

5 Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung

Für die Aufrechterhaltung der epidermalen Homöostase ist das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose von entscheidender Bedeutung. Eine Beeinflussung dieser Prozesse in Keratinozyten ist von besonderem Interesse, da hyperproliferative Erkrankungen der Haut wie Psoriasis vulgaris durch eine Deregulation dieses Gleichgewichtes gekennzeichnet sind.

Das Lysosphingolipid Sphingosin-1-phosphat (S1P) wurde lange Zeit als bloße Strukturkomponente der Lipiddoppelmembran unterschätzt. Jedoch wurde S1P in den letzten Jahrzehnten als wichtiger Lipidmediator identifiziert, der ähnliche Wirkungen wie Wachstumsfaktoren aufweist. So vermittelt S1P vielfältige zelluläre Effekte wie Angiogenese, Zellmotilität, Ca^{2+} -Freisetzung, Zytoprotektion und Umstrukturierung des Zytoskeletts. Auf diese Weise werden auch zelluläre Prozesse in der Haut durch S1P reguliert und die epidermale Wundheilung gefördert. Eine antiproliferative und antiapoptotische Wirkung des S1P konnte in humanen Keratinozyten gezeigt werden, doch sind die zugrunde liegenden Signalwege bisher nicht charakterisiert worden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals eine Beeinflussung der Insulin-vermittelten Signalwege durch S1P gezeigt werden, welche bei hyperproliferativen Erkrankungen der Haut pathologisch überaktiviert sind. Das Wachstum der Zellen wird entscheidend durch die Serin-Threonin-Kinase Akt bestimmt. In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass die proliferationshemmende Wirkung des S1P über eine Hemmung der Akt Kinase vermittelt wird. So induzierte S1P eine Dephosphorylierung der Akt Kinase, die mit einer Hemmung der Kinaseaktivität einhergeht. Doch S1P verminderte nicht nur die basale Aktivität, sondern rief darüber hinaus eine Hemmung der durch Insulin induzierten Akt Kinase hervor. Auf diese Weise vermittelte S1P eine Reduktion der starken mitogenen Wirkung des Insulins. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Insulin-induzierten Akt Phosphorylierung durch eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) vermittelt wird. Der PKC Aktivator TPA führte zu einer mit S1P vergleichbaren Wirkung auf die Akt Phosphorylierung und die Proliferation. Es konnte die PKC δ als die PKC Isoform identifiziert werden, die für die Dephosphorylierung der Akt Kinase und die Hemmung der Proliferation verantwortlich ist.

S1P vermittelt seine Wirkungen entweder intrazellulär oder über seine membranständigen G-Protein gekoppelten Rezeptoren S1P₁₋₅. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Beteiligung der S1P Rezeptoren an der Hemmung der Akt Kinase gezeigt und der S1P₂ Rezeptor als der verantwortliche Rezeptorsubtyp identifiziert werden. Darüber hinaus konnte die Beteiligung des S1P₂ Rezeptors an der Vermittlung der Hemmung der mitogenen Insulinwirkung auf allen Ebenen der Signaltransduktion nachgewiesen werden. So führte die Aktivierung des S1P₂ Rezeptors zur Aktivierung der PKC δ , nachfolgend zur Dephosphorylierung der Akt Kinase und schließlich zur Hemmung der Proliferation. Daraus resultierte eine Abgrenzung der zellulären Effekte des S1P vom S1P Rezeptoragonisten FTY720, der keine agonistische Wirkung am S1P₂ Rezeptorsubtyp besitzt. Die phosphorylierte Wirkform des FTY720 rief keine Beeinflussung der Akt Phosphorylierung und der Proliferation hervor.

Eine derartige Interaktion von S1P mit Insulin-vermittelten Signalwegen führte neben der beschriebenen Hemmung der mitogenen Wirkung auch zu einer Modulation der antiapoptotischen Wirkung des Insulins. Da die Akt Kinase entscheidend an der Transduktion antiapoptotischer Signale beteiligt ist, hatte die Dephosphorylierung der Insulin-induzierten Akt Kinase eine Reduktion der zytoprotektiven Wirkung des Insulins zur Folge. Es konnte gezeigt werden, dass auch diese Interaktion durch die Aktivierung des S1P₂ Rezeptors vermittelt wird.

