

Marianti Manggau

**Untersuchungen zu Signalwegen von SPP
in humanen Keratinozyten**

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Manggau, Marianti:

Untersuchungen zu Signalwegen von SPP in humanen Keratinozyten / Marianti Manggau. -

Berlin : Weißensee-Verl., 2002

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2002

ISBN 3-934479-73-1

Gedruckt auf holz- und säurefreiem Papier, 100 % chlorfrei gebleicht.

© Weißensee Verlag, Berlin 2002
Wilhelm-Wagenfeld-Str. 1, 13086 Berlin
Tel. 0 30 / 91 20 7-100
www.weissensee-verlag.de
e-mail: mail@weissensee-verlag.de

Alle Rechte vorbehalten

Umschlag: Chili Grafik-Design, Berlin

Printed in Germany

ISBN 3-934479-73-1

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	i
1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Das Hautorgan	1
1.2 Psoriasis vulgaris	6
1.3 $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Vitamin D ₃	7
1.4 $1,25$ -(OH) ₂ D ₃ und der Sphingolipidmetabolismus	10
1.5 Wirkungen und Signalwege von $1,25$ -(OH) ₂ D ₃ und SPP.....	11
1.5.1 Die MAPK-Kaskade.....	14
1.5.2 Einfluss auf den Calcium-Gehalt.....	17
1.5.3 SPP-Rezeptoren	19
1.6 Durchflusszytometrische Analytik	20
1.6.1 Anwendung des Durchflusszytometers	22
1.6.1.1 Apoptose-Messung	22
1.6.1.2 DNA-Messungen	23
1.6.1.3 Intrazelluläre Calciumionen-Konzentration	24
1.7 Fragestellung und Zielsetzung.....	25
2. MATERIAL UND METHODEN.....	26
2.1 Material.....	26
2.2 Medien und Puffer.....	29
2.2.1 Keratinozyten-Medien.....	29
2.2.1.1 Keratinozyten Wachstumsmedium (KGM)	29
2.2.1.2 Keratinozyten-Testmedium zur Apoptosemessung	30
2.2.2 Lösungen für die Haut	30
2.2.2.1 Transportmedium	30
2.2.2.2 Antibiotikalösung	30
2.2.2.3 PBS	30
2.2.2.4 Trypsin/EDTA (3:1)	31
2.2.2.5 Stopmedium	31
2.2.2.6 Einfriermedium	31
2.2.3 Lösungen für den Apoptose-Test	31

2.2.3.1	<i>FITC-Annexin V-Bindung</i>	31
2.2.3.2	<i>TUNEL-Färbung</i>	31
2.2.4	<i>Puffer für die Analyse des p44/42 MAPK (ERK1/2)-Signalweges</i>	32
2.2.4.1	<i>Zellysepuffer 1x</i>	32
2.2.4.2	<i>Kinasepuffer 1x</i>	32
2.2.4.3	<i>Transferpuffer (pH 8,5)</i>	32
2.2.4.4	<i>Trenngelpuffer (pH 8,8) 1x</i>	33
2.2.4.5	<i>Sammelgelpuffer (pH 6,8) 1x</i>	33
2.2.4.6	<i>Laufpuffer (pH 8,3) 10x</i>	33
2.2.4.7	<i>Waschpuffer (pH 7,6) 10x</i>	33
2.2.4.8	<i>Blockpuffer</i>	33
2.2.4.9	<i>Blotpuffer 10x</i>	33
2.2.4.10	<i>Puffer zur Verdünnung des Primärantikörpers</i>	34
2.2.5	<i>Puffer für die Calciummessung</i>	34
2.2.5.1	<i>Lockes Puffer (pH 7,4)</i>	34
2.2.5.2	<i>Zellpermeabilisierungs-Puffer (pH 7,4)</i>	34
2.3	<i>Geräte</i>	34
2.4	<i>Methoden</i>	36
2.4.1	<i>Kultivierung primärer Keratinozyten</i>	36
2.4.2	<i>Splitten einer bestehenden Kultur</i>	36
2.4.3	<i>Einfrieren und Auftauen der Zellen</i>	37
2.4.4	<i>Quantifizierung von Zellen</i>	37
2.4.5	<i>Vorkultivierung</i>	38
2.4.6	<i>Zubereitung und Zugabe von SPP</i>	38
2.4.7	<i>Wirkung von Sphingolipiden auf die Apoptose</i>	38
2.4.7.1	<i>Morphologische Untersuchung</i>	38
2.4.7.2	<i>FITC-Annexin V-Bindung</i>	39
2.4.7.2.1	<i>Vorbereitung des Durchflusszytometers</i>	39
2.4.7.2.2	<i>FSC, SSC und FSC Schwellenwert</i>	40
2.4.7.2.3	<i>FL1- und FL2-PMT-Spannungen einstellen</i>	40
2.4.7.3	<i>In Situ Nachweis des Zelltods, POD</i>	40
2.4.8	<i>Wirkung von Sphingolipiden auf die Proliferation</i>	41
2.4.8.1	<i>[Methyl-³H]-Thymidineinbau</i>	42
2.4.8.2	<i>Zellzyklusanalyse</i>	42

