

3 Ergebnisse

3.1 Interaktion Insulin- und S1P-vermittelter Signalwege

3.1.1 Aktivierung der Akt Kinase

Das Gleichgewicht zwischen Wachstum und Differenzierung von Zellen ist von entscheidender Bedeutung in zahlreichen physiologischen Prozessen. So ist in der Haut die Balance zwischen Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten kritisch für die Bildung und Entwicklung des Gewebes (Koria et al. 2006). Zahlreiche Wachstumsfaktoren konnten als Regulatoren dieser Prozesse in der Haut identifiziert werden. Sowohl dem Insulin als auch dem IGF-I kommen hierbei eine besondere Rolle zu (Spravchikov et al. 2001; Sadagurski et al. 2006). Insulin vermittelt seine Wirkung hauptsächlich über die Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase Akt (Alessi et al. 1998). Hinsichtlich der Therapie hyperproliferativer Erkrankungen der Haut, welche mit einer Überaktivität Insulin- oder IGF-I-vermittelter Signalwege assoziiert sind, war es von besonderem Interesse, die Interaktion von S1P mit diesen Signalwegen zu charakterisieren.

Der Akt Kinase kommt eine Schlüsselfunktion bei der Regulation der zellulären Proliferation zu (Liang et al. 2002; Shin et al. 2002). Die Aktivierung wurde durch Detektion der Phosphorylierung der Akt Kinase an Ser⁴⁷³ mittels Western Blot-Analyse gemessen. Wie Abb. 12 zeigt, induzierte Insulin eine Phosphorylierung der Akt Kinase. Die Stimulation der Keratinozyten mit 1 μ M Insulin führte zu einer beginnenden Aktivierung nach 5 min, welche nach 10 min noch weiter verstärkt wurde und über mindestens 20 min bestehen blieb.

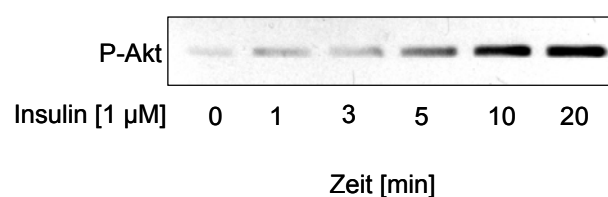


Abb. 12: Aktivierung der Akt Kinase durch Insulin. Humane Keratinozyten wurden stimuliert und durch eine Western Blot-Analyse auf Phospho-Akt (Ser⁴⁷³) untersucht. Der Versuch wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

3.1.2 Hemmung der Akt Kinase durch S1P

Dem Lysophospholipid S1P wurde in einer Reihe von Zellen eine aktivierende Wirkung auf die Akt Kinase zugesprochen (Radeff-Huang et al. 2004). Daher war es besonders bemerkenswert, dass die Stimulation humaner Keratinozyten zu einer

drastischen Reduktion der basalen Akt Phosphorylierung führte (Abb. 13). Die Bestimmung der Aktivierung der Akt Kinase erfolgte nach Stimulation der Zellen mit 10 μM S1P. Nach einer Inkubationszeit von 10 min setzte die Hemmung der basalen Akt Phosphorylierung ein.

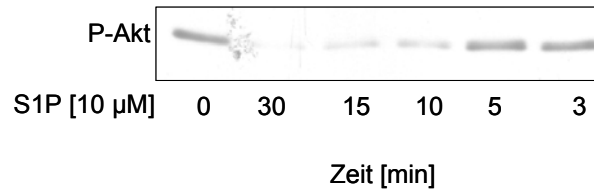


Abb. 13: Hemmung der basalen Akt Phosphorylierung in humanen Keratinozyten. Nach der Stimulation mit S1P wurde die Aktivierung der Akt Kinase durch Western Blot-Analyse detektiert. Das Experiment wurde dreimal wiederholt und lieferte vergleichbare Ergebnisse.

In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der basalen Akt Phosphorylierung nach einer Stimulation der Zellen mit S1P für über eine Stunde bestehen blieb.

In verschiedenen Studien wurde bereits ein starker mitogener Effekt des Insulins auf Keratinozyten beschrieben, wohingegen S1P die Proliferation der Keratinozyten hemmt (Shen et al. 2001; Vogler et al. 2003). Daher war es nun von großem Interesse, eine mögliche Wechselwirkung beider Mediatoren auf die Akt Phosphorylierung als Schlüsselfunktion in der Regulation zellulären Wachstums zu untersuchen. So sollte der Frage nachgegangen werden, ob S1P, neben der Wirkung auf die basale Akt Phosphorylierung, auch eine Hemmung der durch Insulin aktivierten Akt Kinase hervorruft.

Zu diesem Zweck wurden humane epidermale Keratinozyten in Insulin-freiem Wachstumsmedium kultiviert, mit S1P vorbehandelt und schließlich mit den Aktivatoren der Akt Kinase Insulin oder IGF-I behandelt. Die Vorinkubation mit 10 μM S1P erfolgte für 10 min, da zu diesem Zeitpunkt die Hemmung der basalen Phosphorylierung der Akt Kinase einsetzte. Die anschließende Stimulation mit 100 ng/ml IGF-I oder 1 μM Insulin erfolgte ebenfalls für 10 min, da nach 10 min ein Maximaleffekt der Induktion der Akt Phosphorylierung erzielt wurde. Tatsächlich führte diese Vorinkubation mit S1P zu einer deutlichen Reduktion der durch Insulin oder IGF-I hervorgerufenen Akt Phosphorylierung (Abb. 14).

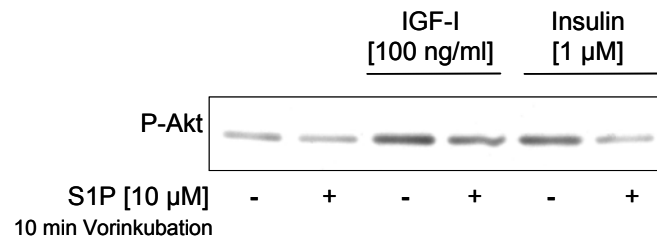


Abb. 14: Hemmung der aktivierten Akt Kinase. Keratinozyten wurden mit S1P vorbehandelt und nachfolgend mit Insulin oder IGF-I stimuliert. Die Bestimmung des phosphorylierten Proteins erfolgte mittels Western Blot-Analyse. Das Experiment wurde zweimal wiederholt und zeigte vergleichbare Ergebnisse.

Wie gezeigt, reduzierte S1P nicht nur die basale Akt Phosphorylierung, sondern hemmte sogar die durch Insulin evozierte Akt Aktivierung. Um diese Wechselwirkung auf die Akt Kinase näher zu charakterisieren, wurde die Akt Phosphorylierung nach einer Vorinkubation mit 10 μ M S1P für verschiedene Zeiträume und nachfolgender Stimulation mit Insulin untersucht. Abb. 15A zeigt die Zeitreihe der Hemmung der Insulin-induzierten Akt Aktivierung durch S1P. Ähnlich der Kinetik der basalen Hemmung wurde auch hierbei nach 10 min ein Maximaleffekt beobachtet. Allerdings war die durch Insulin hervorgerufene Akt Aktivierung schon ab einer Vorinkubationsdauer von 30 min vollständig wiederhergestellt, was auf eine sehr rasche Hemmung der aktivierten Akt Kinase schließen lässt. Auch konnte eine Konzentrationsabhängigkeit der S1P-induzierten Hemmung der Akt Phosphorylierung mittels Western Blot-Analyse gezeigt werden (Abb. 15B). Dazu wurden Keratinozyten mit verschiedenen S1P Konzentrationen vorbehandelt und anschließend mit Insulin stimuliert. So setzte die Reduktion der Insulin-induzierten Akt Aktivierung erst ab einer Konzentration von 5 μ M S1P ein und erreichte bei einer Vorinkubation mit 10 μ M S1P die effektivste Wirkung. Da die Hemmung der durch Insulin hervorgerufenen Akt Aktivierung schon nach kurzer Vorinkubation mit S1P erreicht wurde, stellte sich die Frage, ob eine gleichzeitige Gabe von Insulin und S1P nicht einen noch stärkeren Effekt erzielt. Tatsächlich erwies sich jedoch die Vorinkubation mit S1P für 10 min im Vergleich zur gleichzeitigen Stimulation als potenter (Abb. 15C).

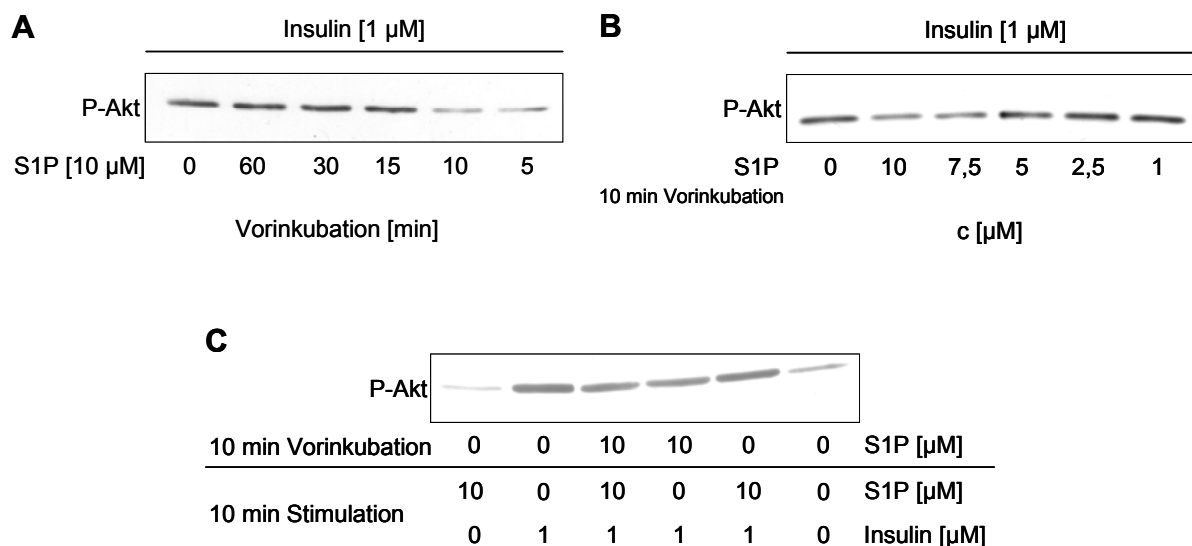


Abb. 15: Charakterisierung der Hemmung der Insulin-induzierten Akt Aktivierung durch S1P. Keratinozyten wurden mit S1P vorinkubiert und anschließend mit Insulin stimuliert (A,B). Die Zellen wurden entweder mit S1P vorbehandelt und/oder S1P wurde gleichzeitig mit der anschließenden Insulin-Stimulation gegeben (C). Es folgte eine Detektion der Akt Aktivierung. Die Experimente wurden zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

3.1.3 Hemmung der Proliferation humaner Keratinozyten

Nun war es von Interesse, die Folgen der beobachteten Interaktion von S1P mit Insulin-vermittelten Signalwegen besonders hinsichtlich des Zellwachstums zu untersuchen. Die Proliferation der Keratinozyten ist ein wichtiger Prozess bei der Reepithelialisierung verwundeten Gewebes. Doch kann eine übermäßig gesteigerte Proliferation epidermaler Keratinozyten auch zum Krankheitsbild der Psoriasis führen. Daher sollte nun aufgrund der großen Bedeutung der Akt Kinase für die Regulation des Zellwachstums nachgewiesen werden, ob S1P den mitogenen Effekt des Insulins auf Keratinozyten hemmt.

Daher wurden epidermale Keratinozyten in Insulin-freiem Wachstumsmedium kultiviert, mit Insulin in verschiedenen Konzentrationen für 24 h stimuliert und über 4 h eine Thymidin-Inkorporation durchgeführt. Wie zu erwarten war, induzierte Insulin das Zellwachstum humaner Keratinozyten (Abb. 16A). Dieses Experiment diente der Findung der potentesten mitogenen Insulinkonzentration. Die Stimulation mit 1 μM Insulin hatte den stärksten wachstumsfördernden Effekt. Die Auswirkung der Vorinkubation mit S1P sollte daher bei nachfolgender Stimulation der Zellen mit dieser Konzentration durchgeführt werden. Wie Abb. 16B zeigt, senkte S1P signifikant das durch Insulin induzierte Wachstum der Keratinozyten. Dabei erwies sich eine Vorinkubation mit 10 μM S1P als effektivste Konzentration zur Reduktion des Insulin-vermittelten Effektes.

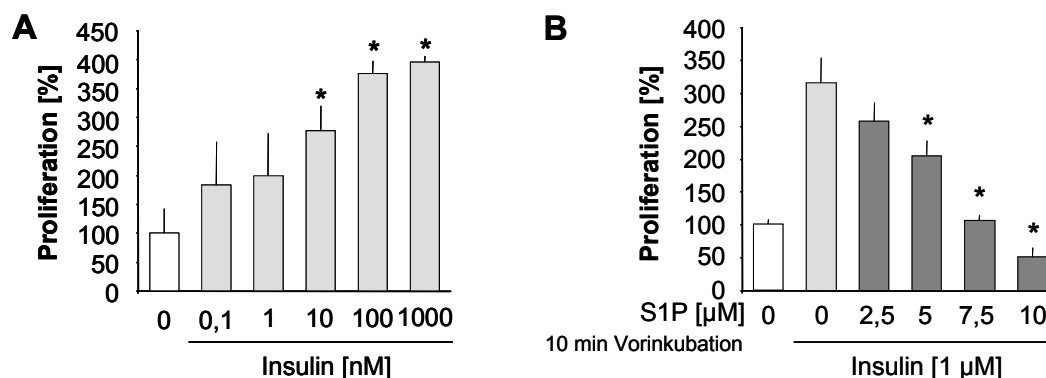


Abb. 16: Einfluss von Insulin und S1P auf die Proliferation humaner Keratinozyten. Die Zellen wurden mit Insulin für 24 h stimuliert (A). Eine Vorinkubation mit S1P erfolgte 10 min vor der Stimulation mit Insulin für 24 h (B). Die Inkorporation mit [³H]Thymidin erfolgte jeweils in den letzten 4 h. Jeder Wert wurde auf die mit dem Vehikel behandelte Kontrolle bezogen und stellt den Mittelwert ± SD einer Dreifachbestimmung dar. Die Experimente wurden zwei weitere Male durchgeführt und zeigten gleiche Resultate. * $p \leq 0,05$ versus Kontrolle (A) oder versus Stimulation mit Insulin (B).

3.1.4 Einfluss der Hemmung der PKC auf die Akt Aktivität

Auch die PKC stellt einen Regulator der Aktivität der Akt Kinase dar, so wird deren Aktivität sowohl positiv als auch negativ durch die PKC beeinflusst (Papp et al. 2004). In murinen Keratinozyten hemmt der selektive PKC Aktivator TPA die basale sowie die durch IGF-I induzierten Akt Phosphorylierung (Li et al. 2006). Die Bedeutung der PKC für die Aktivität der Akt Kinase in primären humanen Keratinozyten sollte durch den Einsatz von Ro-31-8220, eines kompetitiven und selektiven Hemmstoffs der PKC (IC_{50} Wert: 10 nM) untersucht werden (Davis et al. 1992). So konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der PKC mittels Ro-31-8220 in primären humanen Keratinozyten zu einer ausgeprägten Verstärkung der basalen Akt Phosphorylierung führte (Abb. 17A). Auch die Aktivierung der Akt Kinase durch IGF-I ebenso wie durch Insulin wurde massiv durch die Vorinkubation mit dem PKC Inhibitor verstärkt (Abb. 17B und C). Darüber hinaus führte die Hemmung der PKC dazu, dass S1P seine Fähigkeit verlor, die Akt Aktivität zu hemmen. So war sowohl die basale als auch die durch IGF-I oder Insulin induzierte Akt Phosphorylierung trotz der Vorinkubation mit S1P in Anwesenheit des PKC Inhibitors massiv verstärkt (Abb. 17B und C).

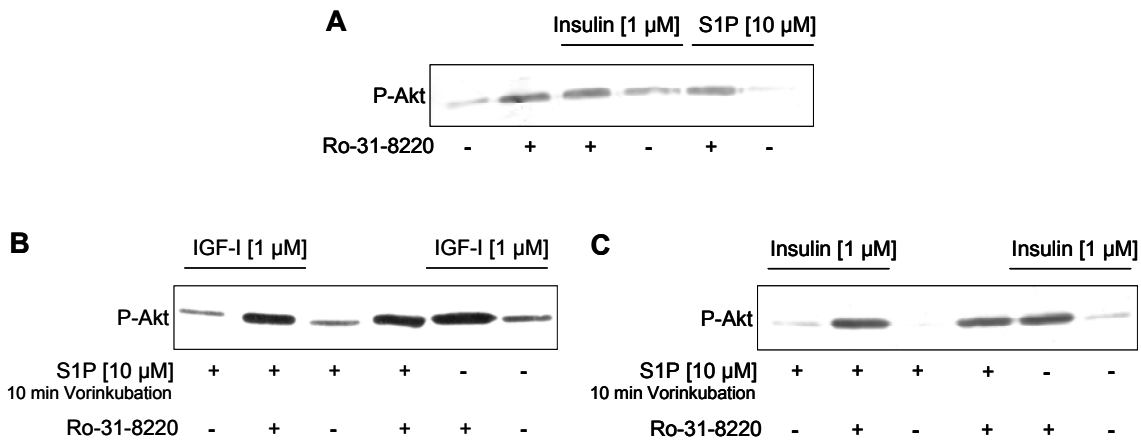


Abb. 17: Einfluss der PKC Hemmung durch Ro-31-8220. Keratinozyten wurden mit 5 μ M Ro-31-8220 für 1 h vorbehandelt. Nachfolgend wurden die Zellen mit Insulin oder S1P stimuliert (A). Im Anschluss an die Vorinkubation mit dem Inhibitor wurden die Zellen zunächst mit S1P oder Kontrollvehikel vorbehandelt und nachfolgend mit IGF-I (B) oder Insulin (C) stimuliert. Es folgte eine Analyse der Akt Aktivierung. Das Experiment wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

3.1.5 Einfluss der PKC Aktivierung auf die Akt Aktivität

Da die gewonnenen Ergebnisse eindeutig eine Beteiligung der PKC an der Regulation der Akt Kinase nahe legten, sollten die Ergebnisse durch Experimente untermauert werden, denen statt der Hemmung der PKC eine Aktivierung dieser Kinase zugrunde lagen. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der PKC durch TPA zu einer Hemmung der Akt Phosphorylierung führte. So reduzierte die Stimulation der Keratinozyten mit 250 nM TPA die basale Aktivierung der Akt Kinase. Die durch TPA hervorgerufene Reduktion der basalen Phosphorylierungsrate setzte nach einer Stimulationszeit von 10 min ein und erreichte nach 30 min die maximale Hemmung (Abb. 18A). Des Weiteren sollte nun gezeigt werden, dass eine TPA Aktivierung nicht nur die basale Phosphorylierungsrate beeinflusst, sondern auch eine bereits induzierte Akt Aktivierung hemmen kann. Aus diesem Grund wurden die Keratinozyten vor der Aktivierung der Akt Kinase durch Stimulation mit Insulin mit TPA vorinkubiert. Interessanterweise wurde auch die durch Insulin hervorgerufene Akt Phosphorylierung durch den PKC Aktivator stark reduziert (Abb. 18B). Besonders deutlich wurde in diesem Experiment der vergleichbare Effekt des Lysophospholipids S1P und der PKC Aktivierung auf die Aktivität der Akt Kinase.