S1P selbst schützt Keratinozyten auf einem Akt-unabhängigen Signalweg vor Apoptose. Die Charakterisierung der Signalwege, über welche S1P eine Zytoprotektion der Keratinozyten vermittelt, zeigte eine Beteiligung der S1P Rezeptoren. So konnte der S1P₃ Rezeptor als der Subtyp identifiziert werden, der antiapoptotische Signalwege aktiviert. Darüber hinaus legten die Ergebnisse einen funktionalen Antagonismus zwischen dem S1P₃ und S1P₂ Rezeptor nahe, denn die Hemmung des S1P₂ Rezeptors rief einen noch stärkeren antiapoptotischen Effekt hervor.

In der vorliegenden Arbeit konnte außerdem eine Beteiligung von NO an der Transduktion zytoprotektiver Signalwege nachgewiesen werden. Tatsächlich führte die Hemmung der NO-Synthese zu einer vollständigen Aufhebung der antiapoptotischen Wirkung des S1P. Die NO-Synthasen, welche die zelluläre Bildung des NO katalysieren, wurden in humanen Keratinozyten nachgewiesen. So werden eNOS und nNOS konstitutiv exprimiert; dagegen konnte iNOS durch UV-Strahlung

und Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ induziert werden. Die NO-Abhängigkeit der antiapoptotischen Signalwege des S1P ermöglichte den Nachweis einer gesteigerten NO-Synthese durch S1P. Tatsächlich führte die Stimulation mit S1P zu einer Phosphorylierung der eNOS. Die auf diese Weise gesteigerte Enzymaktivität der eNOS führte zu einer verstärkten Bildung von NO. Die Induktion der NO-Bildung ist ausschließlich auf eine Aktivierung der eNOS zurückzuführen, da eine gesteigerte Proteinexpression nicht gezeigt werden konnte. Darüber hinaus konnte eine Aktivierung der eNOS durch den S1P_3 Rezeptor in Analogie zu der gezeigten Vermittlung der antiapoptotischen Wirkung über diesen Rezeptorsubtypen nachgewiesen werden. Dieser antiapoptotische Signalweg über eine S1P_3 -vermittelte eNOS Aktivierung ist Akt-unabhängig, da S1P die Akt Kinase hemmt.

Neben der Aktivierung der eNOS konnte ein weiterer Signalweg identifiziert werden, über den S1P Keratinozyten vor Apoptose schützt. So konnte gezeigt werden, dass eine starke Induktion der iNOS mit dem Auslösen der Apoptose einhergeht. Diese Induktion der iNOS wurde sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene durch S1P gehemmt. Demnach wird die zytoprotektive Wirkung des S1P durch Eingriff in den NO-Haushalt der Zelle über zwei koexistierende Signalwege vermittelt. So werden durch die Aktivierung der eNOS antiapoptotische Signalwege angestoßen und durch die Hemmung der iNOS die Bildung zytotoxischer NO-Mengen unterdrückt.

Die vorliegende Arbeit zeigt somit erstmals eine Interaktion Insulin-vermittelter Signalwege mit S1P. Darüber hinaus wurden die Signalwege charakterisiert, durch die S1P eine antiproliferative und antiapoptotische Wirkung in humanen Keratinozyten ausübt.

Schließlich wurde die zytoprotektive Wirkung des Lysophospholipids LPA auf Endothelzellen untersucht. Diese Arbeit zeigt erstmals die ausgeprägte antiapoptotische Wirkung des LPA in Endothelzellen. Dieser Effekt wurde durch eine Aktivierung der Akt Kinase vermittelt. Hierbei konnte eine Beteiligung der G-Protein gekoppelter LPA Rezeptoren nachgewiesen werden.

5.2 Abstract

The balance between proliferation and apoptosis plays a crucial role in the maintenance of epidermal homeostasis. As hyperproliferative skin diseases such as psoriasis vulgaris are characterized through dysregulated cell growth and survival, it was of great interest to evaluate the regulation of proliferation and apoptosis in human keratinocytes.

The lysophospholipid sphingosin 1-phosphate (S1P), for long time considered only as a structural component of the membrane bilayer, has been identified as an interesting lipid mediator showing cellular effects comparable to those of growth factors. Hence, S1P influences a variety of biological processes, including angiogenesis, cell motility, release of Ca^{2+} , cell survival and reorganisation of the cytoskeleton. Moreover, this lysophospholipid regulates cellular signaling in the skin. Indeed, S1P promotes epidermal wound healing. Antiproliferative and antiapoptotic effects have been described in human keratinocytes, but the underlying signaling pathways have never been characterized.

