

**SIGNIFICANCE OF TRANSFORMING GROWTH
FACTOR- β SIGNALING PATHWAYS ON THE
SPHINGOSINE 1-PHOSPHATE SIGNALING:
RELEVANCE FOR THE CHEMOTAXIS OF
HUMAN DERMAL PRIMARY FIBROBLASTS**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Pilar Rivera Gil

aus Sevilla, Spanien

Berlin 04/2007

1. Gutachter:	Herr Professor Dr. Burkhard Kleuser
2. Gutachter:	Herr Professor Dr. Heinz H. Pertz
Disputation am:	14. Mai 2007

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Burkhard Kleuser für die Überlassung des hochinteressanten Dissertationsthemas, die Betreuung und die wissenschaftliche Unterstützung während der Arbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting für die Möglichkeit zur Anfertigung einer Promotionsarbeit im Fachbereich Pharmakologie als auch bei Herr Prof. Dr. Heinz H. Pertz für die Erstellung des Zweitgutachtens bedanken.

Mein Dank gilt auch dem Berliner Programm zur Förderung der Chancengleichheit für Frauen in Forschung und Lehre der Humboldt-Universität zu Berlin: Ihre finanzielle Unterstützung in den Zeitraum von 01.03.2004 - 31.05.2006 hat diese Arbeit ermöglicht.

Ferner möchte ich mich bei Frau Dr. Bettina Sauer für die kompetente Einarbeitung und Betreuung in molekulare biologischen Bereich sowie bei Frau Dr. Stefanie Hammer und bei Frau Dr. Christina Grimm von Max Planck Institut für Molekulare Genetik für ihre Hilfsbereitschaft bei der Real-Time PCR und der konfokalen Mikroskopie bedanken.

Herr Prof. Dr. Ricardo Hermsilla und Frau Isabel Schwiager von Institut für Pharmakologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin danke ich sehr herzlich für ihr wertvolles Fachwissen, die Hilfsbereitschaft und die langwierige Unterstützung am konfokalen Mikroskop.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises von Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting danke ich für das freundschaftliche Arbeitsklima und die vielen schönen Unternehmungen. Insbesondere möchte ich mich bei Frau Dr. Sylvia Schreiber und Herr Dr. Simone Lombardi Borgia für die herzliche Unterstützung, die ständige Bereitschaft und die Freundschaft bedanken.

Besonderer Dank gilt der Sphingolipidgruppe: Frau Hannelore Gonska, die immer Zellen besorgt und den Umgang mit Zellkulturen näher gebracht hat, Herrn Karsten Zimmermann, dessen kritische Anmerkungen sehr hilfreich waren, Herrn Dr. Henrik

von Wenckstern, Frau Corinna Schraut, Frau Christina Dora Keller, Frau Melanie Schüppel, Herrn Ulrich Kürschner und Herrn Henrik Pottech, die eine nette Atmosphäre und somit die notwendige Kooperation bei der Arbeit ermöglicht haben.

Besonders herzlich möchte ich Frau Dr. Daniela Malek für die wissenschaftliche Anregung und ihre höchst konstruktive Durchsicht meiner Arbeit, sowie für ihren Beistand während der gesamten Zeit und ihre Freundschaft bedanken.

Einen besonderen Dank möchte ich meinen Eltern und Brüdern sowie Herr Pablo J. Moreno de Acevedo aussprechen für den Rückhalt, die Ermutigung und die liebevolle Unterstützung in allen Höhen und Tiefen dieser Arbeit.

Publications

P. Rivera Gil, B. Sauer and B. Kleuser. Involvement of Smad signaling in sphingosin 1-phosphate-mediated chemotaxis and PAI-1 formation via the S1P3 receptor (Manuscript).

C. D. Keller, P. Rivera Gil, M. Tölle, M. van der Giet and B. Kleuser. Immunomodulator FTY 720 induces differentiation of fibroblasts to myofibroblasts via the lysophospholipidreceptor S1P3. *Am. J. Pathol*, **170** (1): 281-92.

Poster sessions

P. Rivera-Gil, C. Schraut, C. Keller, B. Kleuser and M. Schäfer-Korting. Sphingosine 1-phosphate as a mediator of the fibrotic response. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (Suppl 1) 371, 2005.

C. D. Keller, P. Rivera Gil, M. Tölle, M. van der Giet and B. Kleuser. The immunomodulator FTY720 induces transdifferentiation of human primary fibroblasts to myofibroblasts via the sphingosine 1-phosphate receptor subtype S1P3 and Smad3-signalling. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (Suppl 1) 372, 2006.