2.4.9 Messung der MAPK-Aktivität	44
2.4.9.1 Proteinbestimmung	45
2.4.9.2 Gelpräparation	46
2.4.9.3 Western Blot.....	47
2.4.10 Bestimmung der intrazellulären Calciumionen Konzentration bei Keratinocyten mittels Durchflusszytometrie	48
2.4.11 Permeabilisieren der Keratinocyten für die Messung der Calciumfreisetzung	48
3. ERGEBNISSE.....	49
3.1 Bedeutung von 1,25-(OH) ₂ D ₃ und SPP bei apoptotischen Prozessen	49
3.1.1 Einfluss von 1,25 (OH) ₂ D ₃ auf die Keratinocyten-Proliferation.....	49
3.1.2 Einfluss von 1,25 (OH) ₂ D ₃ auf die Apoptose.....	50
3.1.2.1 Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate	51
3.1.2.2 TUNEL-Färbung	53
3.1.3 Zytoprotektiver Effekt von 1,25-(OH) ₂ D ₃ bei Keratinocyten	54
3.1.4 Die Bedeutung von SPP bei der zytoprotektiven Wirkung von 1,25-(OH) ₂ D ₃	62
3.2 SPP und sein Einfluss auf Proliferation und Differenzierung	63
3.2.1 Nachweis des antiproliferativen Effekts von SPP durch Zellzyklusanalyse	64
3.2.2 Einfluss von SPP auf die MAPK	66
3.2.2.1 Aktivierung der MAPK-Kaskade durch SPP	66
3.2.2.2 Einfluss von PTX auf die SPP-induzierte MAPK-Aktivierung	67
3.2.2.3 PD 98059 inhibiert die SPP-aktivierte MAPK	69
3.2.3 Wirkung des p44/42 MAPK-Inhibitors PD 98059 auf die antiproliferative Wirkung von SPP	70
3.2.4 Effekt des p44/42 MAPK-Inhibitors PD 98059 auf den antiapoptotischen Effekt von 1,25-(OH) ₂ D ₃ und SPP	71
3.3 Einfluss von Sphingosin bzw. SPP auf die intrazelluläre Calciumionen-Konzentration bei humanen Keratinocyten	72
3.3.1 Einsatz von Fluo-3/AM zur Bestimmung der Calciumionen-Konzentration	72

3.3.2 Einfluss von Sphingosin auf die intrazelluläre Calciumionen-Konzentration in Keratinozyten	73
3.3.3 Einfluss von SPP auf die intrazelluläre Calciumionen-Konzentration in Keratinozyten	74
3.3.4 IP_3 -unabhängiger Anstieg des intrazellulären Calciums durch SPP	78
3.3.5 Calciumerhöhung durch SPP: rezeptorvermittelt oder intrazelluläre Wirkung?.....	81
4. DISKUSSION.....	82
4.1 Bedeutung von $1,25-(OH)_2D_3$ und SPP bei apoptotischen Prozessen	82
4.1.1 Einfluss von $1,25-(OH)_2D_3$ auf die Proliferation	82
4.1.2 Einfluss von $1,25-(OH)_2D_3$ und SPP auf apoptotische Prozesse	84
4.2 Der Einfluss von SPP und auf Proliferation und Differenzierung humaner Keratinozyten.....	87
4.2.1 Antiproliferativer Effekt von SPP	87
4.2.2 Einfluss von SPP auf die MAP-Kaskade	90
4.3 Einfluss von Sphingosin bzw. SPP auf die intrazelluläre Calciumionen-Konzentration.....	91
4.4 Methoden zur Bestimmung der Zellproliferation und Apoptose	94
4.4.1 Methoden zur Bestimmung der Zellproliferation	94
4.4.2 Methoden zur Bestimmung der Apoptose	94
4.4.3 Einsatz von Fluo-3/AM zur Bestimmung der Calciumionen-Konzentration bei Keratinozyten	95
4.5 Ausblick	96
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	98
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	102

5. ZUSAMMENFASSUNG

In den letzten Jahren hat sich herauskristallisiert, dass der aktive Metabolit von Vitamin D₃ 1,25-(OH)₂D₃, nicht nur an der Regulation der Calciumhomoöstase beteiligt ist, sondern auch die Proliferation und die Differenzierung von hämatopoetischen und epithelialen Zellen beeinflusst. Bei humanen Keratinozyten inhibiert 1,25-(OH)₂D₃ das Zellwachstum und fördert die Differenzierung zu Korneozyten. Aufgrund dieser Eigenschaften dienen 1,25-(OH)₂D₃ sowie seine Analoga Calcipotriol und Tacalcitol zur örtlichen Behandlung der leichten bis mittelschweren Psoriasis vulgaris.