The serine threonine kinase Akt has been identified as a major regulator of keratinocyte growth. The present study reveals that the growth inhibitory effect of S1P is mediated through an inhibition of Akt activity. Thus, S1P induced a strong dephosphorylation of Akt. S1P reduced not only the basal Akt phosphorylation, but also insulin-induced Akt activity. In this study, a previously unreported interplay between S1P and insulin-mediated signaling pathways was identified, which is of great interest as epidermal hyperproliferation is associated with a strong induction of insulin-mediated signal transduction pathways. Most interestingly, the inhibition of insulin-induced Akt activity is mediated through protein kinase C (PKC) activation. Comparable to S1P, the direct PKC activator TPA reduced Akt phosphorylation and induced inhibition of keratinocyte growth. In addition, PKC δ was identified as the PKC isoform responsible for Akt dephosphorylation and reduction of proliferation. Hence, S1P mediates its effect on Akt activity and cell growth via an activation of PKC δ .

S1P mediates its action either intracellularly or via its transmembrane G-protein-coupled receptors S1P₁₋₅. This study reveals that S1P mediated the inhibition of Akt activity via ligation to its receptors. Furthermore, the S1P₂ receptor

was identified as the crucial receptor subtype for inhibition of Akt phosphorylation. To substantiate the role of the S1P₂ receptor subtype in the activation of PKC δ , dephosphorylation of Akt and subsequent inhibition of insulin-induced keratinocyte growth was proved to be transduced through the S1P₂ receptor subtype. The present study reveals differences in cellular effects of S1P and the novel immunomodulator FTY720. Phosphorylated FTY720 acts as potent agonist on four S1P receptors showing no agonistic activity at the S1P₂ receptor subtype. Therefore FTY720-P failed to suppress insulin-mediated Akt phosphorylation and subsequent proliferation of human keratinocytes.

The present study identifies an interplay between insulin and S1P on Akt signaling leading not only to the described inhibition of insulin-induced cell growth, but also to a modulation of the antiapoptotic action of insulin. As Akt plays a crucial role in antiapoptotic signaling, the effect of S1P on insulin-mediated cytoprotection was evaluated. Indeed, dephosphorylation of Akt through S1P also reduced the antiapoptotic effect of insulin. This interplay's effect on cytoprotective signaling was also mediated through the S1P₂ receptor subtype.

S1P mediates antiapoptotic signaling via distinct, Akt-independent transduction pathways. Characterization of the signaling pathways transducing the antiapoptotic effect of S1P revealed an involvement of the S1P receptor subtypes. Thus, the S1P₃ receptor was identified as the crucial subtype to mediate cytoprotection. Furthermore, inhibition of the S1P₂ receptor subtype potentiated the antiapoptotic signaling of S1P₃ suggesting a functional antagonism between the S1P₂ und S1P₃ receptor subtype.

Moreover, the present study shows that the antiapoptotic effect of S1P was NO-dependent. Indeed, inhibition of NO-production completely reversed the cytoprotective action of S1P. The formation of NO is catalyzed through NO-synthases. The expression of the constitutive NO-synthase isoforms, eNOS and nNOS, was proved in human keratinocytes. In addition, expression of iNOS was induced by UV-irradiation and stimulation with TNF α . If S1P protects keratinocytes via NO-dependent signaling pathways, it should be possible to measure increases in NO-formation following S1P treatment. As expected, S1P induced phosphorylation of eNOS. Thus, subsequent increase in enzyme activity markedly increased the intracellular NO-production. Most interestingly, increased NO formation by S1P is only due to the induction of enzyme activity through eNOS phosphorylation, as S1P treatment did not change the level of eNOS protein. In addition, exclusive activation

of the S1P₃ receptor subtype evoked an activation of eNOS. These results support the crucial role of this receptor subtype in the antiapoptotic action of S1P.

In addition to the cytoprotective transduction pathway via eNOS activation, the present study reveals an additional NO-regulating signaling pathway to promote keratinocyte survival. Thus, induction of apoptosis was strongly associated with an increase in iNOS expression. Most interestingly, the protective agent S1P abrogated the induction of iNOS protein as well as mRNA expression. In particular, the present study indicates that S1P inhibits keratinocyte apoptosis via at least two co-existing NO-dependent signaling pathways. On the one hand, S1P activates eNOS through phosphorylation without changing the protein level and on the other hand, S1P inhibits iNOS expression, which is induced during apoptosis, and prevents the formation of cytotoxic amounts of NO.

Thus, this thesis describes for the first time interactions between signaling pathways of insulin and S1P. Furthermore, antiapoptotic and antiproliferative action of S1P in human keratinocytes were characterized and the underlying signal transduction was identified.

Finally, the cytoprotective effect of LPA on endothelial cells was evaluated. The present study shows for the first time the antiapoptotic action of LPA in endothelial cells. This effect was transduced through activation of Akt via G-protein-coupled LPA receptors.