1	INTRODUCTION	2
1.1	Lysophospholipids	2
1.1.1	S1P origin	2
1.1.2	S1P receptors (S1PRs).....	5
1.1.2.1	Agonist-induced desensitization	5
1.1.2.2	Physiological relevance of S1PRs	6
1.1.3	G protein signaling	7
1.1.4	GPCR crosstalk with other growth factors receptors.....	10
1.2	Transforming growth factor-β (TGF-β).....	13
1.2.1	The TGF- β superfamily	13
1.2.2	TGF- β receptors (T β R).....	14
1.2.3	Smad proteins and the Smad signal transduction pathway	16
1.2.3.1	Receptor-mediated endocytosis	19
1.3	Chemotaxis.....	21
1.4	Physiological relevance of S1P-induced motility in human fibroblasts	27
1.5	Aim of the work	31
2	MATERIALS AND METHODS.....	34
2.1	Materials	34
2.1.1	Technical devices and consumptive materials	34
2.1.2	Reagents	36
2.1.3	Culture media and solutions	40
2.1.3.1	Cell culture media	40
2.1.3.2	Solutions for cell culture	40
2.1.3.3	Cell lysis solution	41
2.1.3.4	Bradford solution (5fold):	42
2.1.3.5	Solutions for electrophoresis and western blot analysis	42
2.1.3.6	Antibodies solutions.....	43
2.1.3.7	Oligonucleotides and Primer.....	44

2.1.3.8	mRNA transcription solutions	46
2.1.3.9	Plasmid amplification solutions.....	46
2.1.3.10	Solutions for Immunofluorescence	47
2.1.3.11	Potassium depletion solutions	47
2.2	Methods	48
2.2.1	Isolation of fibroblasts	48
2.2.2	Cell culture	48
2.2.3	Test substances.....	48
2.2.4	Stimulation of cells	49
2.2.5	Cell lysis and immunoprecipitation.....	49
2.2.6	Isolation of membrane proteins.....	50
2.2.7	Determination of protein concentration by Bradford staining	51
2.2.8	SDS-gel electrophoresis	52
2.2.9	Western blot analysis.....	52
2.2.10	Stripping.....	53
2.2.11	Migration assay.....	53
2.2.12	Transient transfection of fibroblasts	54
2.2.13	Antisense technique.....	54
2.2.14	Plasmid amplification	55
2.2.14.1	Preparation of Competent Bacteria (<i>Escherichia coli</i>)	55
2.2.14.2	Bacterial transformation.....	56
2.2.14.3	Plasmid purification	57
2.2.15	Immunofluorescence staining	58
2.2.16	Visualization of fluorescent proteins.....	58
2.2.17	Analysis of mRNA transcription and amplification.....	59
2.2.17.1	mRNA purification.....	59
2.2.17.2	Synthesis of complementary DNA (cDNA)	60
2.2.17.3	Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (QRT-PCR)	61
2.2.18	Potassium Depletion	62
2.2.19	Data analysis and statistics.....	62

3	RESULTS.....	65
3.1	Effects of S1P on the motility of human primary fibroblasts	65
3.1.1	Influence of S1P and TGF- β in the migratory activity of human fibroblasts	65
3.1.2	Chemokinetic effect of the migratory response to a gradient of S1P	67
3.1.3	Cytoskeletal changes caused by S1P to induce motility	68
3.1.4	Analysis of S1PRs expression in human fibroblasts	70
3.1.5	Designation of a S1P receptor-mediated extracellular signal.....	71
3.2	Molecular pathways involved	74
3.2.1	The Smad system	74
3.2.1.1	Role of S1P on Smad proteins activation	74
3.2.1.2	S1P stimulates Smad nuclear translocation	75
3.2.1.3	Determination of S1PR participation in the activation of Smad proteins.....	76
3.2.1.4	Abrogation of the Smad3 pathway: significance on S1P motility	79
3.2.2	The MAPK cascade	81
3.2.2.1	Phosphorylation of the MAPK ERK1/2 in response to S1P	81
3.2.2.2	Role of ERK1/2 activation in the migratory effect of S1P.....	82
3.3	Interplay of S1P and TGF-β signaling	84
3.3.1	Effects of T β R-I inhibition on S1P actions.....	84
3.3.2	Agonist-induced S1P ₁ internalization	86
3.3.3	S1P heterologous desensitization of TGF- β -signaling	87
3.3.4	Role of ERK1/2 in the desensitization of the TGF- β signal through S1P	89
3.3.5	Transfection of fibroblasts with the HA-tagged T β R-I plasmid	90
3.3.6	Signal retrieval in cells overexpressing the T β R-I	91
3.3.7	Down regulation of membrane T β R after S1P stimulation	92
3.3.8	Abrogation of S1P-induced internalization of T β R-I	94
3.3.9	Heterodimerization of S1P ₁ and T β R-I	95