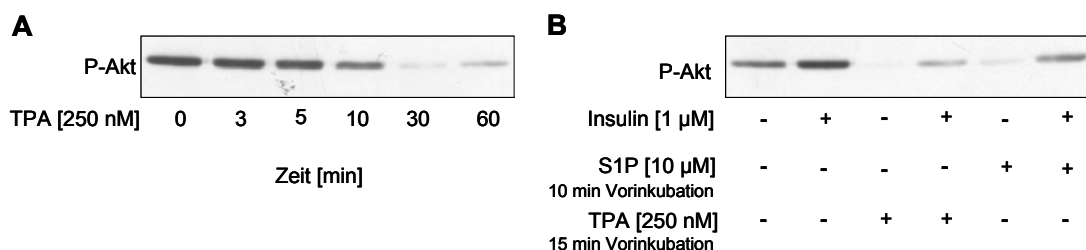


Abb. 18: Einfluss der PKC Aktivierung durch TPA. Keratinozyten wurden mit TPA stimuliert (A). Vor der Stimulation mit Insulin für 10 min wurden die Zellen entweder mit S1P oder mit TPA vorbehandelt (B). Eine Bestimmung der Akt Phosphorylierung erfolgte durch Western Blot-Analyse. Die Experimente wurden zwei weitere Male mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

3.1.6 PKC Aktivierung durch S1P

Die sich hieraus ergebende Analogie im Verhalten des S1P zur PKC Aktivierung legte nahe, eine mögliche Aktivierung der PKC durch S1P zu untersuchen. In Endothelzellen wurde eine Aktivierung verschiedener PKC Subtypen durch S1P beschrieben (Thompson et al. 2006). So wäre es also denkbar, dass S1P über einen PKC-abhängigen Signalweg zu einer Hemmung der Akt Aktivität führt. Zu diesem Zweck wurde die Aktivierung der PKC durch die Western Blot-Analyse zur Detektion einer Phosphorylierung des C-terminalen Endes im Bereich des hydrophoben Motivs der PKC Subtypen gemessen. Diese Phosphorylierungsstelle liegt bei allen PKC Subtypen homolog vor. In der Tat ließ sich in humanen Keratinozyten eine Aktivierung der PKC durch S1P zeigen (Abb. 19).

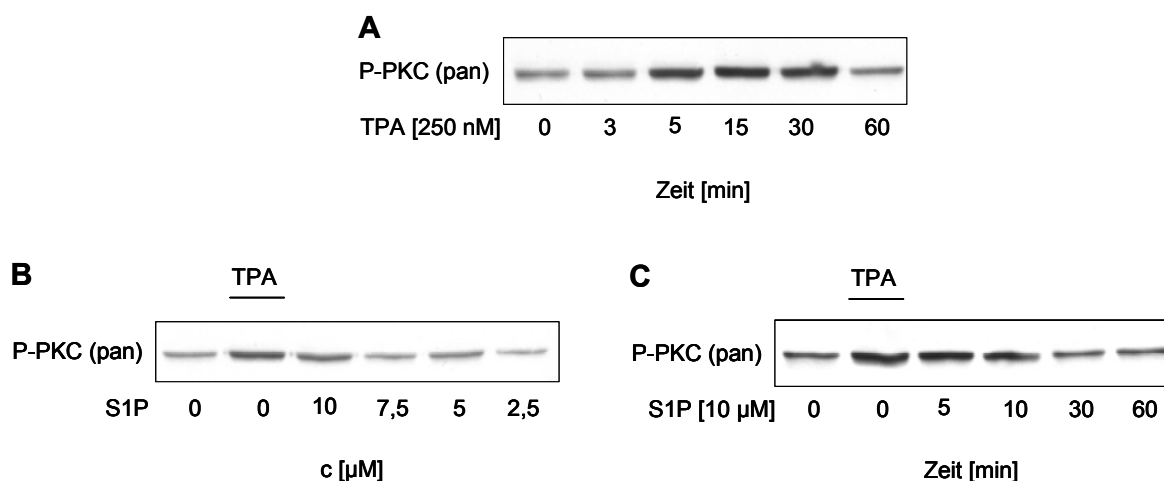


Abb. 19: PKC Aktivierung. Keratinozyten wurden mit TPA (A) bzw. S1P stimuliert (B,C). Anschließend erfolgte eine Western Blot-Analyse mit einem Anti-Phospho-PKC (pan) Antikörper. Die Blots sind charakteristisch für jeweils zwei weitere unabhängige Versuche.

Zunächst wurde jedoch die Aktivierung der PKC durch TPA nachgewiesen. Dabei zeigte sich eine rasche Phosphorylierung der PKC schon nach einer Stimulation mit

250 nM TPA für 5 min. Ein maximaler Effekt wurde nach einer Stimulationszeit von 15 min erzielt (Abb. 19A). Daher diente die Stimulation mit 250 nM TPA für 15 min in den nachfolgenden Experimenten als Positivkontrolle. Wie vermutet, führte S1P in humanen Keratinozyten zu einer Aktivierung der PKC. Bei der Inkubation mit verschiedenen S1P Konzentrationen erwies sich 10 μ M als stärkste Konzentration (Abb. 19B). Darüber hinaus wurde die Zeitabhängigkeit der PKC Aktivierung durch S1P untersucht. Dabei zeigte sich eine rasche Phosphorylierung der PKC durch S1P. So wurde bereits nach 5 min eine Aktivierung der PKC induziert, die auch nach einer Stimulationszeit von 10 min noch immer in gleichem Ausmaße bestehen blieb und nach 30 min wieder auf das Kontrollniveau zurückfiel (Abb. 19C).

3.1.7 Einfluss der PKC Aktivierung auf die Proliferation

Nun war es von Interesse zu untersuchen, ob die gewonnenen Erkenntnisse zur Beeinflussung der Akt Aktivität durch die PKC Konsequenzen für die Proliferation der Keratinozyten nach sich ziehen. In Analogie zum hemmenden Einfluss des S1P auf das Insulin-induzierte Zellwachstum reduzierte auch TPA die Proliferation humaner Keratinozyten. So senkte die Stimulation mit 250 nM TPA für 15 min die basale Wachstumsrate der Zellen um 75 %. Darüber hinaus verminderte TPA die mitogene Wirkung des Insulins und reduzierte signifikant den [3 H]Thymidin-Einbau auf das Niveau des Effektes von TPA allein (Abb. 20).

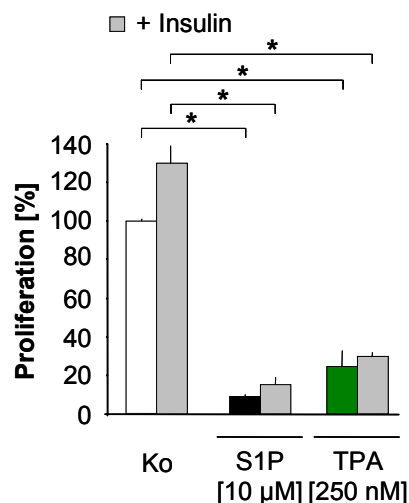


Abb. 20: Proliferationshemmung durch PKC Aktivierung. Keratinozyten wurden mit Kontrollvehikel, S1P für 10 min oder TPA für 15 min vorinkubiert. Anschließend wurde mit Insulin für 24 h stimuliert, wobei der [3 H]Thymidin-Einbau in den letzten 4 h erfolgte. Jeder Einzelwert wurde auf die mit Vehikeln behandelte Kontrolle bezogen. Jeder dargestellte Wert stellt den Mittelwert \pm SD einer Dreifachbestimmung dar. Das Ergebnis konnte in zwei weiteren Experimenten reproduziert werden. * $p \leq 0,05$ versus Kontrolle oder versus Stimulation mit Insulin.

3.1.8 Einfluss der PKC δ Hemmung auf die Akt Aktivität

Die gezeigten Ergebnisse lassen vermuten, dass S1P die Akt Dephosphorylierung und nachfolgende Proliferationshemmung in einem PKC-abhängigen Signalweg vermittelt. Die Regulation der Proliferation hängt jedoch stark von der Aktivität und Expression der verschiedenen PKC Subtypen ab, deren Wirkungen stark voneinander divergieren (Breitkreutz et al. 2007). PKC α , PKC δ , PKC ϵ , PKC η , PKC ζ , und PKC μ , werden in der Epidermis exprimiert (Dlugosz et al. 1992; Gschwendt et al. 1996). Jedoch wird vorwiegend der PKC δ eine Hemmung des Zellwachstums zugeschrieben (Jackson et al. 2004). PKC δ wurde als der entscheidende Subtyp der PKC identifiziert, der in murinen Keratinozyten eine Dephosphorylierung der Akt Kinase zu vermitteln vermag (Li et al. 2006). So sollte nachfolgend eine mögliche Regulation der PKC δ durch S1P untersucht werden.

Zunächst wurde die Regulation der Aktivität der Akt Kinase in Anwesenheit des spezifischen PKC δ Hemmstoffs Rottlerin untersucht (IC₅₀ Wert: 3 - 6 nM) (Gschwendt et al. 1994). Tatsächlich führte die Hemmung der PKC δ zu einer Reduktion der durch S1P induzierten Hemmung der basalen Akt Phosphorylierung. So wurde die durch S1P hervorgerufene Dephosphorylierung der unstimulierten Akt Kinase schon durch die Vorinkubation mit 2 μ M Rottlerin gehemmt. Das Kontrollniveau der Akt Phosphorylierung wurde trotz Stimulation mit S1P bei einer Vorinkubation mit 5 μ M Rottlerin erreicht, wobei noch höhere Konzentrationen des Hemmstoffs den Effekt des S1P nicht nur aufhoben sondern sogar zu einer Aktivierung der Akt Kinase führten (Abb. 21A).

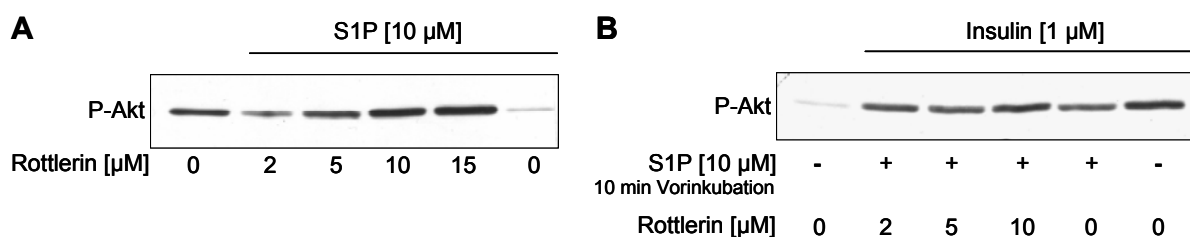


Abb. 21: Einfluss der PKC δ Hemmung durch Rottlerin. Keratinozyten wurden vor der Stimulation mit S1P für 10 min mit Rottlerin für 1 h vorinkubiert (A). Nach der Vorbehandlung mit Rottlerin wurden die Zellen mit S1P vorinkubiert und anschließend mit Insulin für 10 min stimuliert (B). Es folgte eine Western Blot-Analyse zur Detektion der Akt Phosphorylierung. Das Experiment wurde zweimal wiederholt und lieferte vergleichbare Ergebnisse.

Darüber hinaus führte die Vorinkubation mit Rottlerin ebenso zu einer Reduktion der hemmenden Wirkung des S1P auf die Insulin-vermittelte Akt Aktivierung. Hierbei

zeigte die Vorbehandlung mit 10 μM Rottlerin den stärksten Effekt und hob die durch S1P hervorgerufene Dephosphorylierung der durch Insulin aktivierten Akt Kinase fast vollständig auf (Abb. 21B).

Diese Ergebnisse sollten durch selektives Ausschalten der PKC δ durch die siRNA-Technik untermauert werden. Durch diese kleinen interferierenden RNA-Moleküle werden gezielt bestimmte Zielgene ausgeschaltet. Die Effizienz dieser Methode wurde mittels Western Blot-Analyse gezeigt. So konnte die Translation der PKC δ mRNA durch Transfektion mit 50 nM siRNA effektiv gehemmt werden. Dies zeigte sich in einer Bestimmung der Aktivität der PKC δ durch Detektion der Phosphorylierung an Thr⁵⁰⁵ nach Stimulation mit dem PKC Aktivator TPA. Um unspezifische Effekte durch die PKC δ siRNA auszuschließen, wurden die Zellen mit Kontroll siRNA transfiziert, einem Nukleotidduplex gleicher Größe jedoch mit zufälliger Sequenz, der selbst nicht zum Abbau einer zellulären mRNA führte (Abb. 22A). Interessanterweise verlor S1P in Keratinozyten, in denen die Expression der PKC δ gehemmt war, seine Fähigkeit, die Insulin-vermittelte Akt Aktivierung zu hemmen. So ließ sich in mit siRNA transfizierten Zellen eine starke Phosphorylierung der Akt Kinase durch die Stimulation mit Insulin detektieren, obwohl zuvor mit S1P vorinkubiert wurde. Erwartungsgemäß reduzierte S1P die durch Insulin induzierte Akt Phosphorylierung in mit Kontroll siRNA behandelten Zellen (Abb. 22B). Eine leichte Reduktion der Akt Aktivität war auch in siRNA transfizierten Zellen bei der Stimulation mit Insulin zu beobachten.

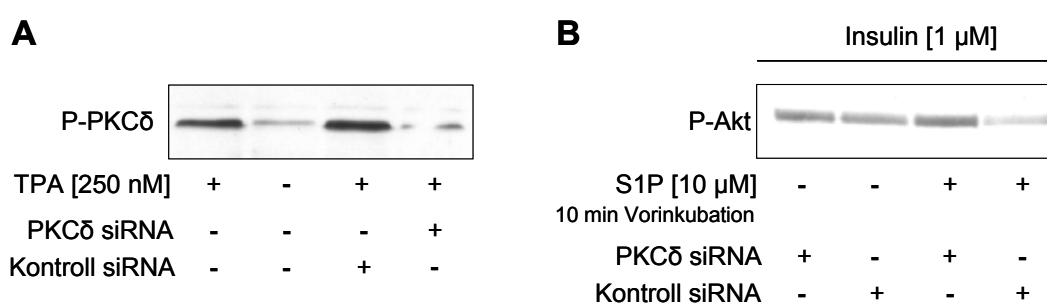


Abb. 22: Beeinflussung der Akt Phosphorylierung durch die PKC δ . Keratinozyten wurden mit PKC δ siRNA oder Kontroll siRNA transfiziert und mit TPA (A) oder nach einer Vorinkubation mit S1P mit Insulin für weitere 10 min stimuliert (B). Es folgte eine Western Blot-Analyse mit einem Anti-Phospho-PKC δ Antikörper. Die Experimente wurden zweimal wiederholt und erzielten vergleichbare Ergebnisse.

3.1.9 PKC δ Aktivierung durch S1P

Die Aktivierung der PKC δ durch S1P wurde nun mittels Western Blot-Analyse untersucht, der eine Detektion der Phosphorylierung an Thr⁵⁰⁵ zugrunde lag. Als

Positivkontrolle diente hierbei wiederum die Stimulation mit 250 nM TPA für 15 min. Tatsächlich induzierte S1P in humanen Keratinozyten eine Aktivierung der PKC δ , messbar als Phosphorylierung an Thr⁵⁰⁵. Bereits die Stimulation mit 0,5 μ M S1P führte nach einer Inkubation für 10 min zu einer Aktivierung der PKC δ , die ihren Maximalwert bei 5 μ M S1P erreichte (Abb. 23A). Darüber hinaus wurde eine Zeitabhängigkeit der durch S1P hervorgerufenen PKC δ Phosphorylierung untersucht. Es zeigte sich eine mit dem Ergebnis der PKC (pan) Aktivierung übereinstimmende Kinetik, mit einer starken Aktivierung, die nach 5 min einsetzte und nach 30 min abnahm (Abb. 23B). Da auch für die Insulin-vermittelte Induktion der Proliferation muriner Keratinozyten eine Beteiligung der PKC δ beschrieben wurde, wurde eine mögliche Aktivierung der PKC δ durch Insulin untersucht (Shen et al. 2001). In Einklang zu den bisherigen Ergebnissen führte die Stimulation der humanen Keratinozyten zu keiner ausgeprägten Aktivierung der PKC δ (Abb. 23C).

