter (A) und apoptotischer Keratinozyten (B) (links: 100fache Vergrößerung; rechts: 320fache Vergrößerung).

Die meisten charakteristischen Veränderungen einer apoptotischen Zelle werden durch die Caspasen (Aspartat-spezifische Cysteinyl-Protease) ausgelöst. Die Mitglieder dieser Enzymfamilie werden während der Apoptose kaskadenartig in

großen Mengen aktiviert und vollstrecken auf diese Weise das apoptotische Programm. Diese Proteasen besitzen im aktiven Zentrum einen Cysteinylnrest, der spezifisch für alle Caspasen die Spaltung des Substrates an einem Aspartatrest katalysiert. Insgesamt konnten bisher spezieübergreifend 15 Mitglieder dieser Enzymfamilie identifiziert werden, von denen elf im Menschen exprimiert werden (Reed et al. 2003). Interessant ist das ausschließliche Vorkommen der Caspase-14 in der humanen Epidermis. Aufgrund ihrer Lokalisierung wird für sie eine Funktion der Differenzierung der Keratinozyten angenommen (Nicotera et al. 2007). Entsprechend ihrer Hauptfunktion gibt es neben den Caspasen, die das Apoptoseprogramm vermitteln, solche die an Entzündungsprozessen beteiligt sind. Die Caspasen der Apoptose lassen sich nach Aufbau und Funktion in zwei Gruppen einteilen, die Initiator- und die Effektor-Caspasen. Die Initiator-Caspasen besitzen eine Prodomäne, über welche sie in hochmolekularen Aktivierungskomplexen zur Initiierung der Caspasenkaskade rekrutiert werden. Während sich in der Prodomäne der Caspase-9 und -2 jeweils eine CARD (caspase recruiting domain) befindet, zeichnen sich die Prodomänen der Caspasen-8 und -10 durch das Vorhandensein zweier DED (death effector domain) aus (Thornberry 1998). Die Aktivierung der Initiator-Caspasen geschieht auf extrinsischem oder intrinsischem Wege (Zimmermann et al. 2001). Die zugrunde liegende Signaltransduktion ist in Abb. 2 zusammengefasst.

Der extrinsische Signalweg der Apoptose wird durch sogenannte Todesrezeptoren und ihre Liganden vermittelt. Todesrezeptoren sind Mitglieder der TNF- (tumor necrosis factor) Rezeptor-Superfamilie. Der am besten charakterisierte Signalweg ist der durch den Todesrezeptor Fas (CD95) vermittelte. Diese Rezeptoren besitzen eine cysteinreiche extrazelluläre Rezeptordomäne und eine zytoplasmatische Todesdomäne (DD, death domain). Sein Ligand, der FasL, ist ein homotrimeres Protein und vermag so drei Fas Moleküle zu binden. Dies verursacht eine Oligomerisierung der Rezeptoren, was ein Clustern der intrazellulären Todesdomänen zur Folge hat. Adapterproteine, die selbst Todesdomänen besitzen, können auf diese Weise rekrutiert werden. Ein solches Adapterprotein ist das FADD (Fas-associating death domain), das neben der DD noch eine DED besitzt, über welche die Initiator-Caspase-8 und -10 über ihre DED rekrutiert und aktiviert werden. Dieser Signalkomplex wird als DISC (death-inducing signaling complex) bezeichnet (Peter et al. 2003). Die aktivierten Initiator-Caspasen führen zur Aktivierung der

Effektor-Caspase-3 sowie der Caspase-6 und -7, die maßgeblich an der proteolytischen Fragmentierung des Zellinventars beteiligt sind und auf diese Weise die Apoptose induzieren (Nagata 2005).

Dagegen wird der intrinsische Signalweg der Apoptose durch eine Schädigung der Mitochondrien ausgelöst, die durch oxidativen Stress, Fehlregulation des zellulären pH Wertes oder Strahlung verursacht wird. Werden die Mitochondrien aktiviert, so wird Cytochrom c freigesetzt. Das ins Zytoplasma gelangte Cytochrom c bindet an Apaf-1 (apoptosis protease activating factor-1) und lagert sich in dieser Form in Gegenwart von ATP zum Heptamer zusammen. In dieser heptameren Form kann Apaf-1 über seine CARD die Caspase-9 rekrutieren und aktivieren. An diesem Apoptosom genannten, hochmolekularen Komplex werden nun in definierter Reihenfolge durch die Initiator-Caspase-9 die Effektor-Caspasen-3 oder -7 direkt und die Caspase-6 indirekt prozessiert und aktiviert. Schließlich mündet auch dieser Weg der Aktivierung der Caspasen in einer Degradation von Elementen des Zytoskeletts und der DNA (Riedl et al. 2007).

Die Freisetzung des Cytochrom c unterliegt jedoch der Kontrolle der Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie. Der Namensgeber dieser Familie, das Bcl-2, ist ein antiapoptotisch wirkendes Proto-Onkogen, das erstmals in humanen folliculären B-Zell Lymphomen (Bcl, B-cell lymphoma) identifiziert wurde (Hockenbery et al. 1990). Die Proteinfamilie besitzt anti- wie auch proapoptotische Mitglieder. So induzieren Bid (Bcl-2 interacting domain death agonist), Bax (Bcl-2 associated x protein) und Bak (Bcl-2 antagonist killer protein) eine Deregulation der Membranfunktion des Mitochondriums, nachdem sie durch die Initiator-Caspasen direkt oder indirekt aktiviert wurden. Die Antagonisten der Freisetzung von Cytochrom c sind die antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie: Bcl-2 und Bcl-xL. Diese permanent aktiven, antiapoptotischen Faktoren halten die Funktionsfähigkeit bestimmter Membrankanäle in der Mitochondrienmembran aufrecht. Der Erfolg der Induktion der Apoptose wird demnach eng durch die Expressionsmengen pro- und antiapoptotischer Proteine der Bcl-2 Familie kontrolliert (Adams et al. 2001).

Diese extrinsischen und intrinsischen Wege zur Auslösung der Apoptose sind jedoch nicht unabhängig voneinander zu sehen, da viele Vernetzungspunkte bestehen. So aktiviert die Caspase-8 Bid zu tBid (truncated Bid), welches wiederum Bax und Bak

aktiviert, die neben der Störung der Membranfunktion des Mitochondriums, die Expression der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL hemmen (Esposti 2002).

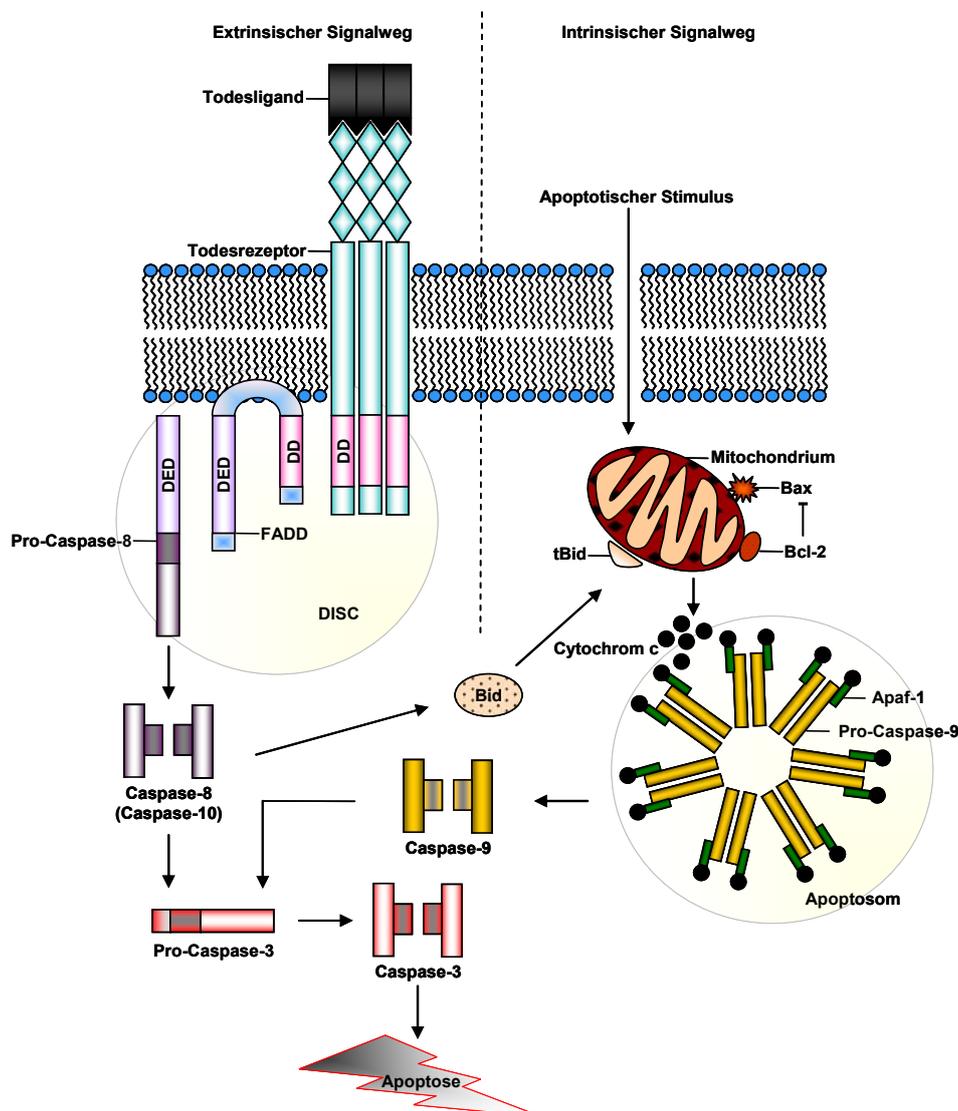


Abb. 2: Der extrinsische und intrinsische Signalweg der Apoptose

1.1.2 Bedeutung der Apoptose in der Haut

Für die Aufrechterhaltung der epidermalen Homöostase ist die Apoptose von entscheidender Bedeutung. Keratinozyten stellen die Hauptpopulation der Epidermis, deren Apoptoseprogramm ist damit essentiell für die Bildung des Stratum Corneums. Für dessen Bildung ist eine besondere Form der Apoptose in Keratinozyten verantwortlich, die terminale Differenzierung (Lippens et al. 2005). Die Zellen des Stratum Corneums, die Korneozyten, sind durch den Verlust von Zellkern und Organellen metabolisch und mitotisch inaktiv. Terminale Differenzierung und Apoptose führen demnach zu ähnlichen Ereignissen wie Kondensation des