Der Einfluss von 1,25-(OH)₂D₃ auf eine Vielzahl von Signalkaskaden, die an einem antiproliferativen Effekt beteiligt sein könnten, wurden bisher überprüft. Trotzdem ist der genaue Mechanismus, auf welche Weise das Secosteroid seine Wirkung vermittelt, bis heute nicht vollständig geklärt. Eine große Bedeutung bei den Wirkungen von 1,25-(OH)₂D₃ wird Sphingolipid-Metaboliten zugeschrieben. Tatsächlich war die aktive Form des Vitamin D₃ die erste Substanz, für die ein Einfluss auf Sphingolipide nachgewiesen wurde. In HL-60-Zellen führt 1,25-(OH)₂D₃ zur Hydrolyse des Membranlipids Sphingomyelin und damit zu der Bildung von Ceramiden. Tatsächlich besitzen Ceramide hinsichtlich Differenzierung und Inhibierung des Zellwachstums von HL-60-Zellen ähnliche Eigenschaften wie 1,25-(OH)₂D₃. Daher hat man postuliert, dass die Bildung von Ceramiden nach 1,25-(OH)₂D₃-Gabe essentiell für dessen Wirkung ist. Auch an Keratinozyten wurde der Einfluss von 1,25-(OH)₂D₃ auf den Sphingolipidmetabolismus näher untersucht. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen an HL-60-Zellen konnte auch bei diesen epidermalen Zellen die transiente Bildung von Ceramiden nachgewiesen werden. Ceramide sind jedoch auch wirkungsvolle Induktoren des apoptotischen Prozesses. Demnach sollte man erwarten, dass 1,25-(OH)₂D₃ aufgrund seiner Ceramid-Bildung apoptotische Prozesse in Keratinozyten auslöst. Mehrere Studien belegen in der Tat, dass bei Keratinozyten der antiproliferative Effekt mit einer gesteigerten Apoptoserate verbunden ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte nun aber eindeutig nachgewiesen werden, dass Inhibierung des Zellwachstums und Induktion der Apoptose nicht miteinander gekoppelt sind. In Einklang mit den beschriebenen Studien induziert zwar 1,25-(OH)₂D₃ Apoptose in Keratinozyten, allerdings finden apoptotische Vorgänge allerdings erst bei Konzentrationen über 1 µM statt. Die antiproliferative Wirkung dagegen liegt im nanomolaren Bereich von 1,25-(OH)₂D₃. Vor dem Hintergrund der publizierten apoptotischen Wirkung überraschte der hier gefundene antiapoptotische Effekt von 1,25-(OH)₂D₃. Diese Untersuchungen belegen eindeutig, dass

1,25-(OH)₂D₃ in physiologischen Konzentrationen eine zytoprotektive Wirkung in Keratinozyten besitzt. Werden die epidermalen Zellen mit 1,25-(OH)₂D₃ vorinkubiert, so ist die Apoptoserate drastisch verringert, wenn im Anschluss Apoptoseinduktoren zugefügt werden. Dabei ist die zytoprotektive Wirkung unabhängig vom Stimulus, in der vorliegenden Arbeit wurden UV-Strahlung, TNF- α und Ceramide als Apoptoseinduktoren eingesetzt.

Diese Ergebnisse sind nicht mit der Bildung von Ceramiden in Keratinozyten nach 1,25-(OH)₂D₃-Behandlung erklärbar, wohl aber mit der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen weiteren Metabolisierung der Ceramide zu SPP. Dieses Sphingolipid-Derivat entfaltet in Keratinozyten antiapoptotische Wirkungen. Es besteht eine direkte Korrelation zwischen dem protektiven Effekt von 1,25-(OH)₂D₃ und der intrazellulären Bildung von SPP. Eine direkte Beteiligung von SPP an den protektiven Wirkungen von 1,25-(OH)₂D₃ konnte ebenfalls eindeutig nachgewiesen werden. So wird der zytoprotektive Effekt von 1,25-(OH)₂D₃ durch den Sphingosin-Kinase-Inhibitor DMS vollständig aufgehoben und kann nur durch Zugabe von exogenem SPP wiederhergestellt werden.