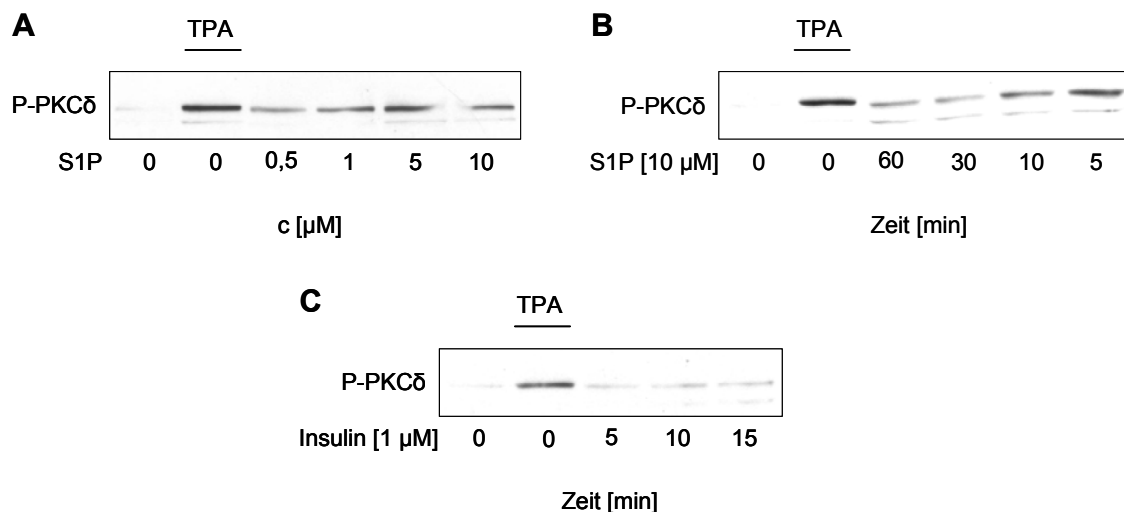


Abb. 23: Aktivierung der PKC δ . Keratinozyten wurden mit S1P für 10 min (A), für die genannten Zeiträume (B) oder mit Insulin (C) stimuliert. Eine Inkubation mit 250 nM TPA für 15 min diente in allen Experimenten als Positivkontrolle. Die Ergebnisse der Western Blot-Analysen konnten jeweils in zwei weiteren Experimenten reproduziert werden.

3.1.10 PKC δ vermittelt Hemmung der Proliferation

Um die PKC δ Aktivierung durch S1P auf die Beeinflussung des Zellwachstums zu übertragen, wurde die [³H]Thymidin-Inkorporation in mit PKC δ siRNA-behandelten Keratinozyten durchgeführt. Wie Abb. 24 zeigt, konnte Insulin seine wachstumsfördernde Wirkung sowohl in PKC δ siRNA-transfizierten Zellen als auch in mit Kontroll siRNA behandelten Zellen entfalten. Die Stimulation mit S1P führte in den Kontrollzellen zu einem signifikanten antiproliferativen Effekt und die Vorinkubation mit S1P senkte die starke mitogene Wirkung des Insulins. Dagegen

fürte die Stimulation mit S1P in PKC δ siRNA-behandelten Zellen zu keiner Wachstumshemmung und die Vorinkubation mit 10 μ M S1P konnte den mitogenen Insulineffekt nicht mindern (Abb. 24). Dies Ergebnis steht in Einklang zu der ausbleibenden Akt Dephosphorylierung durch S1P in PKC δ siRNA-behandelten Keratinozyten.

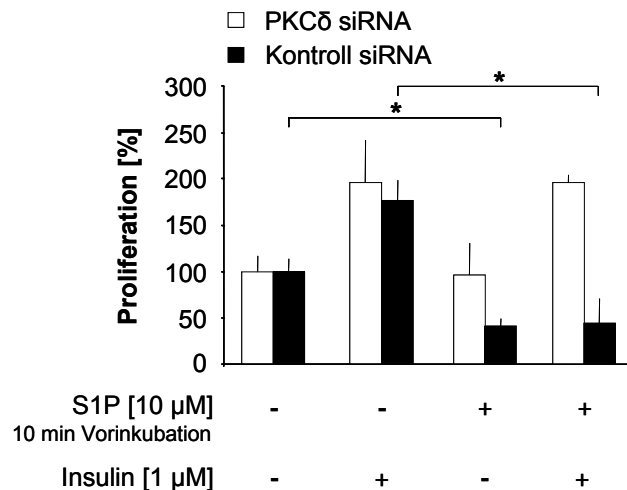


Abb. 24: Effekt der Ausschaltung von PKC δ auf die S1P-induzierte Proliferationshemmung. Keratinozyten wurden mit PKC δ siRNA oder Kontroll siRNA transfiziert und mit Insulin, S1P oder S1P mit nachfolgender Insulin-Behandlung stimuliert. Die Einzelwerte wurden jeweils auf die mit PKC δ siRNA oder Kontroll siRNA transfizierten Kontrollzellen bezogen und stellen Mittelwerte einer Dreifachbestimmung dar. Das Experiment wurde wiederholt und führte drei weitere Male zu reproduzierbaren Ergebnissen. * $p \leq 0,05$ versus Kontrolle und versus Stimulation mit Insulin.

3.1.11 Expression der S1P Rezeptoren in humanen Keratinozyten

S1P vermittelt einen Großteil seiner Effekte über GPCR, die als S1P $_{1-5}$ bezeichnet werden. In primären humanen Keratinozyten konnten alle Rezeptorsubtypen nachgewiesen werden (Vogler et al. 2003). Im Hinblick auf die spezifischen zellulären Wirkungen der einzelnen Rezeptorsubtypen, die sich zum Teil stark unterscheiden oder sogar gegensätzliche Signalwege vermitteln, war es von Interesse, den Gehalt an mRNA Transkripten der S1P Rezeptoren über eine quantitative Real-Time PCR Analyse zu charakterisieren. Nach Normalisierung der gewonnenen Daten gegen Cyclophilin A als Referenzgen wurde die relative mRNA Expression quantifiziert. mRNA Transkripte aller S1P Rezeptoren konnten nachgewiesen werden (Abb. 25).

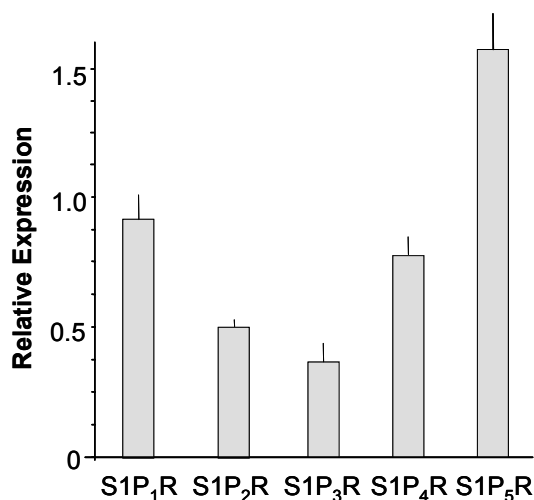


Abb. 25: Quantitative Bestimmung der Expression der S1P Rezeptoren in humanen Keratinozyten. Die rezeptorspezifischen mRNA-Transkripte wurden über eine Real-Time PCR Analyse quantifiziert. Die angegebenen Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SD einer Doppelbestimmung. Die Expressionsanalyse wurde zwei weitere Male mit jeweils verschiedenen Kulturansätzen wiederholt und lieferte vergleichbare Ergebnisse.

3.1.12 Beeinflussung der Regulation der Akt Aktivität durch PTX

Die Wirkungen von S1P werden zum Teil über membranständige Rezeptoren, aber teilweise auch intrazellulär vermittelt (Spiegel et al. 2003a). Doch ist die Beeinflussung der Zellproliferation durch S1P bisher nahezu ausschließlich durch Aktivierung von GPCR beschrieben worden (Radeff-Huang et al. 2004). Für die gezeigte Regulation der Akt Kinase und folgende Proliferationshemmung sollte nun eine Beteiligung der S1P Rezeptoren mittels PTX untersucht werden. Die durch PTX katalysierte Ribosylierung des ADP an den $G_{\alpha i}$ -Untereinheiten der G-Proteine führt dazu, dass GDP an der α -Untereinheit gebunden bleibt und keine intrazellulären Signalkaskaden aktiviert werden können (Murayama et al. 1983). Alle der in Keratinozyten exprimierten S1P Rezeptoren interagieren mit G_i -Proteinen. Eine Vorbehandlung der Keratinozyten mit 200 ng/ml PTX führte zu einer Reduktion der S1P-vermittelten Wirkung auf die Akt Phosphorylierung (Abb. 26).

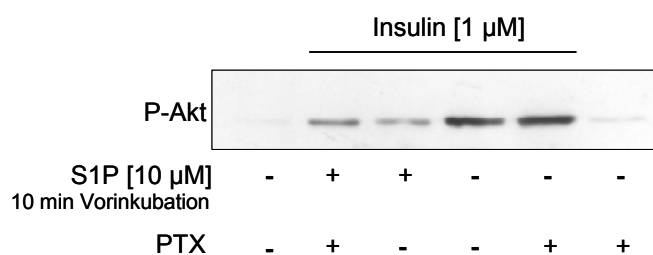


Abb. 26: Einfluss von PTX auf die S1P-induzierte Akt Dephosphorylierung. Keratinozyten wurden 3 h mit PTX vorinkubiert, mit S1P vorbehandelt und anschließend mit Insulin stimuliert, bevor auf die Akt Aktivierung mittels Western Blot-Analytik getestet wurde. Das Ergebnis konnte in zwei weiteren Experimenten reproduziert werden.

3.1.13 Beteiligung der S1P Rezeptorsubtypen an der Regulation der Akt Kinase

Der beteiligte Rezeptorsubtyp sollte nun mittels Antisense-Technologie charakterisiert werden. Die Effektivität dieser Methode, gemessen an der verringerten Expression der Rezeptoren, wurde auf Ebene der mRNA durch Real-Time PCR Experimente (Abb. 27A) und auf Proteinebene anhand einer Western Blot-Analyse bestätigt (Abb. 27B).

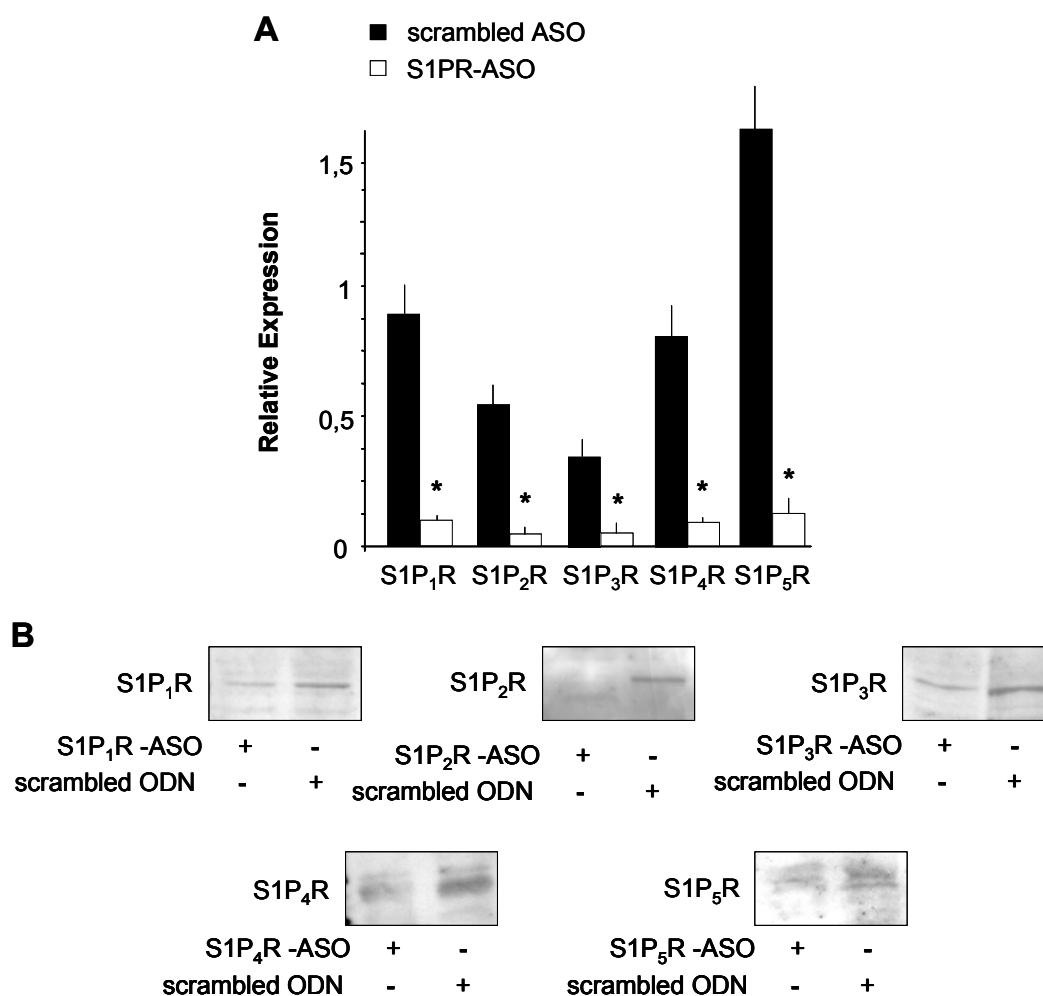


Abb. 27: Hemmung der Expression der S1P Rezeptoren mittels Antisense-Technologie. Keratinozyten wurden mit Antisense oder scrambled ODN transfiziert. Die Quantifizierung der rezeptorspezifischen mRNA-Transkripte erfolgte über eine Real-Time PCR Analyse. Die angegebenen Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SD einer Doppelbestimmung normalisiert gegen Cyclophilin A als Referenzgen (A). Die Western Blot-Analyse erfolgte mit den entsprechenden Anti-S1P Rezeptor (S1PR)-Antikörpern (B). Die Experimente wurden jeweils zweimal unabhängig wiederholt und lieferten vergleichbare Ergebnisse.

Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass ausschließlich der S1P₂ Rezeptor die Hemmung der Akt Phosphorylierung vermittelte. Das Ausschalten des S1P₁, S1P₃, S1P₄ sowie des S1P₅ Rezeptors beeinflusste dagegen die durch S1P hervorgerufene Dephosphorylierung der Insulin-induzierten Akt Kinase in keiner Weise. In Gegenwart

der Kontrolle durch scrambled ODN kam es in allen Experimenten zu einer ausgeprägten Akt Dephosphorylierung durch S1P (Abb. 28).

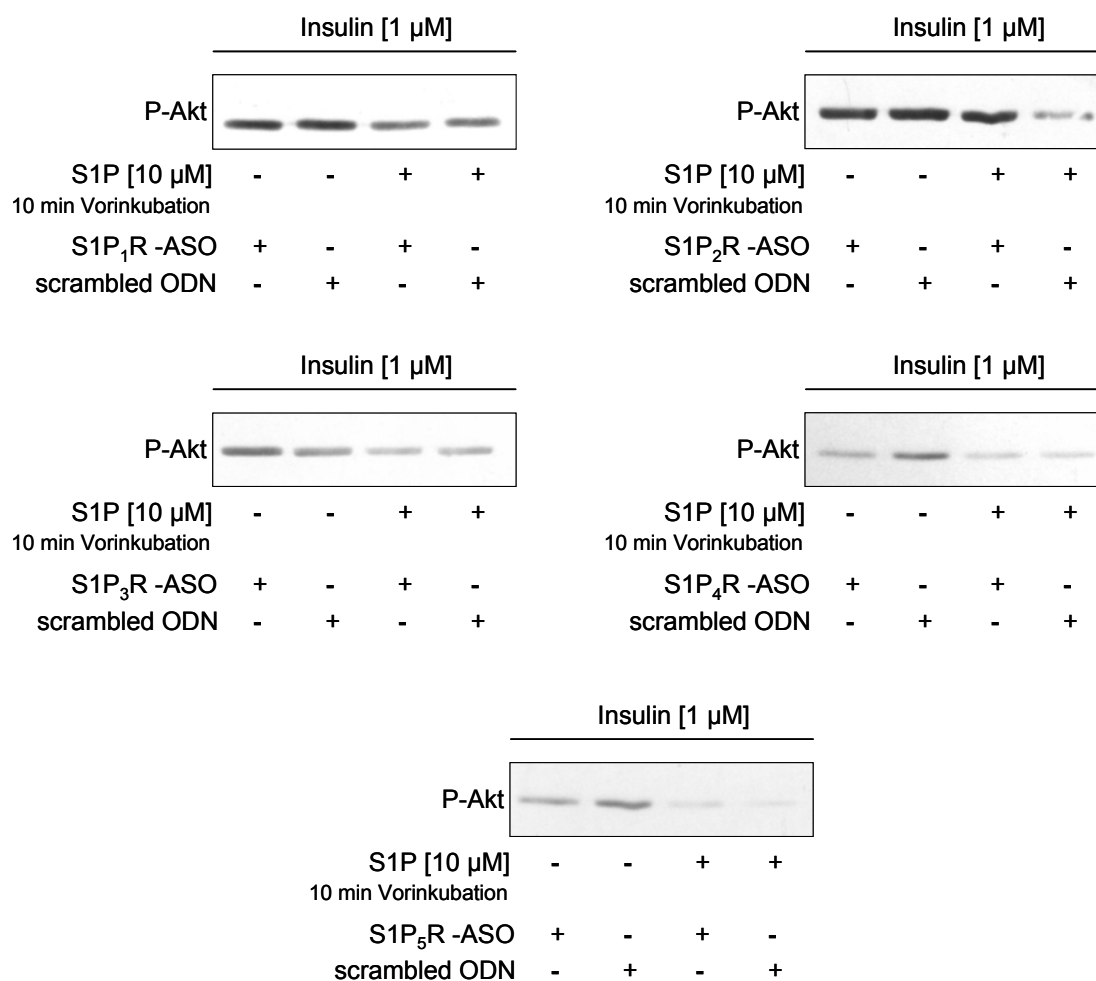


Abb. 28: Einfluss von S1P₁₋₅ Antisense ODN auf die S1P-induzierte Akt Dephosphorylierung. Keratinozyten wurden mit Antisense ODN gegen den jeweiligen Rezeptorsubtyp oder mit dem entsprechenden scrambled ODN inkubiert. Nach einer Vorinkubation mit S1P erfolgte die Stimulation mit Insulin für 10 min. Die Akt Phosphorylierung wurde durch Western Blot-Analytik untersucht. Die Ergebnisse wurden in zwei weiteren unabhängigen Experimenten bestätigt.