Chromatins oder Abbau der zellulären DNA, jedoch steht am Ende der terminalen Differenzierung nicht der Verlust der Zelle, sondern die Bildung des Stratum Corneums (McCall et al. 1991). Die Bedeutung des apoptotischen Programms für diese Vorgänge ist an der Expression der pro- und antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie abzulesen. So zeigen basale Keratinozyten im Gegensatz zu suprabasalen Zellen eine erhöhte Expression des antiapoptotischen Bcl-2 Proteins. Dagegen ist der Gradient der Expression des proapoptotischen Bak Proteins entgegengesetzt gerichtet und Bak wird am stärksten in suprabasalen Keratinozyten exprimiert (Hockenbery et al. 1991; Krajewski et al. 1996). Weiterhin ist die Apoptose wichtig, um funktionsgeschädigte Zellen nach Exposition von UV-Strahlung oder genetisch veränderte Zellen zu eliminieren (Chow et al. 2005).

Doch spielt der geregelte Zelltod auch in der Pathogenese einiger Erkrankungen der Haut eine wesentliche Rolle. Eine verminderte oder gesteigerte Apoptose der Keratinozyten ist mit dem chronischen oder akuten Verlauf der Erkrankungen der Haut assoziiert. So sind nach andauernder UV-Exposition histologisch sogenannte *sunburn cells* in der Epidermis zu finden, die als apoptotische Zellen identifiziert wurden (Sheehan et al. 2002). Bei der Psoriasis, einer benignen hyperproliferativen Erkrankung, ist die TNF α -induzierte Apoptose aufgrund irregulärer Signaltransduktion durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B (nukleärer Faktor κ B) supprimiert (Victor et al. 2003). Daneben kann die bei der Psoriasis auftretende verminderte Apoptose durch Seneszenz der Keratinozyten, eine gesteigerte Expression von Bcl-xL und Survivin sowie eine gesteigerte Sekretion des antiapoptotisch wirkenden Interleukin-15 (IL, Interleukin) vermittelt werden. Eine geminderte Apoptose kann durch Mutation oder Deletion des Tumorsuppressorproteins p53 oder eine verminderte Expression von Todesrezeptoren begründet sein (Raj et al. 2006). Dies kann im Falle der Basalzellen oder der Zellen des Plattenepithels zur Entstehung des Hautkrebses führen. Auch hierbei wird die Apoptose durch eine gesteigerte Expression von Bcl-2, Bcl-xL oder Survivin vermindert induziert (Eberle et al. 2007).

1.2 Die Proliferation

1.2.1 Der Zellzyklus

Neben der Apoptose ist auch die Proliferation der Zellen von großer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase. Das Wachstum der Zellen wird durch den Zellzyklus gesteuert. Der Zellzyklus beschreibt den Zeitraum zwischen zwei mitotischen Zellteilungen, dessen Resultat die Proliferation ist. Der Zellzyklus unterteilt sich in vier verschiedene Phasen:

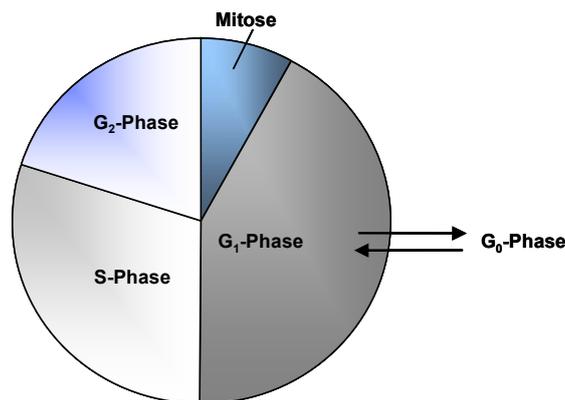


Abb. 3: Der Zellzyklus

- Die postmitotische G₁-Phase ist gekennzeichnet durch die Synthese von RNA und Proteinen.
- Unter ungünstigen Umständen wie Substratmangel tritt die Zelle in eine Ruhephase, die G₀-Phase, ein.
- In der S-Phase findet die Synthese der DNA statt, was zur Verdopplung des Genoms führt.
- Mit der G₂-Phase endet die Interphase, die Phase zwischen zwei Mitosen.
- In der Mitosephase ruhen alle Syntheseprozesse. Die Tochterzellen enthalten den doppelten Chromosomensatz (Berges et al. 1993).

Das Fortschreiten des Zellzyklus wird durch ein komplexes Zusammenspiel zwischen Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK, cyclin-dependent kinase), Cyclinen und CDK-Inhibitoren (CDKI) reguliert (Ko et al. 1997). CDK werden während des gesamten Zellzyklus gebildet, sind jedoch nur in Verbindung mit speziellen Cyclinen während bestimmter Phasen aktiv. An den Kontrollpunkten des Zellzyklus werden phasenspezifisch die Cycline synthetisiert. Im Gegensatz zu den E-, A- und F-Cyclinen reagieren die D-Cycline auf extrazelluläre Signale, deren Aktivität bis zur

späten G₁-Phase benötigt wird. Das Cyclin/CDK-Dimer phosphoryliert Zielstrukturen und führt somit zur Progression des Zellzyklus (Lew et al. 1996). Wenn eine Zelle aufgrund von Stress oder Genalterationen nicht in den Zellzyklus eintreten soll, werden CDKI verstärkt exprimiert. Sie verhindern eine Phosphorylierung der Substrate der Cycline. Die Mitglieder der Cip/Kip-Familie (Cip/Kip, CDK inhibiting protein/kinase inhibiting protein) repräsentieren universelle Inhibitoren der Cyclin/CDK-Komplexe, deren Überexpression zur Blockade des Zellzyklus führt. Die wichtigsten Vertreter sind dabei p21^{Waf1/Cip1} und p27^{Kip1} (Nakayama et al. 1998).

1.2.2 Bedeutung der Proliferation in der Haut

Die Vermittlung mitogener Signale durch die Progression des Zellzyklus offenbart die große physiologische Bedeutung dieser Regulation in der Haut. Die Haut besteht von außen nach innen aus Epidermis, Dermis und Subkutis. Die Proliferation spielt eine essentielle Rolle in der Aufrechterhaltung der epidermalen Homöostase. Die Epidermis ist ein geschichtetes, verhornendes Plattenepithel, das sich in einem ständigen Umwandlungsprozess befindet, in dessen Verlauf sich die Keratinozyten in kernlose Korneozyten umwandeln (terminale Differenzierung) (Candi et al. 2005). Dies führt zur Bildung der äußersten Schicht der Haut, dem Stratum corneum. Durch Abschilferung kommt es zum ständigen Verlust der Korneozyten. Dieser Verlust wird durch kontinuierliche Neubildung der Zellen im Stratum basale ausgeglichen. Das Stratum basale, das mit der Basalmembran den Abschluss der Epidermis darstellt, gewährleistet demnach die Regeneration der Epidermis. Von den Keratinozyten, die die Hauptzellpopulation in der Epidermis darstellen, sind daher lediglich die Zellen des Stratum basale mitotisch aktiv (Watt 1998; Fuchs et al. 2002). Die Proliferation der basalen Keratinozyten wird durch verschiedene Wachstumsfaktoren wie TGFβ (transforming growth factor β) oder EGF (epidermal growth factor) über Eingriff in den Zellzyklus kontrolliert (Gillitzer et al. 2001).

Daneben ist die Proliferation von großer Bedeutung für die epidermale Wundheilung. Die Wundheilung ist charakterisiert durch eine kritische Balance zwischen Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten (Pankow et al. 2006). Der gesamte Wundheilungsprozess wird auch hier durch zahlreiche synergistisch wirkende Wachstumsfaktoren kontrolliert (Martin 1997). Die Phase der Reepithelialisierung ist durch eine besonders starke Proliferation der Keratinozyten

charakterisiert. Abschließend kommt es durch Migration der Keratinozyten zum Verschluss der Wunde (Santoro et al. 2005).