Im weiteren wurden intrazelluläre Angriffspunkte untersucht, die für eine protektive Wirkung von SPP in Keratinozyten verantwortlich sein könnten. Untersuchungen an U937 Zellen zeigen, dass die Aktivierung der MAPK-Kaskade ein entscheidender Signalweg für den antiapoptotischen Effekt in diesen Zellen ist. Auch bei Keratinozyten konnte nachgewiesen werden, dass SPP die MAPK-Kaskade, speziell ERK1 und ERK2, aktiviert. Eine Hemmung der ERK1 und ERK2 hob allerdings den antiapoptotischen Effekt von SPP nicht auf, was belegt, dass in Keratinozyten diese Mitglieder der MAPK-Kaskade nicht zu dem zytoprotektiven Effekt beitragen. Allerdings konnte gezeigt werden, dass eine Beteiligung der Bcl-2-Familie an der protektiven Wirkung von 1,25-(OH)₂D₃ und SPP in Keratinozyten essentiell ist. Vor allem das Bcl-2-Protein wird durch 1,25-(OH)₂D₃ und SPP vermehrt gebildet.

Da die Untersuchungen belegen, dass 1,25-(OH)₂D₃ den SPP Gehalt in Keratinozyten erhöht, wurden auch Proliferations- und Differenzierungsvorgänge näher untersucht. Zellzyklusanalysen belegen, dass SPP eine Akkumulation der Keratinozyten in der G₀/G₁-Phase induziert, während die Anzahl der Zellen in der S-Phase abnimmt. Dieses Ergebnis war unerwartet, da SPP bisher hauptsächlich als mitogene Substanz bekannt ist. Bei Keratinozyten dagegen besitzt SPP demnach nicht nur antiapoptotische sondern auch antiproliferative Wirkungen. Der antiproliferative Effekt wird mit den gleichen Konzentrationen erreicht, die

auch für die protektive Wirkung verantwortlich sind. Darüber hinaus wird auch eine Differenzierung der Keratinozyten zu Korneozyten gefördert. Wiederum wurde untersucht, ob die MAPK-Kaskade für den antiproliferativen Effekt verantwortlich ist. Aber auch hier zeigten die Ergebnisse mit dem spezifischen ERK1- und ERK2-Inhibitor, dass die MAPK nichts zu dem antiproliferativen Effekt beiträgt. Vielmehr war die Inhibierung des Zellwachstums in Gegenwart des Inhibitors stärker ausgeprägt, was darauf hindeutet, dass die MAPK-Kaskade eher eine gegensätzliche Wirkung in Keratinozyten besitzt. Dies wiederum steht in Einklang mit Untersuchungen an anderen Zelltypen, bei denen die Aktivierung der MAPK-Kaskade an einer Proliferationsförderung beteiligt ist.

Für die Differenzierung von Keratinozyten ist die intrazelluläre Erhöhung des Calcium-Spiegels ein entscheidender Faktor. Tatsächlich steigt nach Zugabe von SPP der Calcium-Gehalt durch Freisetzung aus internen Speichern über einen IP_3 -unabhängigen Weg. Daher scheint dies ein bedeutender Signalweg für eine differenzierungsfördernde Wirkung von SPP in Keratinozyten zu sein.

SPP kann seine Wirkung einerseits über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Edg-Rezeptoren) vermitteln, andererseits wird SPP auch als second messenger diskutiert. Hinsichtlich seiner antiapoptischen und antiproliferativen Wirkung weisen die vorliegenden Untersuchungen auf einen intrazellulären Mechanismus von SPP hin. Denn $1,25-(OH)_2D_3$ erhöht den intrazellulären SPP-Gehalt und Sphingosin-Kinase-Inhibitoren inhibieren diese SPP-vermittelten Effekte. Zudem kann die antiproliferative Wirkung durch PTX nur teilweise gehemmt werden. Ein parakriner/autokriner Mechanismus nach intrazellulärer Erhöhung kann allerdings nicht ausgeschlossen werden.