3.1.14 Hemmung der Proliferation über S1P₂

In einem weiteren Schritt sollte nun die Abhängigkeit der Proliferationshemmung vom S1P₂ Rezeptor untersucht werden. Es zeigte sich, dass sowohl die Hemmung der basalen Proliferation als auch die Hemmung des mitogenen Insulineffektes durch Vorbehandlung der Zellen mit S1P₂ Antisense ODN aufgehoben wurden (Abb. 29).

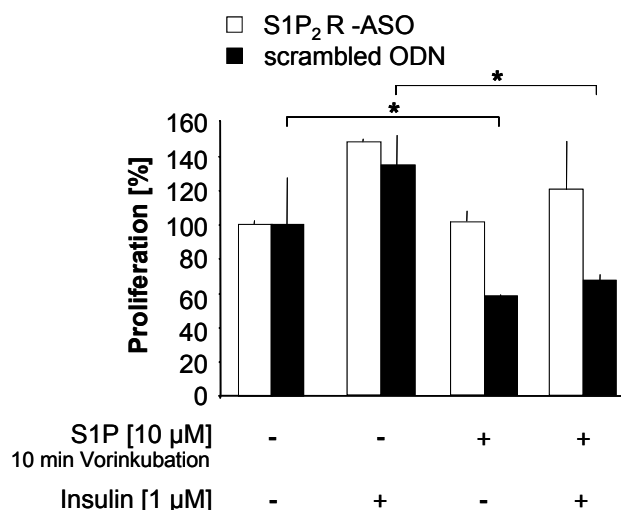


Abb. 29: Beteiligung des S1P₂ Rezeptors an der Proliferationshemmung. Zellen wurden mit Antisense ODN gegen den S1P₂ Rezeptor oder mit dem entsprechenden scrambled ODN transfiziert. Eine Vorinkubation mit S1P erfolgte vor der Stimulation mit Insulin. Jeder Wert wurde auf die mit dem Vehikel behandelte entsprechende Kontrolle bezogen und stellt den Mittelwert \pm SD einer Dreifachbestimmung dar. Das Experiment wurde zweimal wiederholt und zeigte gleiche Resultate. * $p \leq 0,05$ versus Kontrolle und versus Stimulation mit Insulin.

3.1.15 Beeinflussung der Akt Kinase durch JTE013 und FTY720-P

Um zu untermauern, dass die Aktivierung des S1P₂ Rezeptorsubtyps für die Dephosphorylierung der durch Insulin aktivierten Akt Kinase verantwortlich ist, wurde zum einen ein Antagonist des S1P₂ Rezeptors, JTE013, und zum anderen die phosphorylierte Wirkform des Rezeptoragonisten FTY720 eingesetzt. JTE013 wirkt mit einem IC₅₀ Wert von 17,6 nM als selektiver Antagonist am S1P₂ Rezeptor (Parrill et al. 2004). FTY720 wirkt dagegen nach Phosphorylierung an vier der fünf S1P Rezeptoren mit Ausnahme des S1P₂ Rezeptors agonistisch (Brinkmann et al. 2002). Damit stellen diese Substanzen gute Werkzeuge dar, um die große Bedeutung des S1P₂ Rezeptors in den dargestellten Signalwegen zu bestätigen.

Die Hemmung der Insulin-vermittelten Akt Aktivierung durch S1P wurde in Gegenwart von JTE013 aufgehoben (Abb. 30A). Ein vergleichbares Ergebnis lieferte die Vorinkubation der Zellen mit FTY720-P anstelle von S1P. So wurde die Insulin-induzierte Phosphorylierung der Akt Kinase durch die Vorbehandlung mit FTY720-P nicht beeinflusst. Darüber hinaus führte die Stimulation der Keratinozyten mit FTY720-P im Gegensatz zum S1P zu keinerlei Hemmung der basalen Akt Phosphorylierung (Abb. 30B).

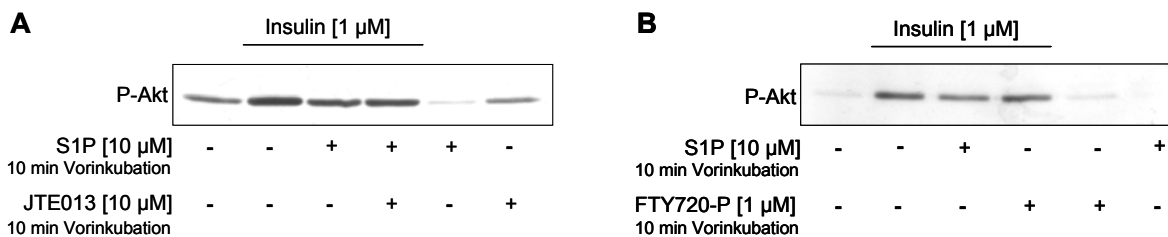


Abb. 30: Einfluss von JTE013 und FTY720-P auf die Hemmung der Akt Phosphorylierung. Nach Behandlung mit JTE013 und Vorinkubation mit S1P wurden die Zellen mit Insulin stimuliert (A). Die Keratinozyten wurden vor der Stimulation mit Insulin entweder mit S1P oder FTY720-P vorinkubiert (B). Die Bestimmung der Akt Aktivierung erfolgte durch Western Blot-Analytik. Die Ergebnisse konnten in jeweils zwei weiteren Experimenten reproduziert werden.

3.1.16 Wirkung des FTY720-P auf die Proliferation humaner Keratinozyten

Die Ergebnisse zur Beeinflussung der Aktivität der Akt Kinase bestätigen, dass die Hemmung der Insulin-induzierten Akt Kinase über den S1P₂ Rezeptor vermittelt wird. Um die Ergebnisse der Proliferationsmessung in Keratinozyten, in denen der S1P₂ Rezeptorsubtyp mittels Antisense Strategie ausgeschaltet worden war, zu untermauern, sollte die Beeinflussung des Zellwachstums durch FTY720-P untersucht werden.

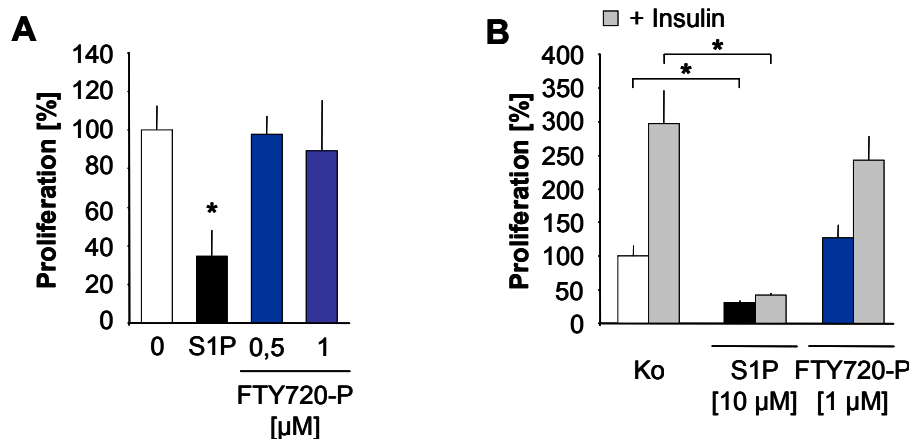


Abb. 31: Beeinflussung der Proliferation durch FTY720-P. Zellen wurden mit 10 μM S1P oder FTY720-P in den angegebenen Konzentrationen (A) oder vor der Stimulation mit 1 μM Insulin für 10 min mit S1P oder FTY720-P behandelt (B) und der [³H]Thymidin-Einbau gemessen. Jeder Einzelwert wurde auf die ausschließlich mit Vehikel behandelte Kontrolle bezogen. Jeder dargestellte Wert stellt den Mittelwert ± SD einer Dreifachbestimmung dar. Die Ergebnisse konnten jeweils in zwei weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert werden. *p ≤ 0,05 versus Kontrolle oder versus Stimulation mit Insulin.

Wie zu erwarten war, führte die Stimulation der Keratinozyten mit FTY720-P keineswegs zu einer Hemmung der Proliferation. Dies steht im klaren Gegensatz zur wachstumshemmenden Wirkung des S1P und zeigt deutlich, dass dieser Effekt über den S1P₂ Rezeptor vermittelt wird (Abb. 31A). Darüber hinaus wurde die

Beeinflussung der mitogenen Wirkung des Insulins durch FTY720-P untersucht. Die Messung der Thymidin-Inkorporation ergab, dass die Vorinkubation mit FTY720-P nicht zu einer signifikanten Hemmung der durch Insulin induzierten Proliferation führte (Abb. 31B).

3.1.17 Aktivierung der PKC δ über S1P $_2$

Abschließend stellte sich die Frage, ob der S1P $_2$ Rezeptor auch für die Aktivierung der PKC δ verantwortlich ist. Zu diesem Zweck wurde die PKC δ Aktivierung durch S1P in Gegenwart von S1P $_2$ Antisense ODN untersucht. Die Western Blot-Analyse der PKC δ Phosphorylierung ergab, dass S1P in Abwesenheit des S1P $_2$ Rezeptors keine Aktivierung der PKC δ zu evozieren vermochte (Abb. 32A). Um die Rolle des S1P $_2$ Rezeptors für die PKC δ Aktivierung zu manifestieren, wurden Keratinozyten mit FTY720-P stimuliert. Im Gegensatz zur Behandlung mit S1P führte FTY720-P zu einer kaum ausgeprägten Phosphorylierung der PKC δ (Abb. 32B). Schließlich wurde die Aktivierung der PKC δ durch S1P in Anwesenheit des S1P $_2$ Rezeptorantagonisten JTE013 untersucht. War der Rezeptor blockiert, so rief die Stimulation mit S1P eine stark abgeschwächte Phosphorylierung der PKC δ hervor (Abb. 32C).

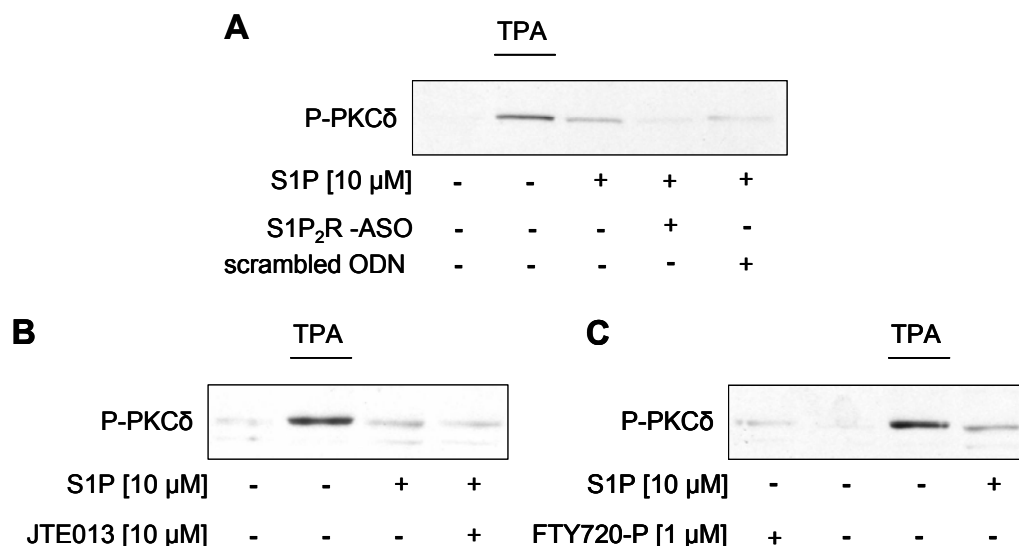


Abb. 32: Beeinflussung der PKC δ Aktivierung durch S1P $_2$. Keratinozyten wurden mit Antisense oder scrambled ODN transfiziert. Es folgte eine Stimulation mit S1P für 10 min (A). Vor der Stimulation mit S1P für 10 min wurden die Zellen mit JTE013 behandelt (B). Die Zellen wurden entweder mit S1P oder FTY720-P für 10 min stimuliert (C). In allen Experimenten diente die Stimulation mit 250 nM TPA für 15 min als Positivkontrolle. Die Ergebnisse der Western Blot-Analytik wurden jeweils in zwei weiteren Experimenten bestätigt.

3.1.18 Zytoprotektive Wirkung des Insulins auf Keratinozyten

Über eine Aktivierung des S1P₂ Rezeptors hemmte S1P die Akt Phosphorylierung und auf diese Weise Insulin-vermittelte Signalwege. Die gezeigte Interaktion der durch S1P und Insulin vermittelten Signalwege sollte nun über die beschriebenen Konsequenzen für das Zellwachstum hinaus, auf eine mögliche Beeinflussung der Insulin-vermittelten antiapoptotischen Signalwege durch S1P geprüft werden. Die Akt Kinase nimmt eine Schlüsselposition in der Regulation der zellulären Apoptose ein (Song et al. 2005). Daher wurde zunächst die antiapoptotische Wirkung des Insulins in Keratinozyten untersucht.

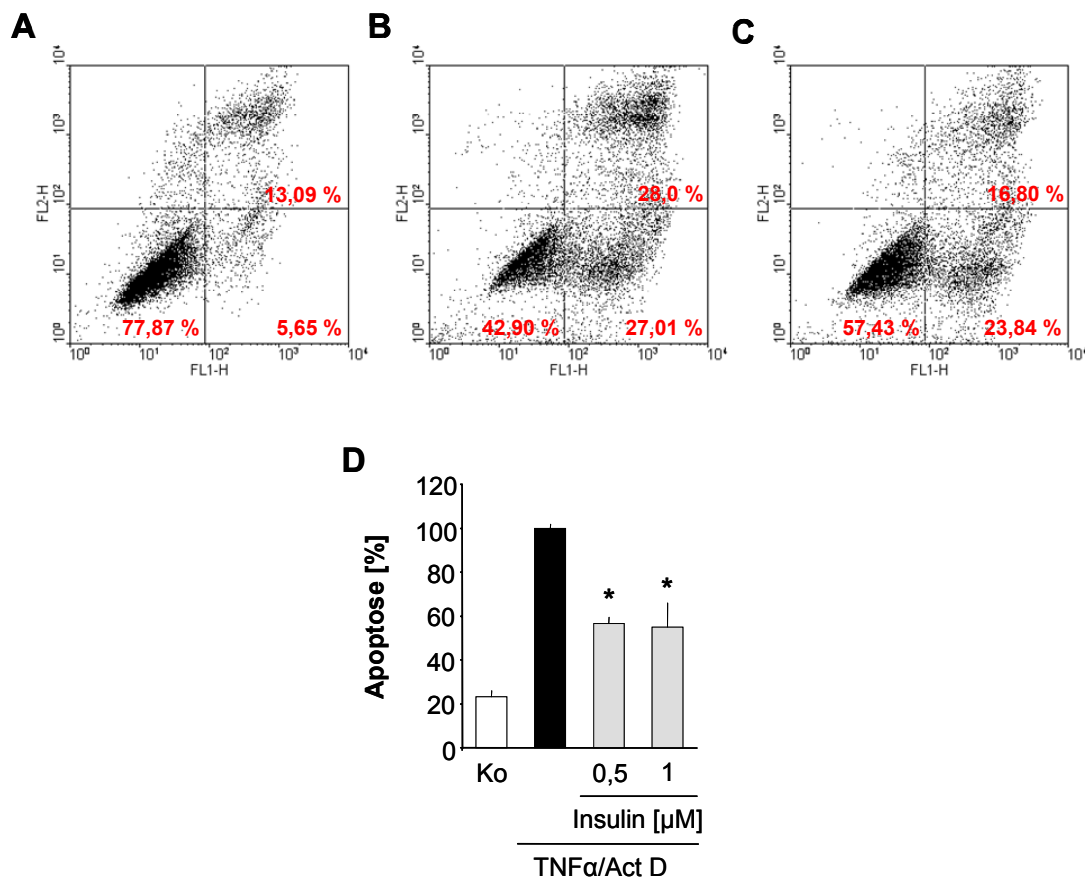


Abb. 33: Antiapoptotische Wirkung des Insulins. Keratinozyten wurden für 16 h mit Kontrollvehikeln (A), mit TNF α und Actinomycin D (B), nach einer Vorinkubation mit 1 μ M Insulin für 10 min mit TNF α und Actinomycin D (C) oder nach einer Vorinkubation mit Insulin in den genannten Konzentrationen für 10 min mit TNF α und Actinomycin D (D) behandelt. Anschließend wurde die Apoptoserate durchflusszytometrisch bestimmt. A-C stellen Dot Plots eines exemplarischen Experiments dar (FL1-H: Fluoreszenzintensität Annexin V-FITC; FL2-H: Fluoreszenzintensität PI). Die in D dargestellten Apoptoseraten sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen \pm SD. Die unabhängige Wiederholung der Experimente lieferte gleiche Ergebnisse. * $p \leq 0,05$.

Die Induktion der Apoptose in Keratinozyten erfolgte durch Stimulation mit TNF α in Gegenwart des Transkriptionsinhibitors Actinomycin D. Eine quantitative

Vermessung apoptotischer Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie im Anschluss an eine Färbung der Zellen mit FITC-markiertem Annexin V und PI.

Abb. 33A und B zeigen in repräsentativen Dot Plots, dass die Stimulation der Keratinozyten mit TNF α und Actinomycin D zu einem Anstieg der mit Annexin V gefärbten, apoptotischen sowie mit Annexin V und PI gefärbten, spätapoptotischen Zellen um mehr als 100 % hervorrief. Eine Vorinkubation der Zellen mit Insulin für 10 min führte zu einer ausgeprägten Reduktion der Anzahl Annexin V- und PI-gefärbter Zellen (Abb. 33C). Die durch TNF α und Actinomycin D induzierte Apoptose wurde signifikant durch Insulin gehemmt, wobei kein Unterschied zwischen der Vorinkubation mit einer Konzentration von 0,5 μ M oder 1 μ M an Insulin bestand (Abb. 33D).