Doch neben der physiologischen Bedeutung der Proliferation der Keratinozyten in der Haut, führt eine Deregulation des Zellwachstums zu zahlreichen pathologischen Veränderungen. So ist Psoriasis vulgaris eine Erkrankung der Haut, die morphologisch durch eine Hyperproliferation der Epidermis charakterisiert ist. Neben der übermäßigen Proliferation der Keratinozyten ist psoriatische Haut durch T-Zell-induzierte Entzündung, abnorme Zelldifferenzierung und Akkumulation neutrophiler Granulozyten in der oberen Epidermisschicht charakterisiert (Prinz 2003). Als weitere Hyperkeratose ist die Akne zu nennen. Diese Hauterkrankung ist mit erhöhter Proliferationsrate follikulärer Keratinozyten, gesteigerter Talgproduktion und lokaler Entzündungsreaktion assoziiert (Toyoda et al. 2001).

Daneben zeigt sich die Pathogenese des Hautkrebses in übermäßigem Wachstum der Hautzellen. So ist die Aktinische Keratose zunächst in einer histologisch unregelmäßigen Epithelproliferation und einer gestörten Verhornung zu erkennen (Scheinfeld 2007). Die Entartung der Aktinische Keratose kann zur Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms führen, welches durch Deregulation des Zellzyklus zu unkontrolliertem Zellwachstum führt (Kudo et al. 2005). Jedoch hat eine Hyperproliferation der Epidermis nicht immer die Bildung von Tumoren zur Folge, denn in intaktem Gewebe ist ein Ausgleich über eine verstärkte Apoptoserate gegeben (Marks et al. 1993).

1.3 Die Akt Kinase

1.3.1 Aktivierung der Akt Kinase

Die Proteinkinase Akt (synonym zu Proteinkinase B) ist eine Serin-Threonin-Kinase, die zahlreiche zelluläre Signalwege wie Proliferation, Apoptose oder der Steuerung der Transkription reguliert. Bisher sind drei Akt Isoformen (Akt1, Akt2, Akt3) bekannt, die eine stark konservierte Struktur der Domänen aufweisen.



Abb. 4: Domänenstruktur der humanen Akt Kinase

Die Pleckstrin-homologe Domäne (PH-Domäne) an der N-terminalen Seite des Proteins kann mit den Lipiden der Membran interagieren. Die katalytische Kinase Domäne befindet sich im zentralen Bereich des Proteins, die regulatorische Domäne im C-terminalen Bereich. Wie Abb. 4 zeigt, kann das Enzym an den zwei dargestellten Positionen Thr³⁰⁸ und Ser⁴⁷³ phosphoryliert werden. Auf diese Weise wird die Aktivität der Kinase reguliert (Scheid et al. 2003).

Die Akt Kinase ist ein Zielprotein der Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), welche durch Rezeptortyrosinkinasen oder G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR, G-protein-coupled receptors) aktiviert wird. Die aktivierte PI3K katalysiert an der Zytoplasmamembran die Bildung des *Second Messenger* Phosphoinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃). Durch die hochaffine Bindung des PIP₃ an die PH-Domäne der Akt Kinase wird die Kinase zur Zytoplasmamembran rekrutiert. Die Assoziation mit der Zytoplasmamembran führt zu einer Konformationsänderung des Proteins. Daher ist der Angriff der Phosphoinositol-abhängigen Kinasen (PDK, phosphoinositide-dependent kinase) ermöglicht, welche die Akt Kinase durch Phosphorylierung aktivieren. Da der Level an PIP₃ der strengen Kontrolle durch die Phosphatase PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) unterliegt, kann auch auf diese Weise die Aktivität der Akt Kinase reguliert werden. Die PI3K ist demnach nicht direkt für die Phosphorylierung der Akt Kinase verantwortlich. Die Phosphorylierung von Thr³⁰⁸ wird durch die PDK1 vermittelt. Für die volle Aktivierung des Enzyms ist eine Phosphorylierung an Ser⁴⁷³ notwendig, deren Mechanismus dagegen nicht vollständig geklärt ist. Diskutiert wird auch hier eine Beteiligung der PDK1, welche sowohl eine direkte als auch eine indirekte Phosphorylierung vermitteln kann. Ebenso kann eine Phosphorylierung an Ser⁴⁷³ durch Autophosphorylierung, durch die PDK2 oder die Integrin-linked Kinase (ILK) erfolgen (Kandel et al. 1999).

Die Vermittlung der Aktivierung der Akt Kinase durch die PI3K ist sicherlich der dominanteste Weg, jedoch sind auch PI3K-unabhängige Signalwege zur Aktivierung der Akt Kinase beschrieben worden (Song et al. 2005). So konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung der Akt Kinase durch die Proteinkinase A (PKA, cGMP-abhängige Proteinkinase), die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Kinase oder durch die Assoziation mit Hitzeschockproteinen demnach auch PI3K-unabhängig erfolgen kann (Konishi et al. 1997; Filippa et al. 1999; Perez-Garcia et al. 2004).

1.3.2 Rolle der Akt Kinase in der Regulation der Apoptose

Die Akt Kinase ist einer der dominantesten Vermittler des Schutzes der Zelle vor Apoptose. Diese kann direkte oder indirekte Effekte über eine Regulation der Transkription auf den Signalweg der Apoptose ausüben. So übt die Akt Kinase einen direkten Einfluss auf das Bad Protein aus und inaktiviert dieses durch Phosphorylierung. Darüber hinaus wird die Aktivität der Caspase-9 durch direkte Phosphorylierung durch die Akt Kinase gehemmt. Der indirekte Eingriff in die Apoptose wird über eine Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren vermittelt, die sowohl für pro- als auch antiapoptotische Gene verantwortlich sind. Auf diese Weise ist eine Beeinflussung von Transkriptionsfaktoren der Forkhead Familie möglich, deren Zielgene der FasL, TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), TRADD (TNF receptor type I associated death domain) oder proapoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie darstellen. Auch der Transkriptionsfaktor NF- κ B wird durch die Akt Kinase indirekt über eine Phosphorylierung der I κ B Kinase (I κ B, inhibitor κ B) reguliert. Die Aktivierung von NF- κ B führt zur Transkription von NF- κ B-abhängigen zytoprotektiven Genen wie Bcl-xL oder Hemmstoffen der Caspasen. Daneben führt eine Phosphorylierung des mdm2 (murine double minute 2) durch die Akt Kinase zu einer Induktion der Aktivität der Ubiquitin-Ligase des mdm2 und somit zu einem verstärkten Abbau des Tumorsuppressorproteins p53. Dies verhindert die p53-vermittelte Transkription proapoptotischer Gene (Song et al. 2005).

1.3.3 Rolle der Akt Kinase in der Regulation der Proliferation

Die Proliferation der Zellen wird durch eine Reihe von Wachstumsfaktoren beeinflusst, die über eine Aktivierung der Akt Kinase die Progression des Zellzyklus fördern (Liang et al. 2003). Tatsächlich führt eine Überexpression der Akt Kinase zu einer deutlich verstärkten Progression des Zellzyklus (Cheng et al. 1997). So kann die Akt Kinase die Expression des Cyclins D1 auf Ebene der Transkription, Translation und Proteinstabilität regulieren und auf diese Weise dessen Expression fördern (Nicholson et al. 2002). Daneben kann die Akt Kinase eine Beeinflussung der CDKI hervorrufen. So führt die Phosphorylierung des p21^{Waf1/Cip1} durch die Akt zu einem proliferativen Effekt, dessen genaue Ursache entweder in der Hemmung der Assoziation der CDKI mit den CDK oder im Austritt des p21^{Waf1/Cip1} aus dem Zellkern zu sehen ist (Rossig et al. 2001; Zhou et al. 2001). Auch p27^{Kip1} kann in ähnlicher Weise durch die Akt Kinase phosphoryliert werden. Daneben fördert die Akt Kinase

die Progression des Zellzyklus durch eine Induktion der Expression von p27^{Kip1} (Nicholson et al. 2002).

1.4 Lysophospholipide

Lysophospholipide sind bioaktive Lipide, die an zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Abläufen in verschiedenen Zelltypen und Geweben beteiligt sind, daher geht ihre Bedeutung weit über die Funktion als Strukturkomponenten der Lipiddoppelmembran hinaus. So regulieren die Lysophospholipide Sphingosin-1-phosphat (S1P) und Lysophosphatidsäure (LPA) ein weites Spektrum biologischer Prozesse einschließlich Apoptose, Proliferation, Zellmotilität, Ca²⁺-Freisetzung und Angiogenese (Saba 2004).

1.4.1 Biosynthese und Metabolismus des S1P

Ursprünglich wurde S1P als bloßes Intermediat im Metabolismus des Sphingosins betrachtet. Doch seit der Entdeckung, dass S1P die zelluläre Proliferation und Apoptose zu regulieren vermag, wurde eine Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen identifiziert, die durch S1P vermittelt werden (Olivera et al. 1993; Cuvillier et al. 1996). Vergleichbar mit anderen Botenstoffen wird der Level an verfügbarem S1P durch die Balance zwischen Synthese und Abbau bestimmt (Abb. 5).