4	DISCUSSION	97
4.1	Role of S1P and TGF-β in the migration of human dermal fibroblasts	97
4.1.1	Receptor-induced chemotactic activity of S1P in human fibroblasts	97
4.2.1	Migratory activity of TGF- β in human dermal fibroblasts	99
4.2.2	Participation of the Smad system and relevance of the MAPK pathway in the chemotaxis of fibroblasts	100
4.2	Crosstalk between S1P and TGF-β signaling	103
4.2.1	Relevance of T β Rs on the actions of S1P	103
4.2.2	S1P GPCR trans-activation	104
4.2.3	Heterologous desensitization of TGF- β signaling by S1P	105
4.2.3.1	Role of ERK1/2 MAPK in the counteracting effects of S1P on TGF- β signaling	107
4.2.4	T β R-I clathrin-mediated endocytosis induced by S1P	107
4.3	Conclusion	110
4.4	Outlook	111
5	SUMMARY	114
6	ZUSAMMENFASSUNG	118
7	REFERENCES	123
	CURRICULUM VITAE	136

[35S]GTP γ S	Guanosine 5-[gamma-35S] triphosphate-gammaS
AC	Adenylate cyclase
ALK	Activin receptor-like kinase
AP2	Adaptor protein 2
APS	Ammonium persulfate
bFGF	basic Fibroblast growth factor
BMP	Bone morphogenetic protein
BSA	Bovine serum albumin
CamKII	Ca ⁺² /Calmodulin-dependent protein kinase II
cAMP	cyclic Adenosine monophosphate
cDNA	complementary DNA
Cer	Ceramide
Cerase	Ceramidase
Cer1P	Ceramide 1-phosphate
Cer1PPase	Ceramide 1-phosphate phosphatase
CerK	Ceramide kinase
Cer syn	Ceramide synthase
COX-2	Cyclooxygenase-2
cPLA2	cytosolic Phospholipase A2
DAG	Diacylglycerol
dd Aqua	double distilled Water
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	1,4-Dithiothreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ECM	Extracellular matrix
EDG	Endothelial differentiation gene
EDTA	Ethylendiamin tetra-acetic acid
EEA1	Early endosomal antigen 1
EGF(R)	Epidermal Growth factor (receptor)
eNOS	endothelial Nitric oxide synthase
ERK	Extracellular signal-regulated kinase

FA	Focal adhesion
FBS	Fetal bovine serum
FGF	Fibroblast growth factor
FYVE	Fab1p, YOTB, Vac1p, EEA1
GADPH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
G proteins	Guanine nucleotide binding proteins
GDP	Guanine diphosphate
GPCR(s)	G protein-coupled receptor(s)
GRK	G protein-coupled receptor kinase
GTP	Guanine triphosphate
GTPase	GTP hydrolase
HA	Hemagglutinin protein
HGF	Hepatocyte growth factor
IGFBP-3	Insulin-like growth factor binding protein-3
IL-1 α	Interleukin-1 α
IP3	Inositol triphosphate
IUPHAR	International union of pharmacology
JNK	c-Jun N-terminal kinase
K ⁺	Potassium
KO	Knockout
LAP	Latency-associated peptide
LPA	Lysophosphatidic acid
LTBP	Latent TGF- β binding protein
MAD	Mother against dpp
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MH-1	C-terminal MAD homology domain 1
MH-2	C-terminal MAD homology domain 2
MI	Migration index
mRNA	messenger Ribonucleic acid
NANDOR box	non-activating-non-down-regulating box
ODN	Oligodesoxynucleotides
PD098059	2`-Amino-3`-methoxyflavon
PDGF(R)	Platelet-derived growth factor (receptor)
PGE2	Prostaglandin E2

PI3K	Phospho inositol 3 kinase
PIPES	Piperazine-N, N'-bis [2-ethanesulfonic acid]
PKC	Protein kinase C
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluoride
PP1	Protein phosphatase 1
PP2A	Protein phosphatase 2A
PtdIns(3)P	Phosphatidylinositol 3-phosphate
PTX	Pertussis toxin
PVDF	Polyvinyliden-difluoride membrane
RIPA buffer	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RT	Room temperature
RTK	Tyrosine kinase receptor
S1P	D-erythro-Sphingosine-1-phosphate
S1PPase	S1P phosphatase
S1PR	S1P receptors
SARA	Smad anchor for receptor activation
SB431542	4-(5-Benzol[1,3]dioxol-5-yl-4-pyridin-2-yl-1H-imidazol-2-yl)-benzamid
SBD	Smad-binding domain
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEW2871	5-(4-Phenyl-5-trifluoromethylthiophen-2-yl)-3-(3-trifluoromethylphenyl)-(1,2,4)-oxadiazole
SM	Sphingomyelin
SMase	Sphingomyelinase
SM syn	SM synthase
Smurf	Smad ubiquitination regulatory factor
Sph	Sphingosine
SphK	Sphingosine kinase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylen ethylene diamine
TGF- β	Transforming Growth Factor- β 1
TGIF	TGF- β -interacting factor
TNF	Tumor necrosis factor

VEGF(R)	Vascular endothelial growth factor (receptor)
WT	Wild-type