3.1.19 Antiapoptotischer Effekt des S1P

Interessanterweise führt auch S1P in humanen Keratinozyten zu einem nicht näher charakterisierten antiapoptotischen Effekt (Vogler et al. 2003). Dies erscheint paradox, da S1P im Gegensatz zu Insulin eine Hemmung der Akt Kinase induziert, doch führte die Vorinkubation mit S1P zu einer eindeutigen Senkung der durch TNF α und Actinomycin D induzierten Apoptoserate. Eine Stimulation der Keratinozyten mit S1P für 1 h vor der Induktion der Apoptose rief eine Reduktion der Apoptoserate hervor, die schon bei einer Stimulation der Zellen mit 1 μ M S1P auftrat und bei 10 μ M S1P einen Maximaleffekt erreichte (Abb. 34). Daher wurde in den folgenden Experimenten diese S1P Konzentration eingesetzt.

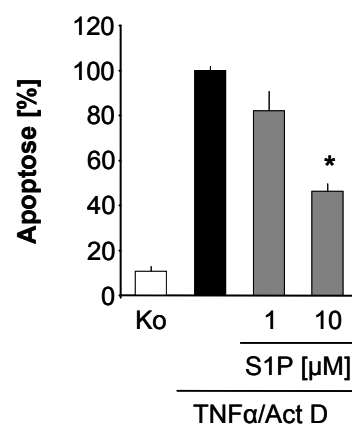


Abb. 34: Antiapoptotische Wirkung des S1P. Keratinozyten wurden vor der Induktion der Apoptose für 1 h mit S1P inkubiert. Die Apoptoserate wurde durchflusszytometrisch nach Färbung mit Annexin V und PI bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen \pm SD. Dies Experiment wurde zweimal wiederholt und lieferte vergleichbare Ergebnisse. * $p \leq 0,05$.

3.1.20 Interferenz antiapoptotischer Signalwege des S1P mit Insulin und IGF-I

Da gezeigt werden konnte, dass S1P eine Hemmung der Insulin-vermittelten Akt Aktivierung verursachte, sollte untersucht werden, ob S1P neben der beschriebenen Beeinflussung des Zellwachstums mit dem antiapoptotischen Signalweg des Insulins interagiert. Dies wäre besonders interessant, da sowohl Insulin als auch S1P Keratinozyten vor der Apoptose schützen. Tatsächlich führte die Vorinkubation mit S1P zu einer signifikanten Reduktion des antiapoptotischen Effektes der beiden Akt Aktivatoren IGF-I und Insulin auf das Niveau der Apoptoserate, das bei alleiniger Stimulation mit S1P vor der Induktion der Apoptose erreicht wurde (Abb. 35).

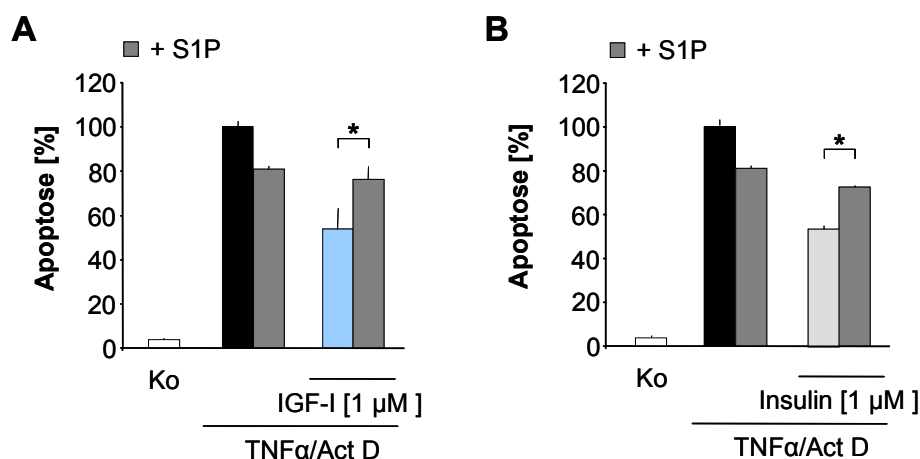


Abb. 35: Interaktion des S1P mit den IGF-I- und Insulin-vermittelten antiapoptotischen Signalwegen. Keratinozyten wurden vor der Stimulation (10 min) mit IGF-I (A) oder mit Insulin (B) mit 10 µM S1P für 10 min vorbehandelt. Nach der Induktion der Apoptose wurde die Apoptoserate durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen ± SD. Die Ergebnisse konnten jeweils in zwei unabhängigen Experimenten reproduziert werden. * $p \leq 0,05$ versus Stimulation mit IGF-I oder Insulin.

3.1.21 Beteiligung des S1P₂ Rezeptorsubtyps

Da die Aktivierung der Akt Kinase von entscheidender Bedeutung für die Transduktion antiapoptotischer Signalwege des IGF-I oder Insulins ist, war es nun von besonderem Interesse, die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Hemmung der Akt Kinase durch S1P auf die Interaktion der antiapoptotischen Signalwege zu übertragen. Da die Hemmung der Insulin-induzierten Akt Phosphorylierung eindeutig durch den S1P₂ Rezeptor vermittelt wurde, sollte nun die Beeinflussung des antiapoptotischen Effektes des Insulins durch S1P in Gegenwart des S1P₂ Rezeptorantagonisten JTE013 und durch FTY720-P untersucht werden. Wie zu erwarten war, wurde die Reduktion des Insulin-vermittelten antiapoptotischen Effektes durch S1P vermindert, wenn der S1P₂

Rezeptor durch JTE013 blockiert wurde. Jedoch wurde nicht das Ausmaß des antiapoptotischen Effektes erreicht, das durch ausschließliche Stimulation der Zellen mit Insulin erzielt wurde (Abb. 36A). Dieses Ergebnis konnte durch den Einsatz von FTY720-P untermauert werden. Tatsächlich wurde die Apoptoserate der Zellen, die vor der Stimulation mit Insulin mit FTY720-P statt mit S1P behandelt wurden, im Vergleich zu dem durch Insulin allein hervorgerufenen Effekt nicht erhöht. Im Falle der Vorinkubation der Zellen mit FTY720-P vor der Stimulation mit Insulin konnte sogar ein noch stärkerer antiapoptotischer Effekt erreicht werden als bei alleiniger Stimulation mit Insulin (Abb. 36B).

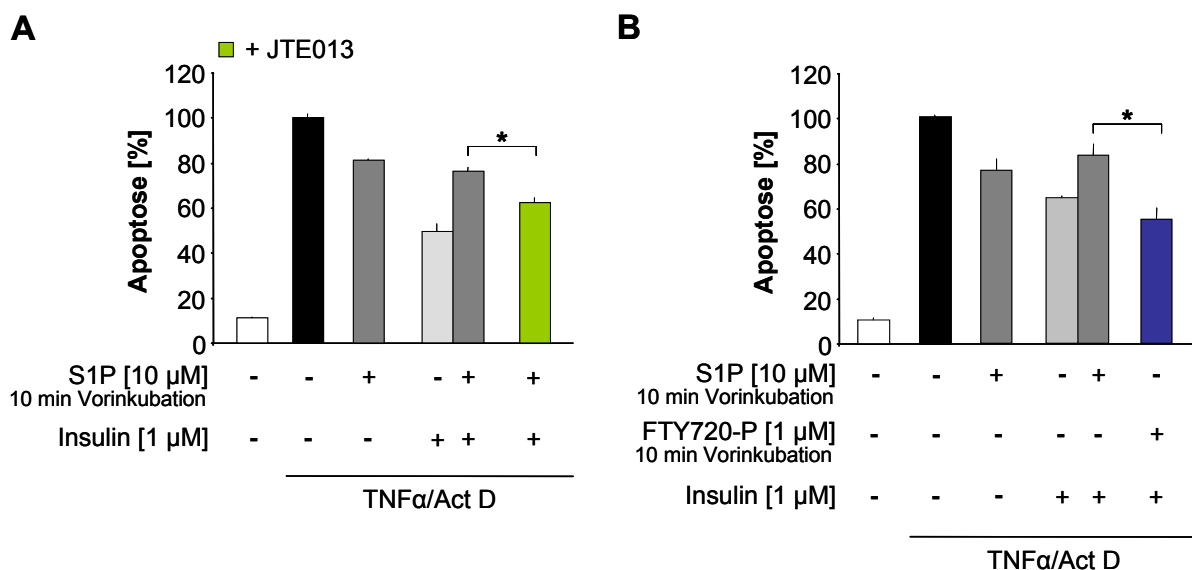


Abb. 36: Beeinflussung des antiapoptotischen Effektes des Insulins durch S1P₂. Keratinozyten wurden zunächst mit 10 µM JTE013 für 10 min vorbehandelt und vor der Stimulation mit Insulin mit S1P inkubiert (A). Die Zellen wurden mit S1P oder FTY720-P vorbehandelt und 10 min mit Insulin stimuliert (B). Nach der Induktion der Apoptose wurde die Apoptoserate durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt werden Mittelwerte aus Doppelbestimmungen ± SD. Die jeweils zweimalige Wiederholung der Experimente lieferte vergleichbare Ergebnisse. * $p \leq 0,05$ versus Vorinkubation mit S1P vor der Stimulation mit Insulin.

3.2 Charakterisierung des antiapoptotischen Effektes des S1P in Keratinozyten

3.2.1 Rolle der Akt Kinase in der Vermittlung des antiapoptotischen Effektes des S1P

Die Regulation der Apoptose durch S1P sollte nun näher charakterisiert werden. Die bisher gewonnenen Erkenntnisse lassen den Schluss zu, dass S1P über einen von der Akt Kinase unabhängigen Weg seine antiapoptotische Wirkung entfaltet. Dies sollte durch den Einsatz des PI3K Hemmstoffs LY294002 (IC_{50} Wert: $1,4 \mu\text{M}$) gezeigt werden (Vlahos et al. 1994). Die große Bedeutung der Akt Kinase bei der Regulation der Apoptose wurde schon bei der Vorbehandlung der Zellen mit dem Inhibitor vor der Induktion der Apoptose deutlich, denn im Falle der Ausschaltung des PI3K/Akt Signalweges wurde die Apoptoserate noch um weitere 30 % erhöht. Doch erstaunlicherweise vermochte S1P in Gegenwart des PI3K Hemmstoffs nicht, Keratinozyten vor $\text{TNF}\alpha$ -induzierter Apoptose zu schützen, obgleich S1P die Akt Kinase hemmte (Abb. 37A). Des Weiteren sollte nun die Wirkung des PI3K Hemmstoffs auf die Aktivität der Akt Kinase untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde eine Western Blot-Analyse zur Detektion der Akt Aktivierung durchgeführt. In Keratinozyten war in Anwesenheit des PI3K Hemmstoffs keine Akt Phosphorylierung detektierbar (Abb. 37B).

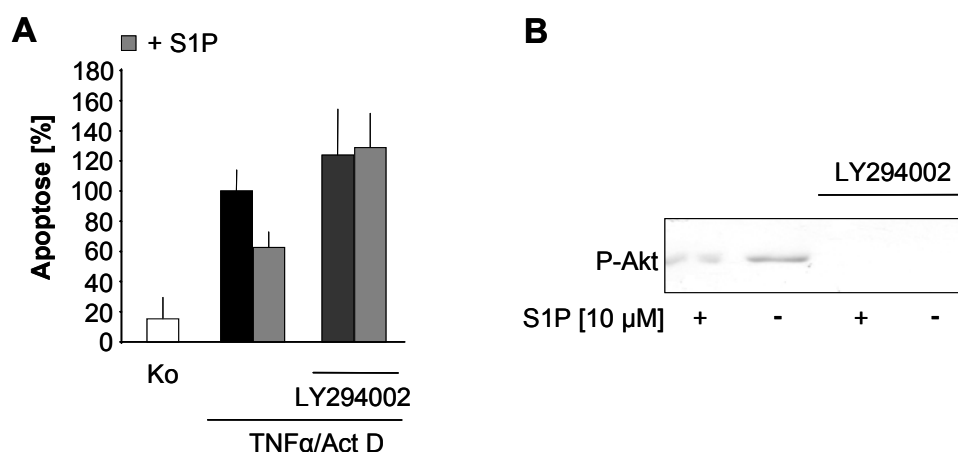


Abb. 37: Hemmung des PI3K/Akt Signalweges. Keratinozyten wurden mit $50 \mu\text{M}$ LY294002 für 1 h vorbehandelt und mit $10 \mu\text{M}$ S1P stimuliert. Entweder wurde nach der Induktion der Apoptose die Apoptoserate durch Durchflusszytometrie bestimmt (A) oder es wurden direkt nach der Stimulation mit S1P für 15 min Zelllysate gewonnen und diese einer Western Blot-Analyse unterworfen (B). Die Werte repräsentieren Mittelwerte von Doppelbestimmungen \pm SD. Die Experimente wurden jeweils zweimal wiederholt und zeigten vergleichbare Ergebnisse.

3.2.2 Beteiligung der S1P Rezeptoren an der zytoprotektiven Wirkung des S1P

Um eine Beteiligung der GPCR an der antiapoptotischen Wirkung des S1P zu überprüfen, wurden Keratinozyten mit PTX vorbehandelt und anschließend mit 10 μ M S1P stimuliert. Die Bestimmung der Apoptoserate erfolgte nach der Stimulation mit TNF α und Actinomycin D. Die Vorinkubation mit PTX verminderte den antiapoptotischen Effekt des S1P, hob ihn jedoch nicht vollständig auf (Abb. 38).

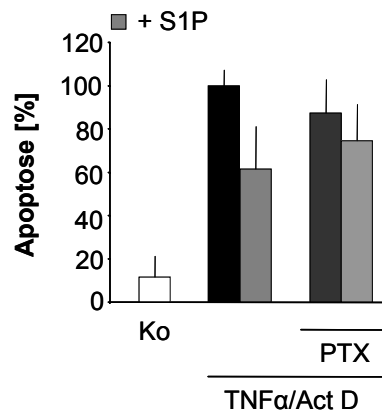


Abb. 38: Beeinflussung des antiapoptotischen Effektes des S1P durch PTX. Keratinozyten wurden 3 h mit 200 ng/ml PTX vorinkubiert. Daraufhin folgte eine Vorbehandlung der Zellen mit 10 μ M S1P für 10 min bevor die Induktion der Apoptose stattfand. Die Apoptoserate wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die dargestellten Werte stellen Mittelwerte von Doppelbestimmungen \pm SD dar. Die zweimalige Wiederholung des Experiments lieferte gleiche Ergebnisse.

3.2.3 Einfluss der S1P Rezeptorsubtypen auf die antiapoptotische Wirkung des S1P

Im nun folgenden Schritt sollte der an der Vermittlung der antiapoptotischen Wirkung beteiligte Rezeptorsubtyp durch die Antisense-Technologie identifiziert werden. Zu diesem Zweck wurden Keratinozyten mit Antisense ODN gegen den jeweiligen S1P Rezeptor und Kontrollzellen mit scrambled ODN transfiziert. In Gegenwart von scrambled ODN führe S1P immer zu einer signifikante Reduktion der Apoptoserate. Auch im Falle einer Hemmung der Expression des S1P₁, S1P₂, S1P₄ und S1P₅ Rezeptors konnte S1P seine antiapoptotische Wirkung entfalten. Jedoch zeigte S1P in Abwesenheit des S1P₃ Rezeptors keinerlei zytoprotektive Wirkung. So verblieb in diesen Zellen die Apoptoserate trotz Vorinkubation mit S1P auf dem Niveau der Apoptosekontrolle (Abb. 39).

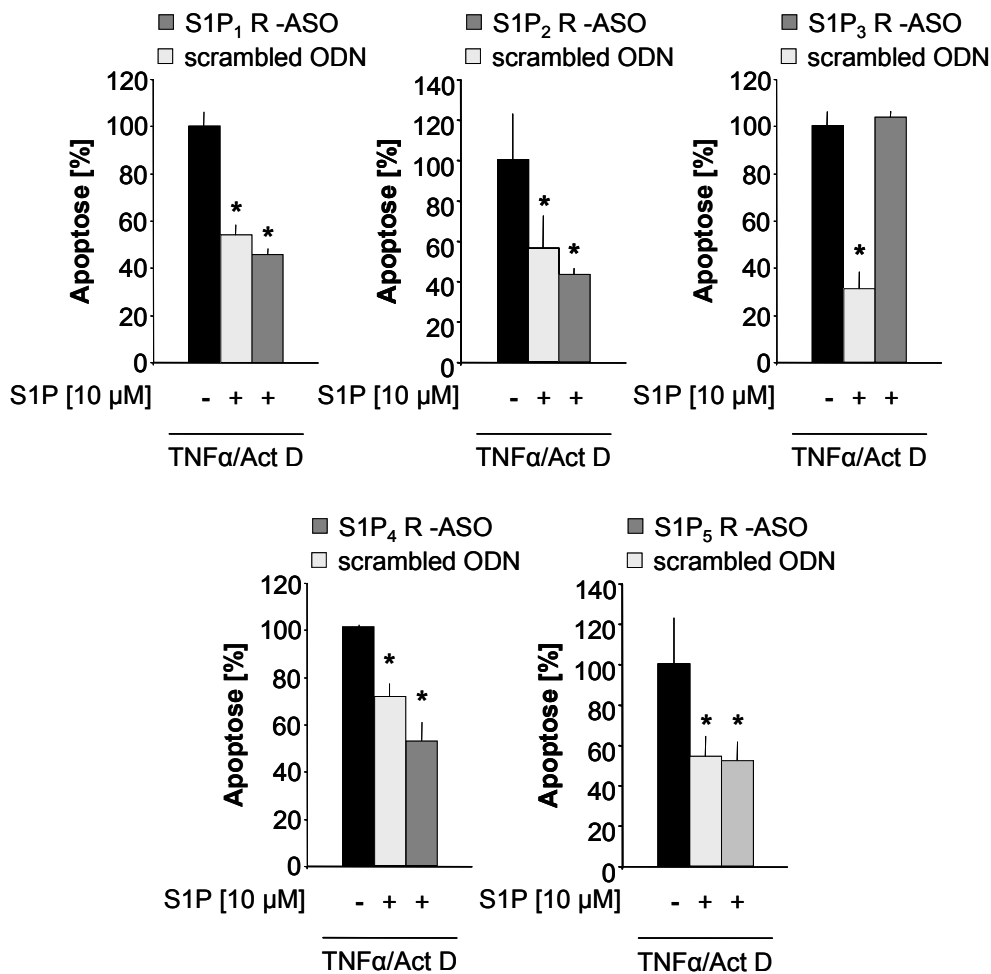


Abb. 39: Beeinflussung des antiapoptotischen Effektes durch die S1P Rezeptoren. Keratinozyten wurden mit Antisense oder scrambled ODN transfiziert. Die Kontrollzellen wurden mit Transfektionsreagenz behandelt. Vor der Induktion der Apoptose erfolgte eine Vorinkubation der Zellen mit S1P für 1 h. Die Apoptoserate wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte einer Doppelbestimmung \pm SD. Die jeweiligen Experimente wurden mindestens einmal mit gleichen Ergebnissen wiederholt. * $p \leq 0,05$.