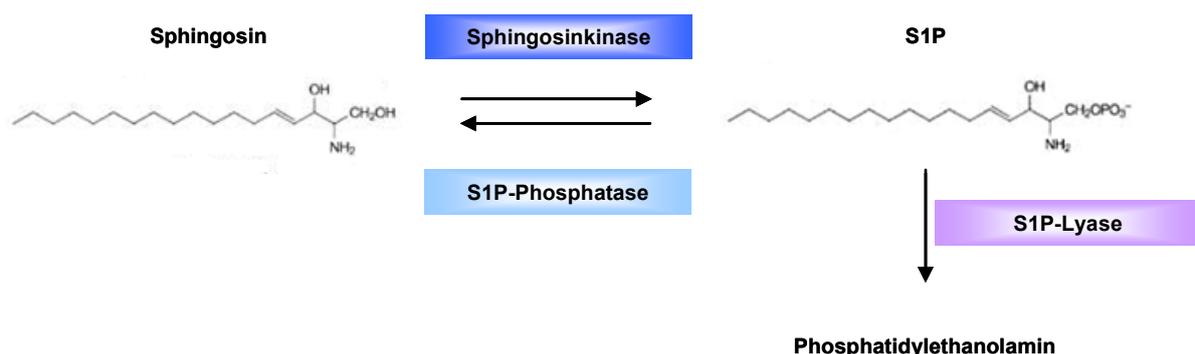


Abb. 5: Bildung und Abbau des S1P nach (Spiegel et al. 2003b)

Das für den zellulären Level an S1P entscheidende Enzym ist die Sphingosin-Kinase (SphK), welche die Phosphorylierung des Sphingosins katalysiert. Der Abbau des S1P kann über zwei Wege vermittelt werden: über die reversible Dephosphorylierung zurück zum Sphingosin durch eine spezifische S1P-Phosphatase oder über den

irreversiblen Abbau durch die S1P-Lyase zu Hexadecenal und Phosphoethanolamin und schließlich zu Phosphatidylethanolamin (Spiegel et al. 2003b). Aus der Klasse der Lipidkinasen sind zwei Isoenzyme der SphK bekannt, SphK1 und SphK2 (Liu et al. 2002). Dabei ist die SphK1 am stärksten in Lunge und Milz exprimiert, wohingegen die höchste Expression der SphK2 in Herz und Leber zu finden ist. Bedingt durch die Unterschiede in der Lokalisation, der Kinetik und der Regulation der Expression vermitteln die Isoformen verschiedene Effekte (Alemany et al. 2007). Das Substrat der SphK, das Sphingosin, kann durch Neusynthese oder durch Hydrolyse von Membranlipiden gebildet werden. Die Neusynthese startet mit der Kondensation von Serin und Palmitoyl-CoA, welche durch die Serinpalmitoyltransferase vermittelt wird (Merrill 2002). Nach der Reduktion des Produktes zu Sphinganin (Dihydrosphingosin) erfolgt eine Acetylierung zu Dihydroceramiden, in welche eine *trans*-4,5-Doppelverbindung unter Vermittlung einer Desaturase eingebaut wird. Auf diese Weise entstehen Ceramide, die weiter zu Glykosphingolipiden, zu Ceramid-1-phosphat oder zum Membranlipid Sphingomyelin umgesetzt werden (van Meer et al. 2000). Das Sphingomyelin kann jedoch unter Vermittlung der Sphingomyelinase zu Ceramid abgebaut werden (Levade et al. 1999). Die Bildung von Sphingosin, der Vorstufe des S1P, erfolgt aus Ceramid unter Vermittlung der Ceramidasen. Diese lassen sich in drei Klassen, saure, basische und neutrale Ceramidasen, einteilen, die sich im pH Optimum, der Primärstruktur und der Lokalisation unterscheiden (Tani et al. 2007).

Diese Neusynthese der Sphingolipide kann mit der Bildung der Ceramide, besonders des C₁₆-Ceramids zur Caspasenaktivierung und damit zur Apoptose führen. So sind Ceramidsynthase, welche die Bildung von Ceramid aus Sphingosin katalysiert, Sphingomyelinase oder Serinpalmitoyltransferase während der Apoptose aktiviert (Kolesnick et al. 1999). Der Sphingolipid Rheostat ist daher bestimmend für das Schicksal der Zelle. So wirken Sphingosin und Ceramide proapoptotisch und antimitogen, während S1P antiapoptotisch und in einer Vielzahl von Zellen mitogen wirkt. Daher sind SphK und S1P-Phosphatase die entscheidenden Regulatoren des Sphingolipid Rheostats (Kolesnick et al. 1999; Hannun et al. 2002). Die SphK kann durch eine Reihe von Wachstumsfaktoren aktiviert werden, was zu einer Erhöhung der intrazellulären S1P Spiegel führt und damit zu einem antiapoptotischen Effekt (Spiegel et al. 2002).

1.4.2 Biosynthese und Metabolismus des LPA

Effekte des Lysophospholipids LPA (1-Acyl-Glycerol-3-phosphat) sind schon lange bekannt (Vogt 1949). Doch geriet LPA erst 1990 in den Fokus des Interesses der Forscher als eine mitogene Wirkung des LPA über spezifische Rezeptoraktivierung in Fibroblasten beschrieben wurde (van Corven et al. 1989). Die höchste Konzentration an LPA liegt im Serum vor, wobei LPA, wie auch S1P, vor allem aus aktivierten Blutplättchen freigesetzt wird. LPA kann sowohl im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und zu komplexen Phospholipiden verstoffwechselt werden, als auch durch Hydrolyse von bereits bestehenden Phospholipiden nach Zellaktivierung generiert werden. LPA entsteht durch den intra- oder extrazellulären Abbau von Phospholipiden durch Phospholipasen, insbesondere durch die Phospholipase A₂ und D. In der Hauptquelle des LPA, in Thrombozyten, wird Phosphatidsäure durch die Phospholipase A₂ deacyliert. Die wichtigsten Synthesewege sind in Abb. 6 zusammengefasst (Moolenaar et al. 2004).

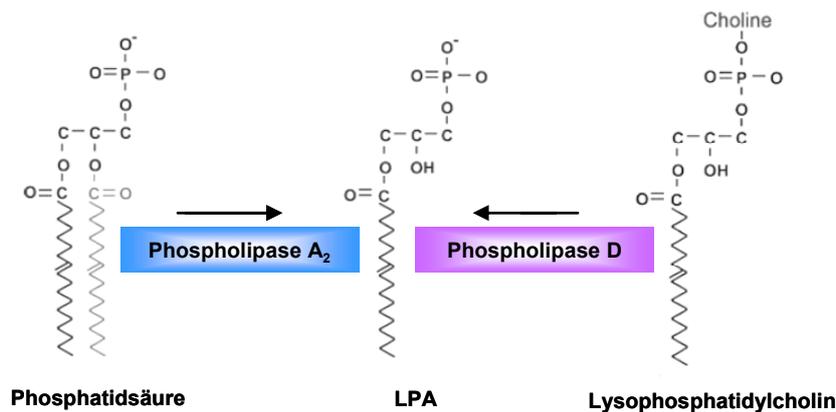


Abb. 6: Synthese des LPA (Moolenaar et al. 2004)

1.4.3 Lysophospholipide als Rezeptoragonisten

S1P und LPA vermitteln fast alle ihrer biologischen Funktionen über membranständige Rezeptoren, die ursprünglich als Edg-Rezeptoren bezeichnet wurden. Der Name leitet sich vom ersten Mitglied der *edg*-Genfamilie (*edg*, endothelial differentiation gene) ab, das den Differenzierungsprozess von Endothelzellen induziert und 1990 erstmals kloniert werden konnte. Es wurde daher EDG 1 genannt (Hla et al. 1990). Das Akronym Edg besitzt allerdings nur direkten Bezug zum Edg 1 Rezeptor und besitzt keinerlei Relevanz für die übrigen Rezeptoren. Die Bedeutung dieses Rezeptors für S1P wurde erst später mit der

Identifizierung von S1P als hochaffinen Liganden erkannt (Lee et al. 1998). Daraufhin wurden die Rezeptoren nach den Empfehlungen der International Union of Pharmacology (IUPHAR) anhand des Liganden mit der höchsten Affinität bezeichnet. Inzwischen konnten folgende Lysophospholipidrezeptoren identifiziert werden: S1P₁ (Edg 1), S1P₂ (Edg 5), S1P₃ (Edg 3), S1P₄ (Edg 6), S1P₅ (Edg 8) und LPA₁ (Edg 2), LPA₂ (Edg 4), LPA₃ (Edg 7), LPA₄ (GPR23) sowie LPA₅ (GPR92) (Noguchi et al. 2003; Radeff-Huang et al. 2004; Lee et al. 2007). Im Folgenden wird die Nomenklatur nach IUPHAR verwendet.

Die S1P- und LPA-Rezeptoren gehören zu den G-Protein gekoppelten, transmembranären, heptahelikalen Rezeptoren. S1P₁₋₃ und LPA₁₋₃ werden ubiquitär exprimiert, wohingegen S1P₄ nur im hämatopoetischen Gewebe sowie im Immunsystem vorkommt. S1P₅ wird hauptsächlich im Gehirn und in der Milz exprimiert (Anliker et al. 2004). Darüber hinaus wurden noch drei weitere GPCR entdeckt, die nur zu 40 % homolog zu den klassischen S1P Rezeptoren sind. Sie sind jedoch ebenso durch den Agonisten S1P aktivierbar. So vermitteln GPR3, GPR6 und GPR12 eine PTX-sensitive Induktion der intrazellulären Ca²⁺-Freisetzung (Uhlenbrock et al. 2002).