Für die Aktivierung der MAPK-Kaskade und für die Mobilisierung von Calcium aus internen Speichern hingegen konnte eindeutig ein rezeptorvermittelter Prozess nachgewiesen werden. Denn durch Vorinkubation mit PTX konnten beide Prozesse vollständig inhibiert werden. Dies belegt, dass der Effekt von SPP bei Keratinozyten auf die Calciumerhöhung und die MAPK-Kaskade durch G_i/G_o -gekoppelte Edg-Rezeptoren vermittelt wird.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen somit erstmalig neue Wirkungen von SPP auf humane Keratinozyten. Besonders die antiproliferativen Effekte von SPP könnten ausgenutzt werden, um die Substanz bei hyperproliferativen Hautkrankheiten einzusetzen. Dies ist von großer Bedeutung, da bis heute keine befriedigenden Therapeutika zur Behandlung der Psoriasis vulgaris existieren. Zudem konnten neue Erkenntnisse zu den Wirkungen von $1,25-(OH)_2D_3$

gewonnen werden. Entscheidend ist hier erstmalig eine eindeutige Trennung von apoptotischen Vorgängen und einem antiproliferativen Effekt. Dies steht im Gegensatz zu der bisher angenommenen Wirkungsweise von $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ bei Psoriasis vulgaris.

Die in der Arbeit erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 32 schematisch dargestellt.

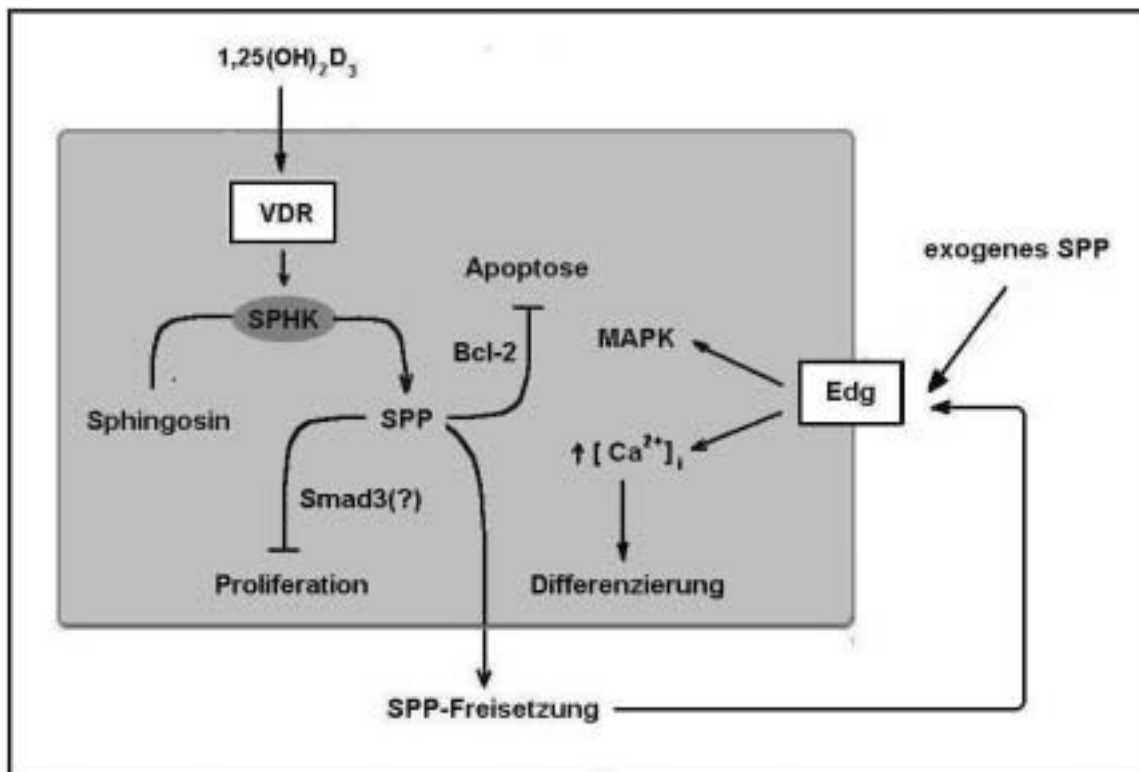


Abb. 32 Extrazelluläre versus intrazelluläre Wirkungen von SPP bei Keratinozyten. SPP wird von der durch $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ stimulierten Sphingosin-Kinase (SPHK) verstärkt synthetisiert. Als sekundärer Botenstoff hemmt SPP die Apoptose sowie die Proliferation und kann außerdem aus den Zellen in den Extrazellulärraum gelangen und parakrin und/oder autokrin an Edg-Rezeptoren binden. Dadurch werden wiederum intrazelluläre SPP-Wirkungen ausgelöst, wie die Aktivierung der MAPK-Kaskade sowie die Erhöhung der intrazellulären Calciumionen-Konzentration. Die Letztere ist ein entscheidender Faktor für die Differenzierung von Keratinozyten.