3.2.4 Einfluss von S1P₁ auf die antiapoptotische Wirkung des S1P

Die Ergebnisse zur Beteiligung der S1P Rezeptorsubtypen an der antiapoptotischen Wirkung sollte nun durch entsprechende Rezeptoragonisten und –antagonisten bestätigt werden. Um den S1P₁ Rezeptor als jenen für den antiapoptotischen Effekt verantwortlichen Rezeptorsubtyp auszuschließen, wurde der selektive S1P₁ Rezeptor Agonist SEW2871 eingesetzt (IC₅₀ Wert: 37 nM) (Jo et al. 2005). In diesem Sinne wurden Keratinozyten mit SEW2871 für 1 h vorbehandelt, bevor anschließend die Induktion der Apoptose mit TNFα und Actinomycin D erfolgte. Wie zu erwarten war, führte die selektive Aktivierung des S1P₁ Rezeptors zu keinem zytoprotektiven Effekt (Abb. 40).

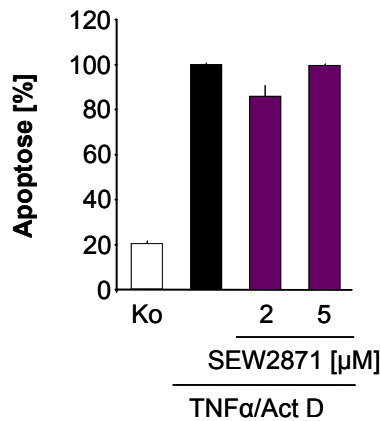


Abb. 40: Untersuchung der Beeinflussung des antiapoptotischen Effektes durch SEW2871. Keratinozyten wurden vor der Induktion der Apoptose mit SEW2871 vorbehandelt. Die Apoptoserate wurde durch durchflusszytometrische Analyse der Annexin V und PI gefärbten Zellen bestimmt. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert einer Doppelbestimmung \pm SD. Das Experiment wurde unabhängig zwei weitere Male durchgeführt und zeigte vergleichbare Ergebnisse.

3.2.5 Einfluss von S1P₂ auf die antiapoptotische Wirkung des S1P

Von besonders großem Interesse war es nun, die Rolle des S1P₂ Rezeptors in der Regulation des S1P-vermittelten zytoprotektiven Effektes weiter zu untersuchen, da bereits gezeigt werden konnte, dass die Hemmung der Akt Phosphorylierung über eine Aktivierung dieses Rezeptors vermittelt wurde (Abb. 28). Antisense Experimente zeigten bereits, dass S1P in Abwesenheit des S1P₂ Rezeptors sogar eine stärkere protektive Wirkung ausübte. Um dies zu untermauern, wurde der S1P₂ Rezeptorantagonist JTE013 eingesetzt. Tatsächlich führte die Vorbehandlung der Zellen mit dem Rezeptorantagonisten zu einer Verstärkung des antiapoptotischen Effektes des S1P um weitere 20 % (Abb. 41).

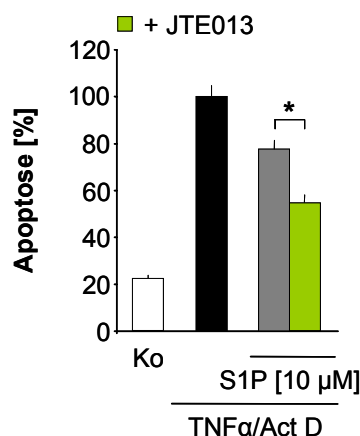


Abb. 41: Beeinflussung des antiapoptotischen Effektes durch den S1P₂ Rezeptor. Keratinozyten wurden vor der Stimulation mit S1P mit 10 µM JTE013 für 10 min vorbehandelt. Vor der Induktion der Apoptose erfolgte die Stimulation mit S1P für 1 h. Die Apoptoserate wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert einer Doppelbestimmung \pm SD. Die Ergebnisse konnten jeweils in zwei weiteren Experimenten bestätigt werden. * $p \leq 0,05$ versus S1P und TNFα/Act.

3.2.6 Antiapoptotische Eigenschaften von FTY720-P

Abschließend wurde das antiapoptotische Potential des S1P Rezeptoragonisten FTY720-P untersucht, dem bisher sowohl proapoptotische als auch antiapoptotische Wirkungen zugeschrieben wurden (Ho et al. 2005). So sollte an dieser Stelle das Verhalten in humanen Keratinozyten erstmalig untersucht werden. Wie zu erwarten war, senkte der Rezeptoragonist die Apoptoserate eindeutig. Der antiapoptotische Effekt setzte in einer Konzentration von 0,5 μM FTY720-P deutlich ein, wobei 1 μM FTY720-P einen noch stärkeren Effekt hervorrief, der zu einer Reduktion der Apoptoserate um 50 % führte (Abb. 42A). Als Mechanismus des antiapoptotischen Effektes von S1P und $1\alpha,25\text{-Dihydroxyvitamin D}_3$ ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) wurde eine Modulation des Bcl-2 Proteins beschrieben (Manggau et al. 2001). Um die erstmalig in humanen Keratinozyten gezeigte antiapoptotische Wirkung von FTY720-P näher zu charakterisieren, wurde der Einfluss des S1P Rezeptoragonisten auf die Bcl-2 Expression untersucht. Die Stimulation der Zellen mit FTY720-P führte zu einer mit der Wirkung von S1P vergleichbaren Induktion des Bcl-2 Proteins, wobei der Effekt des FTY720-P in der höchsten eingesetzten Konzentration von 1 μM einen leicht stärkeren Effekt hervorrief als S1P (Abb. 42B).

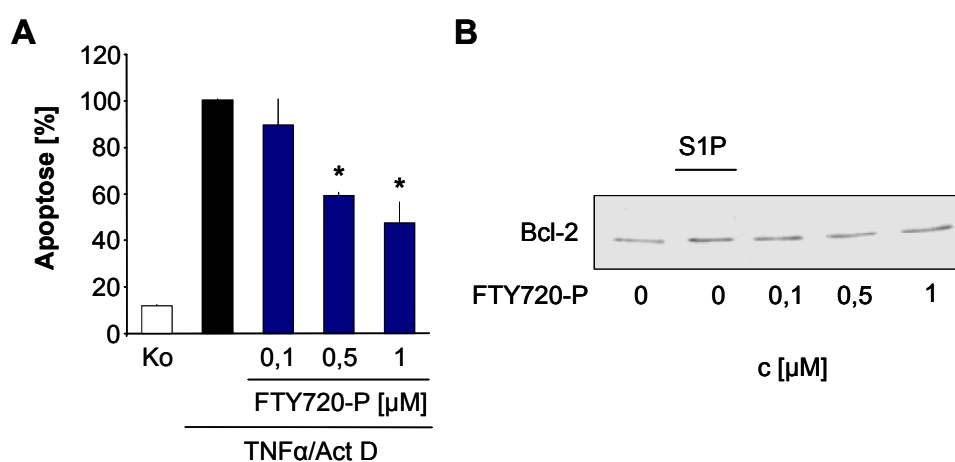


Abb. 42: Antiapoptotischer Effekt des FTY720-P. Keratinozyten wurden vor der Induktion der Apoptose mit FTY720-P für 1 h vorbehandelt. Die Apoptoserate wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert einer Doppelbestimmung \pm SD. * $p \leq 0,05$ (A). Nach der Inkubation der Zellen mit FTY720-P oder 10 μM S1P für 48 h wurden die Zelllysate der Bestimmung der Bcl-2 Expression mittels Western Blot-Analytik unterworfen (B). Die Experimente wurden unabhängig zwei weitere Male wiederholt und erzielten gleiche Ergebnisse.

3.2.7 NO-Abhängigkeit der antiapoptotischen Wirkung

Die vorliegenden Ergebnisse veranschaulichen deutlich das antiapoptische Potential des S1P in primären Keratinozyten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte bisher die Vermittlung der zytoprotektiven Signalwege über den S1P₃ Rezeptor gezeigt werden. Neben der Rolle der Akt Kinase in der Regulation der Apoptose sollte im Folgenden der der Zytoprotektion zugrunde liegende Signalweg weiter charakterisiert werden. In der Regulation der zellulären Apoptose kommt NO eine entscheidende Rolle zu. Doch wurden sowohl pro- als auch antiapoptotische Effekte für NO beschrieben (Chung et al. 2001). In der Haut ist der Botenstoff NO für die Regulation von sowohl physiologischen als auch pathophysiologischen Prozessen von großer Bedeutung (Cals-Grierson et al. 2004). So zeigten Experimente in murinen Keratinozyten eindeutig eine entscheidende Rolle von NO für den Schutz der Zellen vor UV-induzierter Apoptose (Weller et al. 2003). Diese Ergebnisse waren der Ausgangspunkt für die Frage, ob S1P seine antiapoptotische Wirkung über einen NO-abhängigen Signalweg entfaltet.

Zu diesem Zweck wurde die S1P-vermittelte Zytoprotektion in Anwesenheit eines Hemmstoffs der NO-Synthasen und die antiapoptotische Wirkung eines NO-Donators in humanen Keratinozyten untersucht. Zunächst kam L-NAME, ein Arginin-Analogon, zum Einsatz, das vorwiegend die konstitutiv exprimierten NO-Synthasen hemmt, jedoch nicht stark zwischen den verschiedenen Synthasen diskriminiert. So führte die Hemmung der endogenen NO-Bildung zu einer vollständigen Umkehr des antiapoptotischen Effektes des S1P. In Gegenwart von L-NAME vermochte S1P keinerlei Zytoprotektion zu entfalten (Abb. 43A). Darüber hinaus konnte die Bedeutung des NO für den Schutz der Keratinozyten vor Apoptose durch den Einsatz eines NO-Donators gezeigt werden. Tatsächlich zeigte das S-Nitrosothiol SNAP ausgeprägte antiapoptotische Wirksamkeit in humanen Keratinozyten und führte zu einer Reduktion der Apoptoserate um über 40 % (Abb. 43B).

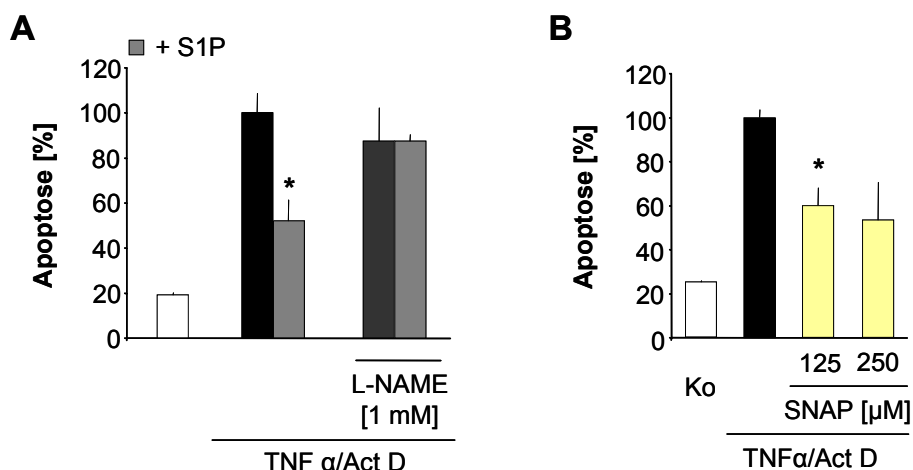


Abb. 43: Rolle von NO in antiapoptotischen Signalwegen. Keratinozyten wurden mit L-NAME für 1 h vorbehandelt und anschließend mit 10 μM S1P stimuliert (A) oder mit SNAP behandelt (B). Nach 1 h folgte die Induktion der Apoptose und nach 16 h die Bestimmung der Apoptoserate. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert einer Doppelbestimmung ± SD. Die Experimente wurden jeweils zweimal wiederholt und lieferten gleiche Ergebnisse. * $p \leq 0,05$.

3.2.8 NO-Abhängigkeit der Bcl-2 Induktion

Da der antiapoptotische Effekt des S1P in Keratinozyten über eine Induktion des mitochondrialen Bcl-2 Proteins erklärt wird, sollte untersucht werden, ob dieser Signalweg ebenso NO-abhängig ist. Daher wurde eine Western Blot-Analyse des Bcl-2 Proteins nach Stimulation der Zellen mit S1P in Gegenwart des NO-Synthase Hemmstoffs L-NAME durchgeführt. Tatsächlich kam es im Falle der Hemmung der NO-Bildung zu einer verminderten Bcl-2 Expression nach Stimulation mit S1P (Abb. 44).

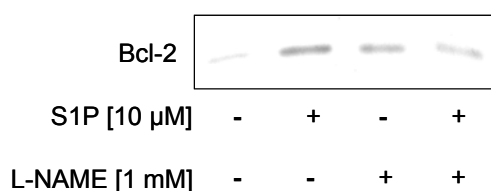


Abb. 44: Rolle von NO in antiapoptotischen Signalwegen. Vor der Stimulation der Keratinozyten mit S1P für 48 h erfolgte eine Vorinkubation mit L-NAME für 1 h. Das Ergebnis der Western Blot-Analyse konnte in zwei weiteren Experimenten reproduziert werden.

3.2.9 Expression der NO-Synthasen in humanen Keratinozyten

Da vorangegangene Arbeiten ein sehr konträres Bild des Expressionsstatus der NO-Synthasen in der Haut zeigen, war es nun von großem Interesse, zu zeigen, welche NO bildenden Enzyme in primären humanen Keratinozyten exprimiert werden (Weller 2003). Daher wurde eine PCR Analyse mit spezifischen Primern gegen die NO-Synthasen eNOS, iNOS und nNOS durchgeführt. Zur Kontrolle wurde die cDNA mit der Primersequenz für GAPDH amplifiziert. Als Negativkontrolle (-) diente jeweils ein Ansatz, dem keine reverse Transkriptase beigelegt wurde, so dass eine Verunreinigung während des Aufreinigungsprozesses ausgeschlossen werden konnte. Die elektrophoretische Auftrennung der Amplifizierungsprodukte ist in Abb. 45 dargestellt. Dabei zeigte sich, dass die konstitutiven NO-Synthasen eNOS und nNOS in primären humanen Keratinozyten exprimiert werden (Abb. 45A und C). Als Positivkontrolle für die Expression der eNOS diente die mRNA humaner mikrovaskulärer Hirnendothelzellen (HBMEC), in der mRNA Transkripte der eNOS in starkem Ausmaß nachgewiesen werden konnte. Interessanterweise war die iNOS in unbehandelten Keratinozyten kaum detektierbar. Sie ließ sich jedoch durch UV-Strahlung von 80 mJ/cm^2 und Stimulation mit $20 \text{ ng/ml TNF}\alpha$ nach 24 h induzieren (Abb. 45B).

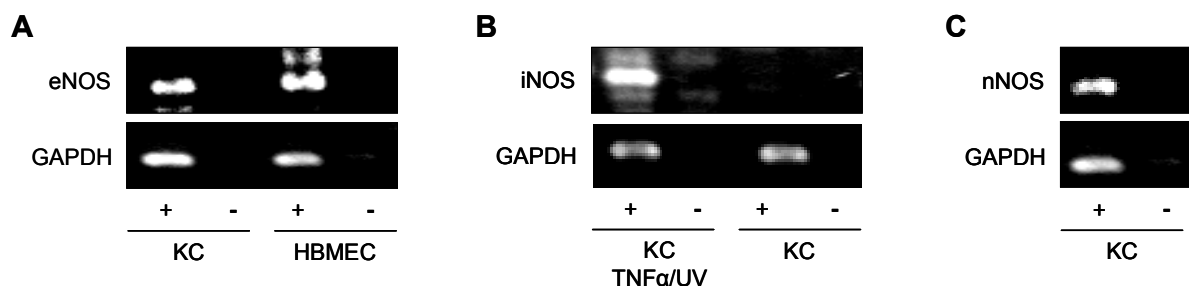


Abb. 45: Expression der NO-Synthasen. Isolierte mRNA wurde auf vorhandene Transkripte des eNOS (A), iNOS (B) oder nNOS Gens (C) geprüft. Die Ergebnisse konnten in zwei weiteren unabhängigen Experimenten bestätigt werden.