Die S1P und LPA Rezeptoren sind über verschiedene G-Proteine an multiple Effektorsysteme gekoppelt. S1P₁ koppelt jedoch als einziger S1P Rezeptorsubtyp ausschließlich über G_i-Proteine. Trotzdem führt seine Aktivierung zu verschiedensten zellulären Effekten. So führt eine Aktivierung des S1P₁ zu einer Förderung der Proliferation durch Aktivierung der ERK (extracellular signal-regulated kinase) oder eine antiapoptotische Wirkung durch Aktivierung des PI3K/Akt Signalweges. S1P₂ koppelt mit G_i-, G_q-, G_{12/13}-Proteinen und vermittelt auf diese Weise eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) sowie einen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ([Ca²⁺]_i). Durch die Wirkung auf die kleinen G-Proteine Rho und Rac ruft S1P₂ eine Hemmung der Migration zahlreicher Zellen hervor. Wie S1P₂ koppelt S1P₃ mit G_i-, G_q-, G_{12/13}-Proteinen. Dieser Rezeptorsubtyp vermittelt eine Aktivierung der PLC und einen Anstieg von [Ca²⁺]_i sowie eine Aktivierung der ERK, Rho und Rac Kinase. Über eine Aktivierung des PI3K/Akt Signalweges durch den S1P₃ Rezeptorsubtyp wird ein antiapoptotischer Effekt ausgeübt (Pyne et al. 2000; Kluk et al. 2002; Spiegel et al. 2002; Meyer zu Heringdorf 2004).

Ein funktionaler Antagonismus kommt zwischen dem S1P₁ und S1P₂ Rezeptor zum Tragen, da ihre Aktivierung entweder eine starke Stimulation oder eine Hemmung

der Migration hervorrufen. Ein weiterer gegensätzlicher Effekt wird durch S1P₅ vermittelt, der im Gegensatz zu den anderen S1P Rezeptorsubtypen eine Hemmung der Proliferation durch eine Hemmung der ERK hervorruft (Meyer zu Heringdorf et al. 2007). Für sowohl LPA als auch S1P sind antiapoptotische Effekte durch eine Aktivierung der PI3K wie auch der ERK unter Vermittlung ihrer Rezeptoren beschrieben worden. Auch wird die Regulation der Proliferation durch beide Lysophospholipide als rezeptorvermittelter Prozess beschrieben, wobei für S1P wie auch LPA sowohl mitogene als auch antimitogene Effekte beschrieben werden (Radeff-Huang et al. 2004).

Tab. 1: Signaltransduktion der Lysophospholipide (Lee et al. 2007; Meyer zu Heringdorf et al. 2007)

Rezeptor	G-Protein-Kopplung	Signaltransduktion
S1P ₁	G _i	Adenylatcyclase (AC)↓, ERK↑, PI3K↑, Rac↑
S1P ₂	G _i , G _q , G _{12/13}	[Ca ²⁺] _i ↑, ERK↑, PLC↑, Rac↓, Rho↑
S1P ₃	G _i , G _q , G _{12/13}	[Ca ²⁺] _i ↑, ERK↑, PI3K↑, PLC↑, Rac↑, Rho↑
S1P ₄	G _i , G _{12/13}	[Ca ²⁺] _i ↑, ERK↑, PLC↑, Rho↑↓
S1P ₅	G _i , G _{12/13}	AC↓, ERK↓, JNK↑
LPA ₁	G _i , G _q , G _{12/13}	AC↓, [Ca ²⁺] _i ↑, ERK↑, PI3K↑, Rac↑, Rho↑, PLC↑
LPA ₂	G _i , G _q , G _{12/13}	AC↓, [Ca ²⁺] _i ↑, ERK↑, PI3K↑, Rho↑, PLC↑
LPA ₃	G _i , G _q	AC↑↓, [Ca ²⁺] _i ↑, ERK↑, PLC↑
LPA ₄	G _i , G _q , G _{12/13} , G _s	AC↑, [Ca ²⁺] _i ↑, Rho↑
LPA ₅	G _q , G _{12/13}	AC↑, [Ca ²⁺] _i ↑

Im Gegensatz zum LPA vermittelt S1P seine Wirkung nicht nur als Ligand der GPCR, denn S1P kann durch verschiedene Stimuli nach Aktivierung der SphK gebildet werden. Doch wird die Bedeutung des S1P als intrazellulärer *Second Messenger* konträr diskutiert (Spiegel et al. 2003a).

1.4.4 Lysophospholipidrezeptoragonisten und -antagonisten

Rezeptorspezifische Agonisten und Antagonisten wurden in dieser Arbeit eingesetzt, um die rezeptorvermittelten Signalwege des S1P zu charakterisieren. Mittlerweile stehen mehrere Substanzen zur Verfügung, die hochaffin an einem oder mehreren S1P Rezeptoren agonistisch oder antagonistisch wirken.

Die wohl prominenteste Verbindung ist das FTY720, das sich derzeit in klinischen Studien als Immunsuppressivum zur Therapie der multiplen Sklerose befindet (Brown et al. 2007). FTY720 weist als Immunmodulator ein innovatives Wirkprinzip auf, da es nicht die Aktivierung oder Proliferation der B- oder T-Zell Lymphozyten beeinflusst. Dagegen beeinflusst es die Verteilung der Zellen zwischen Blut und Lymphgewebe, wobei es zur Retention der Lymphozyten im Lymphknoten kommt (Kunzendorf et al. 2004). FTY720 wurde 1992 durch Derivatisierung des Myriocins, eines Metaboliten des Ascomyceten *Isaria sinclairii*, synthetisiert. FTY720 wird *in vivo* rasch durch Phosphorylierung in seine Wirkform überführt, was durch die SphK, vorzugsweise die SphK2, vermittelt wird. Der phosphorylierte Metabolit des FTY720 (FTY720-P) wirkt an vier der fünf S1P Rezeptoren S1P₁, S1P₃, S1P₄ und S1P₅ agonistisch, nicht jedoch am S1P₂ Rezeptor (Brinkmann et al. 2004). Das innovative Wirkprinzip des FTY720 beruht auf seiner Wirkung am S1P₁ Rezeptor, der auf Lymphozyten stark exprimiert wird. Sowohl Lymphozyten als auch Thymozyten benötigen diesen Rezeptor für die Freisetzung aus den peripheren Lymphorganen bzw. aus dem Thymus in die Blutbahn (Goetzl et al. 2004). FTY720 bindet nach seiner Phosphorylierung an den S1P₁ auf den Lymphozyten im Lymphgewebe. Der Rezeptor internalisiert und wird abgebaut. Daraufhin können die T-Zellen nicht mehr aufgrund eines S1P Konzentrationsgradienten hin in das Blut wandern und verbleiben im Lymphgewebe. Erst durch erneute Expression des S1P₁ Rezeptors werden die Lymphozyten freigesetzt (Brinkmann et al. 2004). Für die Wirkung des FTY720-P an den S1P Rezeptorsubtypen wurden folgende IC₅₀ Werte berichtet: S1P₁ 8,2 nM, S1P₂ >10.000 nM, S1P₃ 151 nM, S1P₄ 33 nM, S1P₅ 178 nM (Sanna et al. 2004).

S1P₁ ist der einzige Rezeptorsubtyp, der einen Agonisten ohne Phosphatgruppe zu binden vermag. So stellt der Tetraaromat SEW2871, der durch Hochdurchsatz-Screening chemischer Datenbanken identifiziert wurde, einen hochaffinen S1P₁ Rezeptoragonisten dar (Parrill et al. 2004).

JTE013 ist einer der wenigen selektiven S1P Rezeptorantagonisten. Ursprünglich wurde JTE013 in der Therapie der zystischen Fibrose eingesetzt. Das Pyrazolopyridin JTE013 hemmt selektiv den S1P₂ Rezeptor mit einem IC₅₀ Wert von 17,6 nM (Parrill et al. 2004).