3.2.10 Aktivierung der eNOS

Die Rolle des NO in der Regulation der Apoptose ist recht komplex. So zeigt NO einerseits zytoprotektive und antiinflammatorische Effekte, doch andererseits wird NO eine zytotoxische und proapoptotische Wirkung zugeschrieben (Dimmeler et al. 1997). Doch ist eindeutig, dass die zelluläre NO-Konzentration von entscheidender Bedeutung für die Regulation der Apoptose ist. So wird der eNOS im Gegensatz zur

iNOS, die große Mengen an NO zu bilden vermag, ein zytoprotektiver Effekt zugeschrieben (Albrecht et al. 2003). Um zu untersuchen, ob der NO-abhängige antiapoptotische Effekt des S1P durch eine Aktivierung der eNOS hervorgerufen wird, wurde eine Western Blot-Analyse zur Detektion einer Phosphorylierung der eNOS durchgeführt. Die Aktivierung der eNOS wird durch Phosphorylierung an Ser¹¹⁷⁷ reguliert. Es wurde eine deutliche Aktivierung der eNOS durch S1P mit einem Maximaleffekt nach bereits 5 min in Keratinozyten gemessen. Die Phosphorylierung sank aber nach 15 min wieder ab und erreichte nach 1 h wieder das Kontrollniveau (Abb. 46A). Darüber hinaus konnte eine Konzentrationsabhängigkeit bei der Aktivierung der eNOS durch S1P gezeigt werden. So setzte die Phosphorylierung der eNOS erst ab einer Konzentration von 2,5 µM S1P ein und erreichte bei der Stimulation mit 10 µM S1P den Maximaleffekt (Abb. 46B).

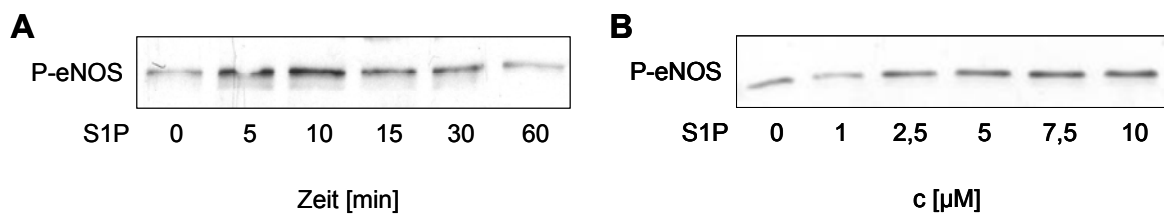


Abb. 46: Aktivierung der eNOS durch S1P. Keratinozyten wurden mit S1P für die angegebenen Zeiten (A) oder in den genannten Konzentrationen für 10 min (B) stimuliert. Die Ergebnisse der Western Blot-Analyse konnten jeweils in zwei weiteren Experimenten reproduziert werden.

3.2.11 Einfluss von S1P auf NO-Bildung

Daran schloss sich nun die Frage an, ob die durch S1P hervorgerufene Aktivierung der eNOS tatsächlich zu einer verstärkten NO-Bildung führt. Daher sollte nun die zelluläre Produktion von NO nach Stimulation der Keratinozyten mit S1P gemessen werden. Zu diesem Zweck wurde der Griess-Assay durchgeführt, der es ermöglicht den Nitritgehalt im Kulturüberstand zu bestimmen. Das zellulär gebildete NO diffundiert rasch aus den Zellen heraus und oxidiert sehr schnell in seine Abbauprodukte, die durch die dem Assay zugrunde liegende Farbreaktion bestimmt werden können. Tatsächlich konnte eine durch Stimulation der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an S1P induzierte NO-Bildung gemessen werden. Ab einer Konzentration von 2,5 µM S1P setzte eine signifikante Erhöhung des NO-Spiegels ein und erreichte bei einer Stimulation der Zellen mit 10 µM S1P den Maximaleffekt (Abb. 47).

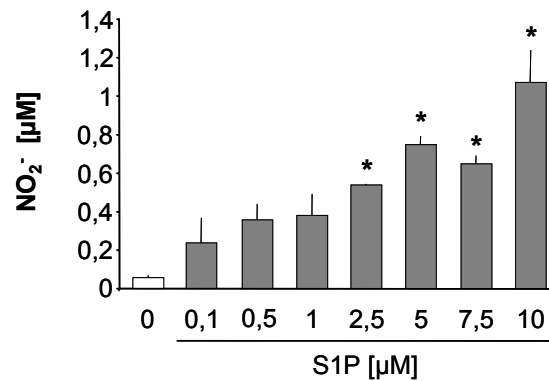


Abb. 47: Einfluss von S1P auf die NO-Bildung. Keratinozyten wurden mit S1P stimuliert und nach 24 h im Kulturüberstand der Nitritgehalt bestimmt. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert einer Vierfachbestimmung \pm SD. Der Griess-Assay wurde zwei weitere Male wiederholt und lieferte vergleichbare Ergebnisse. * $p \leq 0,05$.

Um die gefundene Induktion der NO-Bildung durch S1P zu bestätigen, kam eine Methode zur direkten Detektion des synthetisierten NO zum Einsatz. Durch den Fluoreszenzfarbstoff DAF-2DA ließ sich gebildetes NO intrazellulär nachzuweisen. Dies ermöglicht die fluoreszenzmikroskopische Darstellung eines stark fluoreszierenden Triazolofluoreszeins, das nur in Gegenwart von NO entsteht. Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der Keratinozyten mit 10 μ M S1P nach 24 h eine starke Fluoreszenz hervorrief, wohingegen in unbehandelten Kontrollzellen kaum Fluoreszenz messbar war (Abb. 48).

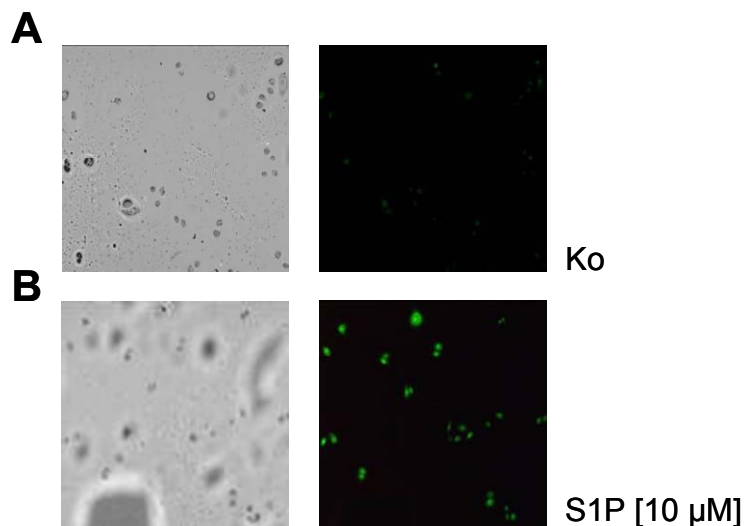


Abb. 48: Einfluss von S1P auf die NO-Bildung. Keratinozyten wurden mit Kontrollvehikel (A) oder S1P (B) behandelt. Nach Färbung mit DAF-2DA erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Detektion des NO. Links ist die lichtmikroskopische Aufnahme des gleichen Bildausschnitts wie rechts in fluoreszenzmikroskopischer Aufnahme dargestellt. Die Aufnahmen konnten in einem weiteren unabhängigen Experiment bestätigt werden.

3.2.12 Hemmung der NO-Bildung

Die Aussagekraft des Experiments zur NO-Abhängigkeit des antiapoptotischen Effektes des S1P, gezeigt durch den Einsatz des NO-Synthase Hemmstoffs L-NAME, sollte im nächsten Schritt bekräftigt werden. Um die Effektivität der Hemmung der NO-Synthasen zu bestätigen, wurde die durch S1P induzierte NO-Bildung in Gegenwart von L-NAME untersucht. Der Griess-Assay zeigte, dass durch eine Hemmung der NO-Synthasen S1P keineswegs eine gesteigerte NO-Bildung zu evozieren vermochte (Abb. 49).

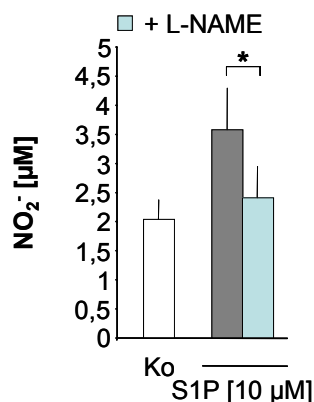


Abb. 49: Hemmung der NO-Bildung. Keratinozyten wurden vor der Stimulation mit S1P für 24 h mit 1 mM L-NAME für 1 h vorbehandelt. Die Werte des Griess-Assay repräsentieren Mittelwerte von Vierfachbestimmungen \pm SD. Das Ergebnis konnte in zwei unabhängigen Experimenten reproduziert werden. * $p \leq 0,05$.

3.2.13 Einfluss von PTX auf die eNOS Aktivierung und NO-Bildung

Während für den antiapoptotischen Effekt des S1P bereits eindeutig eine Beteiligung der S1P Rezeptoren gezeigt werden konnte und mit dem S1P₃ Rezeptor der für die Zytoprotektion verantwortliche Rezeptorsubtyp identifiziert werden konnte, sollte der Weg, über den S1P die Aktivierung der eNOS vermittelt, näher charakterisiert werden. Aus diesem Grund wurde durch den Einsatz von PTX die Beteiligung von G_i-gekoppelten Rezeptoren untersucht. Nach der Vorinkubation mit PTX wurden die Keratinozyten mit der effektivsten eNOS-phosphorylierenden Konzentration behandelt. Die Western Blot-Analyse zeigte, dass S1P eine Aktivierung der eNOS über PTX-sensitive Rezeptoren vermittelt. So wurde die S1P-induzierte eNOS Phosphorylierung durch PTX vollständig aufgehoben (Abb. 50A). Darüber hinaus konnte ebenso die durch S1P hervorgerufene Bildung von NO in Keratinozyten durch PTX gehemmt werden (Abb. 50B).

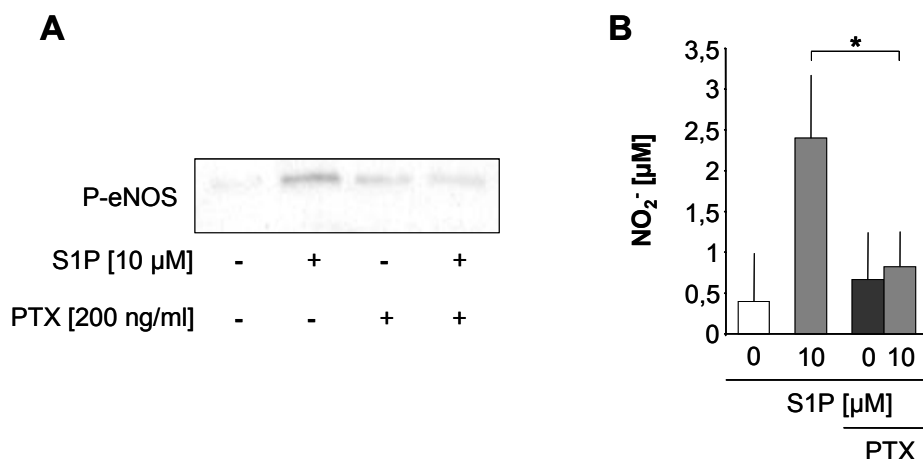


Abb. 50: Einfluss von PTX auf die Aktivierung der eNOS. Keratinozyten wurden vor der Stimulation mit S1P mit PTX für 3 h vorbehandelt. Entweder erfolgte nach 10 min die Lyse der Zellen und anschließende Western Blot-Analyse (A) oder nach 24 h die Bestimmung des Nitritgehaltes. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert einer Vierfachbestimmung \pm SD. Jeweils zwei unabhängige Experimente bestätigten die Ergebnisse. * $p \leq 0,05$.

3.2.14 Rolle des S1P₃ Rezeptors in der eNOS Aktivierung

Da eine Beteiligung der GPCR an der Aktivierung der eNOS gezeigt werden konnte, wurde die Aktivierung der eNOS in Keratinozyten untersucht, in denen die Expression des S1P₃ Rezeptorsubtyps durch die Antisense-Strategie gehemmt war, denn dieser Rezeptorsubtyp ist für die Vermittlung der antiapoptotischen Wirkung des S1P verantwortlich. Wie zu erwarten war, kam es in mit S1P₃ Antisense ODN transfizierten Zellen zu einer verminderten Aktivierung der eNOS durch S1P (Abb. 51).

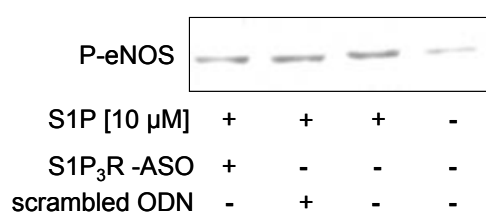


Abb. 51: Einfluss von S1P₃ Rezeptor Antisense ODN auf die Aktivierung der eNOS. Keratinozyten wurden mit Antisense oder scrambled ODN transfiziert. Nach einer Stimulation mit S1P für 10 min erfolgte die Zellyse. Die Ergebnisse der Western Blot-Analyse wurden in zwei weiteren unabhängigen Experimenten bestätigt.

3.2.15 Einfluss der PI3K auf die eNOS Aktivierung und NO-Bildung

Von großem Interesse war es nun den zugrunde liegenden Signalweg der eNOS Aktivierung zu untersuchen. Die Akt Kinase stellt den dominierenden Regulator der Phosphorylierung an Ser¹¹⁷⁷ dar. Daher sollte nun der Einfluss der Hemmung des PI3K/Akt Signalweges auf die Aktivierung der eNOS untersucht werden. Die Western

Blot-Analyse der eNOS Phosphorylierung zeigte, dass die beiden unabhängigen PI3K Hemmstoffe Wortmannin und LY294002 eine starke Hemmung der Enzymaktivität der eNOS hervorriefen. In Zellen, die mit Wortmannin vorbehandelt wurden, konnte keinerlei eNOS Phosphorylierung gemessen werden, unabhängig davon, ob die Zellen mit Kontrollvehikel oder S1P stimuliert wurden. Die Behandlung der Zellen mit LY294002 führte ebenso zu einer extremen Reduktion der eNOS Aktivierung. In Gegenwart von LY294002 war jedoch eine schwache Phosphorylierung der eNOS durch S1P messbar (Abb. 52A). Wie zu erwarten war, führte die Stimulation mit S1P in Gegenwart des PI3K Hemmstoffs Wortmannin zu keiner gesteigerten NO-Synthese (Abb. 52B).

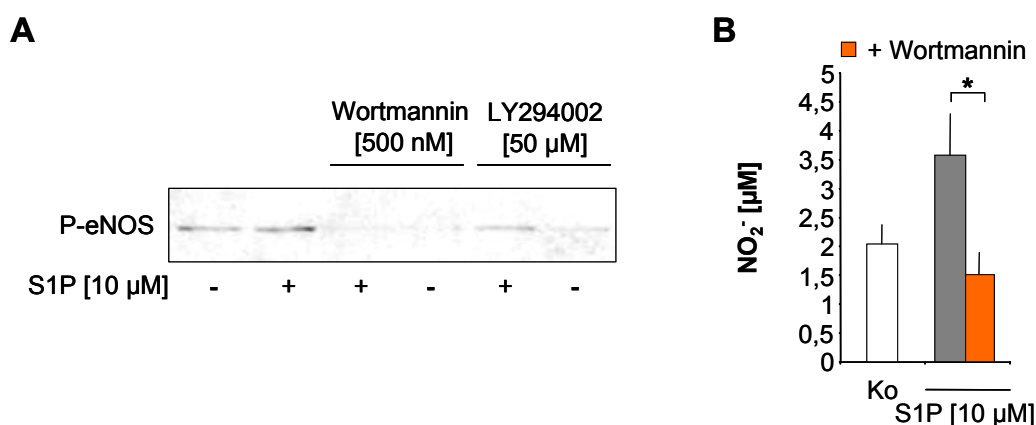


Abb. 52: Einfluss der Hemmung der PI3K auf die eNOS Aktivierung. Keratinozyten wurden mit Wortmannin oder LY294002 für 1 h vorbehandelt und mit S1P stimuliert. Nach 10 min erfolgte die Zellyse (A) oder nach 24 h die Bestimmung des Nitritgehalts (B). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte von Vierfachbestimmungen \pm SD. Die Ergebnisse konnten jeweils in zwei weiteren Experimenten reproduziert werden. * $p \leq 0,05$.

3.2.16 Induktion der eNOS mRNA

Abschließend sollte geklärt werden, ob neben der Aktivierung der eNOS durch S1P auch eine gesteigerte Expression des Proteins oder schon auf Ebene der Transkription eine gesteigerte Expression der eNOS mRNA durch S1P hervorgerufen wird. Zu diesem Zweck wurden mRNA Transkripte der NO-Synthasen und des GAPDH in Keratinozyten, die mit 10 μ M S1P für verschiedene Zeiträume inkubiert wurden, durch PCR Analyse nachgewiesen. Die Analyse dieser mRNA Transkripte zeigte, dass die Quantität der mittels spezifischer Primer gegen die eNOS erhaltenen DNA-Stränge durch Stimulation mit S1P erhöht wurde. Bereits die Stimulation der Zellen mit S1P für 1 h führte zu einer starken Induktion der eNOS mRNA. Die gesteigerte Transkription des eNOS Gens blieb auch nach einer Inkubationszeit von 12 h mit S1P noch bestehen, fiel nach 24 h jedoch wieder ab. Darüber hinaus zeigte

sich, dass die Stimulation mit S1P keine Regulation der nNOS auf transkriptionaler Ebene hervorrief. Ebenso ergab die Analyse der mRNA Transkripte, dass S1P die iNOS mRNA nicht zu induzieren vermochte und so verblieb die Expression der iNOS mRNA auf einem kaum detektierbaren Niveau. Dabei ließ sich sogar eine leichte Hemmung der Transkription der iNOS durch S1P nachweisen (Abb. 53A). Überraschenderweise zeigte sich, dass die Bildung des eNOS Proteins nicht durch S1P induziert wurde. Der dargestellte Western Blot veranschaulicht außerdem sehr gut die vergleichsweise geringe Expression der eNOS in Keratinozyten im Gegensatz zu der Expression in Endothelzellen (Abb. 53B).

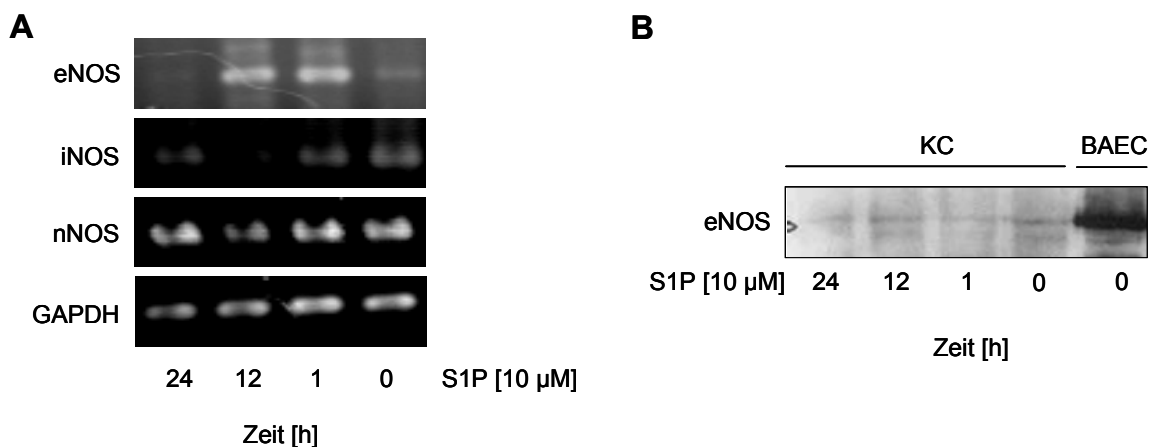


Abb. 53: Regulation der eNOS auf transkriptionaler oder translationaler Ebene durch S1P. Keratinozyten wurden mit S1P inkubiert. Die Detektion der eNOS, iNOS, nNOS und GAPDH mRNA Expression erfolgte mittels PCR Analyse (A) und des eNOS Proteins durch Western Blot-Analyse (B). Die Experimente wurden zwei weitere Male wiederholt und zeigten gleiche Ergebnisse.

3.2.17 Hemmung der Induktion der iNOS

Neben der Bedeutung der eNOS für antiapoptotische Signalwege war es von Interesse, die Rolle des NO in der Induktion der Apoptose zu untersuchen. Die Janusköpfigkeit der Wirkung des NO in der zellulären Apoptose ist eindeutig durch die Mengen an NO, die auf eine Zelle wirken, zu erklären und damit durch die Aktivierung der jeweiligen NO-Synthasen (Chung et al. 2001). Da der iNOS, bedingt durch ihr Vermögen zytotoxische Mengen an NO zu bilden, eine proapoptische Wirkung zugeschrieben wird, sollte untersucht werden, ob das Auslösen der Apoptose durch Stimulation mit TNF α und Actinomycin D mit einer Induktion der iNOS Expression einhergeht. Die alleinige Stimulation der Keratinozyten mit TNF α führte jedoch zu keiner Induktion des Proteins. Nach einer gemeinsamen Gabe von TNF α und Actinomycin D kam es zu einer deutlichen Verstärkung der iNOS

Expression. Auch die Stimulation mit Actinomycin D allein rief eine Induktion der iNOS hervor (Abb. 54A). Nun stellte sich die Frage, ob S1P neben der Aktivierung der eNOS seine antiapoptotische Wirkung darüber hinaus noch über eine Hemmung der induzierten iNOS vermittelt. Tatsächlich führte die Vorinkubation mit S1P vor der Stimulation mit TNF α und Actinomycin D zu einer deutlichen Reduktion der Induktion der iNOS (Abb. 54B). Nun sollte untersucht werden, ob die Expression des Proteins schon durch Hemmung auf transkriptionaler Ebene reduziert wurde. Die Analyse der mRNA Transkripte der mit TNF α und Actinomycin D stimulierten Zellen mittels PCR zeigte die erwartete Induktion der iNOS mRNA. Darüber hinaus konnte eine Hemmung der Transkription der iNOS durch Vorbehandlung der Zellen mit S1P vor der Stimulation mit TNF α und Actinomycin D detektiert werden (Abb. 54C).

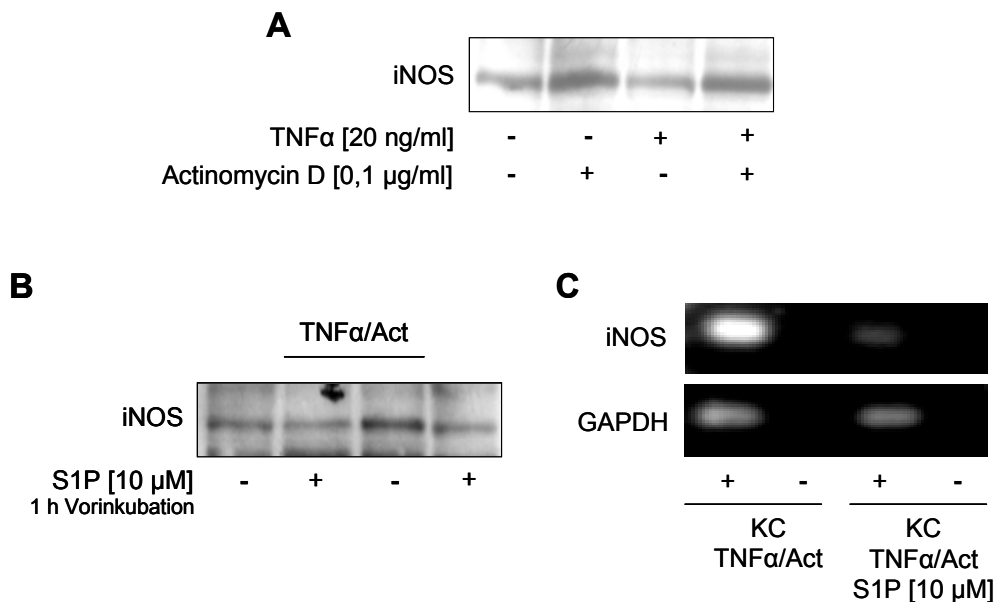


Abb. 54: Hemmung der iNOS Induktion. Die Expression der iNOS wurde durch Western Blot-Analyse nach Stimulation mit TNF α und/oder Actinomycin D nach 16 h gemessen (A). Nach der Vorinkubation mit S1P und anschließender Stimulation mit TNF α und Actinomycin D wurde die Expression des Proteins (B) oder der mRNA (C) untersucht. Die Experimente wurden jeweils zwei weitere Male wiederholt und zeigten vergleichbare Ergebnisse.

3.2.18 Einfluss von PTX auf die Hemmung der iNOS Induktion

Um eine Beteiligung von S1P Rezeptoren an der Hemmung der durch TNF α und Actinomycin D induzierten iNOS zu untersuchen, wurden die Zellen vor der Stimulation mit S1P mit PTX vorbehandelt. So konnte durch Western Blot-Analyse der iNOS Expression eine vollständige Aufhebung des S1P Effektes durch PTX detektiert werden. Zellen, die vor der Stimulation mit S1P mit PTX vorinkubiert wurden, zeigten eine ebenso starke iNOS Induktion wie Zellen, die ausschließlich mit TNF α und Actinomycin D behandelt wurden (Abb. 55).

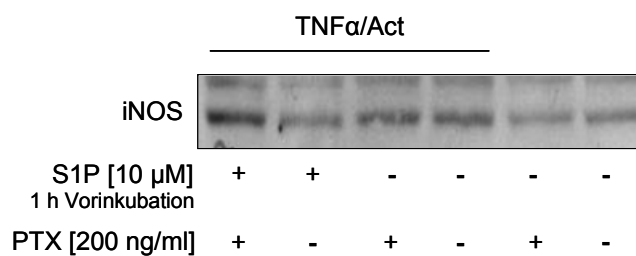


Abb. 55: Einfluss von PTX auf die Hemmung der iNOS Induktion. Keratinozyten wurden mit PTX für 3 h vorbehandelt, mit S1P stimuliert und die iNOS durch 20 ng/ml TNF α und 0,1 μ g/ml Actinomycin D induziert. Das Ergebnis der Western Blot-Analyse konnte in zwei weiteren Experimenten reproduziert werden.

3.3 Charakterisierung antiapoptotischer Signalwege des LPA in Endothelzellen

3.3.1 Antiapoptotische Eigenschaften von LPA in Endothelzellen

Das von Thrombozyten freigesetzte Lysophospholipid LPA zeigt neben der Regulation vielfältigster zellulärer Prozesse wie Proliferation und Migration auch antiapoptotische Wirkungen auf verschiedene Zellarten (Moolenaar et al. 2004). Da LPA eine positive Beeinflussung der endothelialen Wundheilung und der Angiogenese zugeschrieben wird, war es von Interesse, den für die Wundheilung wichtigen Prozess der Zytoprotektion auf eine mögliche Regulation durch LPA zu prüfen.

Zu diesem Zweck wurde die Apoptose in der Endothelzelllinie BAEC durchflusszytometrisch untersucht. Die Induktion der Apoptose erfolgte durch Stimulation der Zellen mit TNF α und Actinomycin D. Diese konnte bereits durch die Vorinkubation mit 5 μ M LPA vermindert werden, wobei 10 μ M LPA zu einer signifikanten Reduktion der Apoptoserate um fast 50 % führte (Abb. 56).

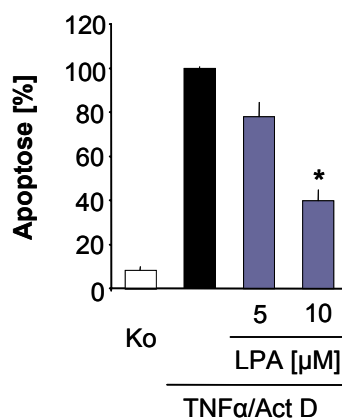


Abb. 56: Antiapoptotischer Effekt des LPA. BAEC wurden vor der Induktion der Apoptose mit LPA für 15 min vorbehandelt. Die Apoptoserate wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert einer Doppelbestimmung \pm SD. Das Experiment wurde zweimal wiederholt und lieferte vergleichbare Ergebnisse. * $p \leq 0,05$.

3.3.2 Akt Aktivierung vermittelt antiapoptotische Wirkung

Um den zugrunde liegenden Signalweg der durch LPA vermittelten antiapoptotischen Wirkung auf Endothelzellen zu charakterisieren, wurde zunächst eine Beteiligung der Akt Kinase untersucht. Daher wurde eine Western Blot-Analyse zur Detektion der Aktivierung der Akt Kinase durch Phosphorylierung an Ser⁴⁷³ durchgeführt. So konnte gezeigt werden, dass LPA eine starke Aktivierung der Akt Kinase hervorrief.

Die Stimulation der Endothelzellen mit 10 μM LPA führte bereits nach 5 min zu einer starken Akt Phosphorylierung, die über 15 min bestehen blieb und nach 60 min wieder das Kontrollniveau erreichte (Abb. 57A). Darüber hinaus konnte eine Konzentrationsabhängigkeit in der durch LPA hervorgerufenen Akt Phosphorylierung gezeigt werden. Die Stimulation der Endothelzellen mit 10 μM LPA für 15 min führte zur stärksten Aktivierung der Akt Kinase, welche schon bei einer Konzentration von 7,5 μM LPA wieder abnahm. Doch bei der kleinsten eingesetzten LPA Konzentration von 0,1 μM war noch eine Akt Phosphorylierung messbar (Abb. 57B). Nun sollte die Abhängigkeit des antiapoptotischen Effektes des LPA von der Akt Kinase untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die protektive Wirkung des LPA auf Endothelzellen in Gegenwart des PI3K Hemmstoffs LY294002 gemessen. Die durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate ergab, dass LPA im Falle der Hemmung des PI3K/Akt Signalweges keinerlei antiapoptotische Wirkung zeigte (Abb. 57C).

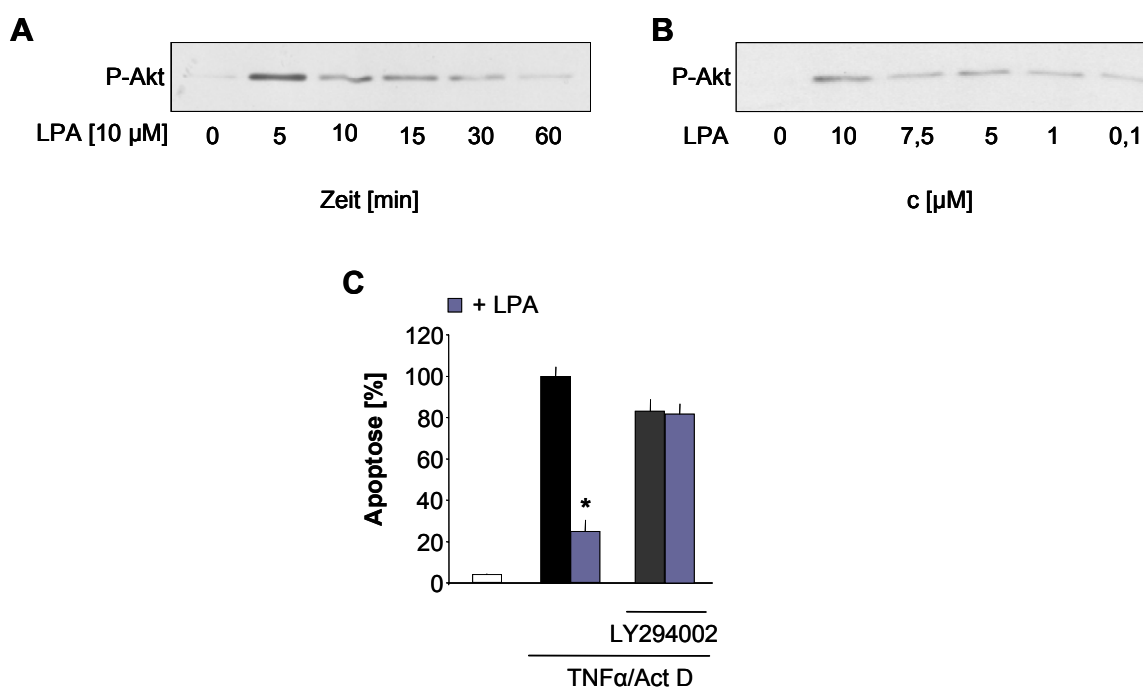


Abb. 57: Einfluss der Akt Aktivierung auf antiapoptotische Signalwege. BAEC wurden mit LPA stimuliert und die Zelllysate wurden einer Western Blot-Analyse unterworfen (A,B). BAEC wurden mit 50 μM LY294002 für 1 h vorbehandelt, mit 10 μM LPA für 15 min stimuliert und die Apoptose ausgelöst. Die Apoptoserate wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert einer Doppelbestimmung \pm SD mit $*p \leq 0,05$ (C). Die Ergebnisse konnten jeweils in zwei weiteren unabhängigen Experimenten bestätigt werden.

3.3.3 Beteiligung der LPA Rezeptoren

LPA vermittelt seine zellulären Effekte über die Aktivierung von G-Proteingekoppelten LPA Rezeptoren. So vermag LPA als Agonist an seinen fünf LPA Rezeptoren LPA₁₋₅ diese spezifisch zu aktivieren. Daher sollte die Beteiligung der LPA Rezeptoren an der Aktivierung der Akt Kinase untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die Detektion der durch LPA induzierten Akt Phosphorylierung in Gegenwart von PTX durchgeführt. Die Western Blot-Analyse zeigte, dass die Hemmung der Signaltransduktion über G_i-gekoppelte Rezeptoren zu einer nahezu vollständigen Verminderung der Akt Aktivierung führte (Abb. 58A). Darüber hinaus sollte auch der antiapoptotische Effekt des LPA in Gegenwart von PTX untersucht werden. Analog zu den Ergebnissen der Hemmung der Akt Phosphorylierung, hemmte die Vorbehandlung der Zellen mit PTX die antiapoptotischen Wirkung des LPA (Abb. 58B).

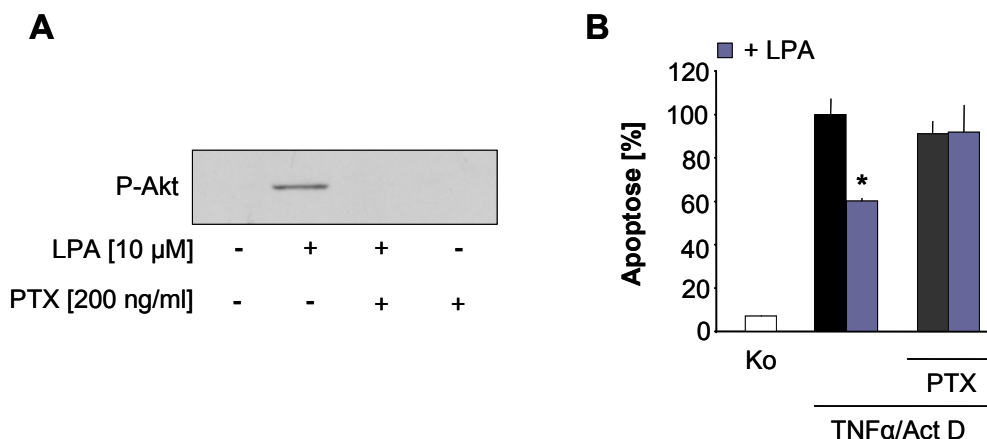


Abb. 58: Hemmbarkeit der Akt Aktivierung und des antiapoptotischen Effektes durch PTX. BAEC wurden mit PTX für 3 h vorbehandelt, mit LPA für 15 min stimuliert und entweder die Phosphorylierung durch Western Blot-Analyse detektiert (A) oder nach der Induktion der Apoptose die Apoptoserate durch Durchflusszytometrie bestimmt (B). Die Werte repräsentieren Mittelwerte von Doppelbestimmungen \pm SD. Die Experimente wurden jeweils zweimal wiederholt und zeigten vergleichbare Ergebnisse. * $p \leq 0,05$.