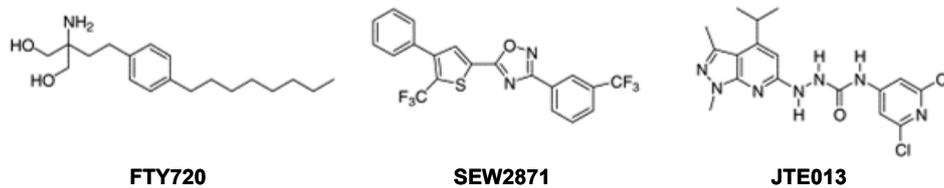


Abb. 7: Struktur der verwendeten S1P Rezeptoragonisten und -antagonisten (Parrill et al. 2004)

Über die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Verbindungen hinaus stehen weitere S1P Rezeptoragonisten und -antagonisten zur Verfügung. So wurde 2-Amino-2-propandiolhydrochlorid (KRP-203) als neuer Immunmodulator entwickelt, der ebenso wie sein Vorbild FTY720 einen S1P₁-Rezeptoragonisten darstellt, jedoch im Gegensatz zu FTY720 nicht mehr an S1P₃ und nur partiell an S1P₄ wirkt (Song et al. 2008). Dagegen ist VPC24191 ein selektiver S1P Rezeptoragonist, der sowohl an S1P₁ als auch an S1P₃ angreift (Brizuela et al. 2007). Daneben stehen Rezeptorantagonisten wie VPC23019 zur Verfügung, die spezifisch S1P₁ und S1P₃ hemmen (Davis et al. 2005). VPC44116 stellt dagegen einen selektiven S1P₁ Rezeptorantagonisten dar (Awad et al. 2006). Das polyzyklische, anionische Molekül Suramin vermittelt die Blockade zahlreicher Rezeptor-Liganden-Interaktionen. So blockiert Suramin auch S1P und LPA Rezeptoren (Durieux et al. 1993; Postma et al. 1996). Die Expression von S1P₁, S1P₂ und S1P₃ in *Xenopus* Oozyten ermöglichte den Nachweis der S1P₃-Selektivität des Suramins (Ancellin et al. 1999). Dagegen führte Pharmakophor-basiertes Wirkstoffdesign zu einem S1P Rezeptorantagonisten, der sich eindeutig durch eine größere Selektivität für S1P₃ gegenüber S1P₁ auszeichnet: 2-(*m*-Heptylphenyl)thiazolidin-4-carboxylsäure (Koide et al. 2002).

Zur Hemmung der LPA Rezeptoren stehen Dioctylglycerolpyrophosphat (DGPP), VPC12249 und Ki16425 zur Verfügung. Diese Substanzen greifen am LPA₁ und LPA₃ Rezeptor an, unterscheiden sich jedoch in ihrer Selektivität. So besitzt DGPP eine höhere Selektivität für den LPA₃ Rezeptor. Dagegen zeigen VPC12249 und Ki16425 eine stärkere Selektivität für den LPA₁ Rezeptor (Fischer et al. 2001; Heise et al. 2001; Ohta et al. 2003).

1.5 Stickstoffmonoxid (NO)

NO ist das einzige bekannte körpereigene Radikal, das als Botenstoff fungiert. Es ist ein lipophiles Radikal mit einer Halbwertszeit von ca. vier Sekunden, das in wässrigem Milieu Membranen durch Diffusion weitgehend frei passieren kann. In physiologischen Konzentrationen ruft NO vorwiegend regulatorische und protektive Wirkungen hervor. So kommt dem NO eine besondere Rolle in der Regulation des Gefäßtonus zu. Von Endothelzellen in der Gefäßwand produziert reguliert es den Blutdruck durch seine relaxierende Wirkung auf glatte Muskelzellen und wurde von Furchgott und Zawadzki 1980 zuerst als *endothelium derived relaxing factor* (EDGF) bezeichnet (Furchgott et al. 1980; Ignarro et al. 1987). Für die Entdeckung der Rolle von „NO als Signalmolekül im kardiovaskulären System“ wurde Robert Furchgott, Louis Ignarro und Ferid Murad 1998 der Nobelpreis für Medizin verliehen. Überdies wirkt NO als unspezifischer Neurotransmitter und ist möglicherweise an der Gedächtnisfunktion beteiligt. Jedoch wird NO bei exzessiver Produktion zum pathogenen Mediator. So wirken größere Mengen von NO, wie sie von Makrophagen gebildet werden, toxisch gegenüber Mikroorganismen und spielen somit bei Infektionen eine große Rolle (MacMicking et al. 1997). Neben akuten Entzündungen ist NO auch bei der Pathogenese chronischer Entzündungserkrankungen wie Arthritis, Hepatitis, Sepsis, Psoriasis und einigen Autoimmunerkrankungen beteiligt (Kolb et al. 1998; Singh et al. 2000; Cauwels 2007).

1.5.1 Die Biosynthese des NO

NO-Synthasen katalysieren die enzymatische Produktion von NO. NO wird in stöchiometrischen Mengen durch eine Fünf-Elektronen-Oxidation unter Umsetzung von L-Arginin zu L-Citrullin gebildet. An der Reaktion sind außerdem zahlreiche Cofaktoren wie NADPH (Nicotinamidadenindinukleotiddiphosphat), FAD (Flavinadenindinukleotid), FMN (Flavinadeninmononukleotid), sowie BH₄ (Tetrahydrobiopterin), eine Häm-Gruppe und Ca²⁺/Calmodulin beteiligt. Im ersten Oxidationsschritt erfolgt unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff die Hydroxylierung der Aminosäure L-Arginin. Im nächsten Teilschritt wird wiederum unter Verbrauch von Sauerstoff das gebildete Intermediat N^ω-Hydroxy-L-Arginin zu L-Citrullin und NO umgesetzt (Marletta 1993; Andrew et al. 1999).

1.5.2 NO-Synthasen

Die zelluläre Bildung des NO wird durch die NO-Synthasen katalysiert. Die Familie der NO-Synthasen umfasst drei verschiedene Isoformen, die neuronale NO-Synthase (nNOS, NOS I), die induzierbare NO-Synthase (iNOS, NOS II) und die endotheliale NO-Synthase (eNOS, NOS III). Die Homologie zwischen den humanen Isoenzymen beträgt 51 - 57 %. In katalytisch aktiver Form liegen alle drei Isoenzyme als Homodimere vor. Wie Abb. 8 zeigt, setzen sich alle NO-Synthasen aus einer C-terminalen Reduktase Domäne und einer N-terminalen Oxigenase Domäne zusammen. Die Reduktase Domäne enthält Bindungsstellen für die Cofaktoren NADPH, FAD und FMN. Die Oxigenase Domäne dagegen enthält Bindungsstellen für BH₄, Häm und L-Arginin. Die Reduktase und Oxigenase Domänen werden durch die Bindungsstelle für Calmodulin verbunden. Diese Domänenstruktur ist allen NO-Synthasen gemein (Alderton et al. 2001). Doch besitzt nur die eNOS Bindungsstellen für Myristin- oder Palmitinsäure, was eine Assoziation mit der Membran ermöglicht (Fleming et al. 2003). Die nNOS besitzt außerdem noch eine N-terminale PDZ-Domäne, über welche weitere Proteininteraktionen vermittelt werden (Mungrue et al. 2004). PDZ leitet sich von den Anfangsbuchstaben der ersten drei Proteine ab, in denen PDZ-Domänen gefunden wurden: dem PSD-Protein (postsynaptic density protein), dem Septate Junction Protein *discs large* und dem Tight Junction Protein *zonula occludentes-1* (ZO-1) (Sierralta et al. 2004).

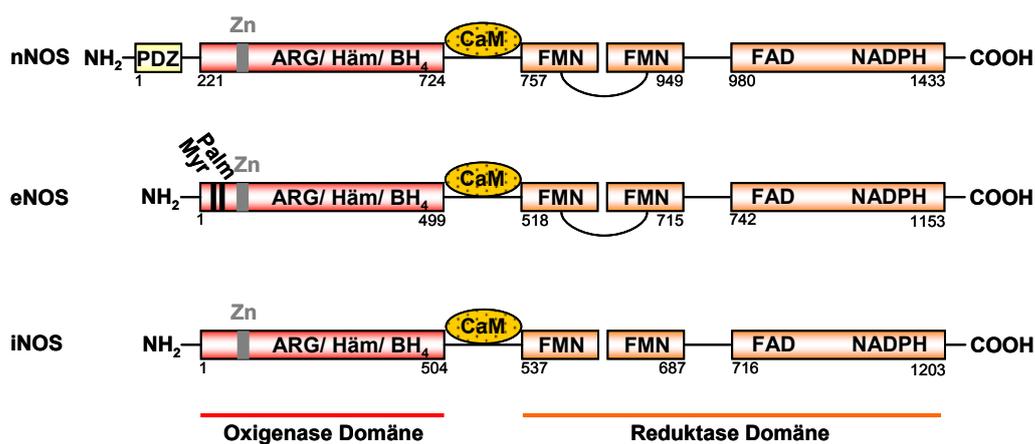


Abb. 8: Domänenstruktur der humanen nNOS, eNOS und iNOS

Neben der Struktur unterscheiden sich die NO-Synthasen in ihrem Expressionsort, der Kinetik, der Regulation sowie ihrer funktionalen Bedeutung voneinander.

Tab. 2 fasst die Unterschiede zwischen den NO-Synthasen zusammen (Forstermann et al. 1998; Bredt 1999; Guzik et al. 2003; Kone et al. 2003; Mungrue et al. 2004; Sessa 2004).

Tab. 2: Vergleich der nNOS, iNOS und eNOS

	nNOS	iNOS	eNOS
Größe	160 kD	130 kD	135 kD
Vorkommen	Neuronen Sklettmuskelzellen Mesangiumzellen etc.	Makrophagen Granulozyten Endothelzellen Hepatozyten glatte Muskelzellen etc.	Endothelzellen glatte Muskelzellen Thrombozyten Kardiomyozyten etc.
Expression	konstitutiv	induzierbar	konstitutiv
Lokalisation	zytosolisch z.T. induzierbar	zytosolisch z.T. induzierbar	membrangebunden/ zytosolisch
Ca ²⁺ /Calmodulin- Abhängigkeit	ja	nein	ja
NO Freisetzung	pmol (sec)	nmol (h bis d)	pmol (sec)
Stimulatoren	L-Glutamat Lithium etc.	IL-1 β IFN γ TNF α Lipopolysaccharide (LPS) etc.	Acetylcholin Bradykinin Ionomycin Scherstress etc.
Zellulärer Effekt	Neurotransmission Kontrolle der Kontraktilität etc.	Immunabwehr Zytotoxizität DNA-Schädigung etc.	Vasodilatation Thrombozyten- aggregationshemmung Proliferationshemmung glatte Muskelzellen etc.

Die konstitutiv exprimierten NO-Synthasen nNOS und eNOS werden hauptsächlich über ihre Aktivität reguliert, die iNOS dagegen über ihre Expression. Die Umsatzrate der konstitutiven NO-Synthasen ist um ein vielfaches geringer als die der iNOS, welche eine sogenannte *high-output* Kinetik aufweist (Nathan et al. 1991). Außerdem

wird die Aktivität der konstitutiven NO-Synthasen durch die Menge an intrazellulärem Ca^{2+} gesteuert, denn nur in Gegenwart einer ausreichend großen Konzentration an Ca^{2+} kann Calmodulin gebunden werden kann. Die iNOS ist von dieser Regulation jedoch nicht betroffen, da Calmodulin eine deutlich höhere Affinität zu seiner Bindungsstelle im iNOS Protein besitzt. Dadurch ist die Bindung von Calmodulin Ca^{2+} -unabhängig. Diese Tatsache hat zur Folge, dass die Induktion der Expression der iNOS zu einer kontinuierlichen Bildung von NO führt, die nicht über eine Regulation der Enzymaktivität gesteuert werden kann.

1.5.3 Physiologische Bedeutung des NO

Die große Bedeutung des NO für das kardiovaskuläre System wird durch seine Funktion als einer der wichtigsten Blutdruckregulatoren deutlich. Das NO wird durch die eNOS in den Endothelzellen der Gefäße gebildet. Die Aktivität der eNOS unterliegt der strengen Kontrolle durch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration. Ein Ca^{2+} -Influx in die Gefäßendothelzellen kann durch Hormone, Acetylcholin, Bradykinin, ADP, ATP oder Histamin ausgelöst werden und führt zu einer Aktivierung der eNOS. Das gebildete NO diffundiert zu den Zellen der glatten Muskulatur und aktiviert dort die Guanylat-Zyklase. Diese katalysiert die Bildung von zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP), welches wiederum zur Aktivierung cGMP-abhängiger Proteinkinasen oder zur Aktivierung von Phosphodiesterasen führt, welche eine Gefäßerweiterung vermitteln (Munzel et al. 2005; Yetik-Anacak et al. 2006). Darüber hinaus vermittelt NO auch eine protektive Wirkung auf die Gefäße. So verhindert NO, das durch die eNOS generiert wurde, die Aggregation von Blutplättchen und hemmt die Induktion der Proliferation von Zellen der glatten Muskulatur (Li et al. 2000). Die Pathogenese der Atherosklerose ist daher mit einer verminderten Aktivität der eNOS assoziiert (Shaul 2003; Mineo et al. 2006).

Durch die nNOS gebildetes NO fungiert im zentralen Nervensystem als Botenstoff, wird jedoch im Gegensatz zu anderen Neurotransmittern nicht vesikulär gespeichert (Bredt et al. 1992). Im peripheren Nervensystem wirkt NO in nichtadrenergen/nichtcholinergen (NANC) Neuronen als Neurotransmitter und reguliert so die glatte Muskulatur der Organe des Urogenital-, Verdauungs- oder Respirationstraktes (Takahashi 2003). Neben diesen regulatorischen Wirkungen des NO im Nervensystem kann es auch zur Zerstörung von Neuronen führen. So sind

neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer mit einer übermäßigen Bildung von NO assoziiert (Kolb et al. 1992).

Daneben spielt NO auch in der Immunabwehr eine große Rolle. So kommt es bei der unspezifischen Immunabwehr von Viren, Bakterien oder Pilzen zu einer Induktion der iNOS in Makrophagen und Granulozyten (MacMicking et al. 1997). Die, durch die iNOS gebildeten, großen Mengen an NO wirken antiproliferativ bis zytotoxisch. Einen stärkeren antimikrobiellen Effekt besitzt das Peroxynitrit, das durch die Reaktion von NO mit reaktiven Sauerstoffspezies entsteht (Guzik et al. 2003). Eine Deregulation der iNOS trägt jedoch auch zur Entstehung chronischer Entzündungserkrankungen bei (Miller et al. 1999).

1.5.4 Bedeutung des NO für die Haut

Auch in der Physiologie der Haut spielt NO eine bedeutende Rolle. Alle drei NO-Synthasen werden in der Haut exprimiert (Luo et al. 2005). Doch wird die Lokalisation der Isoenzyme in den jeweiligen Schichten der Haut konträr diskutiert. Außer Frage steht jedoch die große Bedeutung des NO in der Wundheilung (Schaffer et al. 1997; Frank et al. 2002; Rizk et al. 2004). So kann eine erhöhte Konzentration der stabilen Metabolite des NO in der Wundflüssigkeit detektiert werden (Schaffer et al. 1997). Dies wurde durch die Gabe von NO-Donatoren bestätigt, die zu einer gesteigerten Wundheilung führte (Shabani et al. 1996). Darüber hinaus kann eine verstärkte Expression der nNOS, iNOS und eNOS während der Wundheilung beobachtet werden (Frank et al. 1998; Stallmeyer et al. 2002; Boissel et al. 2004). Die Bedeutung der NO-Synthasen für die Wundheilung wurde auch durch Knockout (KO)-Experimente bestätigt. So ist sowohl in eNOS- als auch iNOS-defizienten Mäusen eine verminderte Wundheilung zu beobachten (Yamasaki et al. 1998; Lee et al. 1999). Darüber hinaus wird die Wundheilung durch die Regulation der Proliferation von Keratinozyten und Fibroblasten, Modulation der Zytokinfreisetzung und Beeinflussung der Kollagensynthese durch NO gefördert (Banno et al. 2001).

NO ist daneben aber auch an der Aufrechterhaltung der Homöostase der Haut beteiligt, reguliert die lokale Durchblutung, die Melanogenese und den Schutz der Haut vor Umwelteinflüssen wie der UV-Strahlung (Bruch-Gerharz et al. 1998).

Doch trägt eine Überexpression der iNOS zur Pathogenese entzündlicher Erkrankungen der Haut wie Psoriasis oder Lupus erythematodes bei (Cals-Grierson et al. 2004).

1.5.5 Regulation der Apoptose durch NO

Die Regulation der Apoptose ist sowohl für die Aufrechterhaltung der Homöostase der Haut als auch für den Schutz der Haut vor Umwelteinflüssen von Bedeutung. Jedoch kann NO abhängig vom Zelltyp, seiner Konzentration, der Anwesenheit von anderen Radikalen und dem Redoxzustand der Zelle ebenso pro- wie antiapoptotisch wirken (Weller 2003). Die konträre Wirkung des NO, einerseits die Apoptose zu hemmen oder andererseits diese zu induzieren, ist vornehmlich durch die Menge an NO, die auf eine Zelle wirken, zu erklären. So führen große Mengen an NO, wie sie durch die iNOS gebildet werden, zu einem zytotoxischen Effekt, wohingegen geringere NO-Mengen protektiv wirken (Chung et al. 2001). Tab. 3 fasst die Möglichkeiten der Beeinflussung der Apoptose durch NO zusammen (Dimmeler et al. 1997; Chung et al. 2001; Yamaoka et al. 2004).

Tab. 3: Pro- und antiapoptotische Wirkung des NO

Proapoptotische Wirkung des NO	Antiapoptotische Wirkung des NO
Bildung des Apoptoseinduktors Peroxynitrit	Bildung von cGMP: - Freisetzung von Cytochrom c↓ - Aktivierung der Caspasen↓
Direkte Schädigung der DNA: - Akkumulation des p53 Proteins - Bax↑, Bcl-xL↓	Direkte Hemmung der Caspasen durch S-Nitrosylierung
Direkte Wirkung auf die Mitochondrienmembran: - Freisetzung von Cytochrom c↑ - Aktivierung der Caspasen↑	Bcl-2 Expression (Protein und mRNA)↑
Aktivierung der Sphingomyelinase: - Bildung von Ceramiden↑	p53 Expression↓

1.6 Insulin

Insulin, ein lebenswichtiges, anaboles Hormon, ist ein Polypeptid, das aus zwei Peptidketten, der A-Kette mit 21 und der B-Kette mit 30 Aminosäuren, besteht. Die Synthese erfolgt in den B-Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas, wobei zunächst das einkettige Proinsulin entsteht. Durch Abspaltung des C-Peptids entsteht das Insulin, welches in Vesikeln der B-Zellen gespeichert wird (Kitabchi 1977). Der stärkste Sekretionsreiz für Insulin ist die Hyperglykämie (Permutt et al. 1981). So verbessert Insulin die Aufnahme von Glukose und Aminosäuren in die Zellen der meisten Gewebe. Insulin steigert den oxidativen Glucoseabbau und erhöht die Glykogenbildung in der Leber sowie den Muskeln und hemmt außerdem den Glykogenabbau. Durch Insulin wird die Bildung von Fetten aus Glucose stimuliert und die Umwandlung von Proteinen in Glucose gehemmt (Bottermann et al. 1971; Newsholme et al. 2001; Tirone et al. 2001). Darüber hinaus übt Insulin einen wachstumsfördernden Effekt auf zahlreiche Zellen aus (Tapon et al. 2001).

IGF-I (insulin-like growth factor I) besitzt eine große Strukturhomologie zum Insulin und zeigt insulinähnliche Wirkungen (Nakae et al. 2001).

1.6.1 Der Insulinrezeptor

Insulin und IGF-I vermitteln ihre Wirkung über spezifische Rezeptoren, den Insulinrezeptor (IR) oder IGF-I Rezeptor (IGF-IR). Diese Rezeptoren gehören zu den Rezeptortyrosinkinasen. Derartige Rezeptoren sind $\alpha_2\beta_2$ -Heterodimere, die aus jeweils zwei mit Disulfid-Brücken verbundenen α - und β -Untereinheiten bestehen (Cheatham et al. 1995). Insulin bindet an seine extrazelluläre Bindungsstelle an den α -Untereinheiten. Die Bindung des Liganden führt zur Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase in den β -Untereinheiten und damit zur schnellen Autophosphorylierung des Rezeptors. Der aktivierte Rezeptor rekrutiert mehrere Proteine, die durch das Vorhandensein einer SH2-Domäne (Src homology 2 domain) gekennzeichnet sind. So können IRS Proteine (insulin receptor substrate) oder SHC Proteine (SH2-containing protein) als Substrate phosphoryliert werden und fungieren als Dockingproteine für weitere Adapterproteine (Danielpour et al. 2006). Interessanterweise zeigt Insulin auch eine gewisse Affinität zum IGF-IR. So kann Insulin seine antiapoptotische Wirkung in Keratinozyten auch über eine Aktivierung des IGF-IR vermitteln (Kuhn et al. 1999).

1.6.2 Signaltransduktion des Insulinrezeptors

Die Aktivierung des IR kann zwei Signalkaskaden aktivieren, den PI3K/Akt-Signalweg oder den MAPK (mitogen-activated protein kinase)-Weg. Der bedeutendste Signalweg zur Vermittlung der Insulineffekte läuft über eine Aktivierung der PI3K. So vermittelt das phosphorylierte IRS-1 eine Assoziation und nachfolgende Aktivierung der PI3K. Auf diese Weise kann es zu einer Aktivierung der Akt Kinase kommen, die die antiapoptotische oder mitogene Wirkung des Insulins vermittelt. Zur Vermittlung des MAPK-Signalweges rekrutiert das phosphorylierte SHC Protein das Adapterprotein Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2), welches anschließend das SOS (son of sevenless) Protein bindet. Dieser Komplex aktiviert Ras, ein GTP-Bindungsprotein mit GTPase-Aktivität. Die GTP-gebundene Form von Ras aktiviert die Raf-1 Kinase, welche die Aktivierung der Kinase Mek (MAPK-Effektor-Kinase) katalysiert, die wiederum die ERK phosphorylieren kann. Die aktivierte ERK kann im Zellkern Transkriptionsfaktoren regulieren (Scheid et al. 2003; Kooijman 2006). Der PI3K/Akt Signalweg nimmt eine Schlüsselposition in der Regulation der zellulären Proliferation und Apoptose durch Insulin ein (Lawlor et al. 2001).

1.6.3 Einfluss von Insulin auf die Haut

Insulin und IGF-I sind wichtige Regulatoren der Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten (Wertheimer et al. 2001; Sadagurski et al. 2006). IGF-IR-defiziente Mäuse sind durch eine dünne und schadhafte Epidermis gekennzeichnet (Martin 1997). Dies zeigt die große Bedeutung des Insulins und IGF-I für die Bildung und Entwicklung der Haut. Doch führt eine verstärkte Signaltransduktion des IR oder IGF-IR zu einer Induktion des Zellwachstums, einer Hyperplasie der Haut oder sogar zur Entstehung von Tumoren (Tsao et al. 1982; Giovannucci 1999; DiGiovanni et al. 2000; Shen et al. 2001; Kim et al. 2004). Daher ist eine Überaktivität der Insulin/IGF-vermittelten Signalwege auch mit einer Pathogenese hyperproliferativer Erkrankungen der Haut assoziiert und kann daher beispielsweise bei der Psoriasis vulgaris beobachtet werden (Edmondson et al. 2003).

1.7 Proteinkinase C

Die Mitglieder der Proteinkinase C (PKC) Familie regulieren zahlreiche zelluläre Prozesse und sind entscheidend an Differenzierung, Proliferation und Apoptose beteiligt (Clemens et al. 1992; Dempsey et al. 2000).

1.7.1 Isoenzyme der PKC

Die PKC Isoenzyme sind spezifische Serin-Threonin-Kinasen. Die PKC Familie umfasst mindestens 12 Mitglieder und wird aufgrund der Struktur und der Aktivierung ihrer Isoenzyme in drei Gruppen eingeteilt: Die klassischen PKC Isoenzyme (PKC α , PKC β , PKC γ) sind Ca²⁺-abhängig und werden durch Diacylglycerol (DAG) sowie Phorbolster aktiviert. Die neuen PKC Isoformen (PKC δ , PKC ϵ , PKC η , PKC θ , PKC μ) sind Ca²⁺-unabhängig, werden aber durch DAG und Phorbolster aktiviert. Die atypischen PKC Isoenzyme (PKC ζ , PKC λ , PKC ι) repräsentieren die dritte Gruppe, welche sowohl von Ca²⁺ als auch von DAG und Phorbolstern unabhängig aktiviert wird (Bollinger-Bollag et al. 2001). Das Vorkommen der PKC Isoenzyme ist sehr gewebespezifisch und ihre zellulären Effekte unterscheiden sich stark, können sogar gegensätzlich sein (Toker 1998).

1.7.2 PKC in der Haut

Die PKC Isoenzyme spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten (Matsui et al. 1992; Gartsbein et al. 2006). Die PKC Isoenzyme PKC α , PKC δ , PKC ζ , PKC η und PKC ϵ werden in Keratinozyten exprimiert (Denning 2004). Da Ca²⁺ ein zentraler Regulator der epidermalen Homöostase ist, wird die wichtige Rolle der klassischen, Ca²⁺-abhängigen PKC α in der Differenzierung der Haut deutlich (Bikle et al. 2001). Daneben führt eine Überexpression der PKC α zu einer Stimulation des Zellwachstums bis hin zur Tumorgenese (Breitkreutz et al. 2007). Dieser Effekt kann jedoch durch die PKC δ antagonisiert werden, welche das Wachstum hemmt (Stanwell et al. 1996; Hornia et al. 1999). Dies verdeutlicht das komplexe Zusammenspiel der PKC Isoenzyme in der Regulation von Proliferation und Differenzierung in der Epidermis.

1.8 Fragestellung und Zielsetzung

Lysophospholipide sind an einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt, die über die ursprünglich angenommene Funktion als bloße Strukturkomponenten der Lipiddoppelmembran weit hinausgehen. So regulieren S1P und LPA zahlreiche physiologische Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Migration und Angiogenese. Auf diese Weise spielt S1P in der Regulation physiologischer Prozesse der Haut wie der Wundheilung eine wichtige Rolle. Doch auch bei pathophysiologischen Veränderungen besitzt S1P als Modulator der Signaltransduktion in Keratinozyten eine große Bedeutung. Da S1P ein wachstumshemmendes Potential auf Keratinozyten ausübt, liegt der Einsatz des S1P als Wirkstoff zur Therapie hyperproliferativer Erkrankungen nahe. Um Wirkungen und mögliche Risiken bei einer Behandlung abschätzen zu können, sollte der zugrunde liegende Wirkmechanismus umfassend geklärt werden, besonders hinsichtlich möglicher Interaktionen mit Insulin-vermittelten Signalwegen, deren Deregulation mit der Pathogenese der Psoriasis assoziiert ist. Da der Immunmodulator FTY720 einen potenten Agonisten an den S1P Rezeptoren darstellt, sollte seine Wirkung in humanen Keratinozyten untersucht und von den S1P-vermittelten Signalwegen abgegrenzt werden. Da neben der Regulation der Proliferation die Apoptose von zentraler Bedeutung für die Pathogenese der Psoriasis ist, sollte die Beeinflussung der Apoptose der Keratinozyten durch S1P umfassend untersucht werden.

Die Arbeit gliedert sich daher in folgende Teilgebiete:

- Untersuchung der Interaktion Insulin- und S1P-vermittelter Signalwege hinsichtlich:
 - der Proliferation der Keratinozyten
 - der Apoptose der Keratinozyten
- Charakterisierung der antiapoptotischen Wirkung des S1P:
 - Identifizierung der spezifischen Rezeptorbeteiligung
 - Untersuchung der Bedeutung von NO für die antiapoptotische Wirkung des S1P
- Charakterisierung des Einflusses von LPA auf die Apoptose von Endothelzellen