

6 ZUSAMMENFASSUNG

6. ZUSAMMENFASSUNG

Das Bindegewebe ist ein hoch vaskularisiertes Gewebe, das für den Organismus aller Vertebraten ein essentielles System für Gestalt, Schutz und Bewegung darstellt. Die Regulierung der Bindegewebemodulation durch Cytokine und Wachstumsfaktoren spielt bei einer Vielzahl von biologischen Prozessen wie Embryo-, Angio- und Tumorgenese, Fibrose oder Wundheilung eine zentrale Rolle. Die extrazelluläre Matrix (EZM) stellt den Gewebeanteil dar, der von Zellen (vorwiegend Fibroblasten) in den Interzellularraum sezerniert wird. Zelladhäsion, Zellmigration, Zellproliferation sowie Aufbau, Umbau und Abbau von Gewebe resultieren aus der gegenseitigen Beeinflussung zwischen EZM und den eingebetteten Zellen. Daher sind Erkenntnisse über die Regulation migratorischer Effekte von Fibroblasten in der EZM ein entscheidender Aspekt bei der Aufrechterhaltung der Homeostase verschiedener Arten von Bindegewebe. Der Mechanismus der Motilität beinhaltet hauptsächlich einen Zyklus aus vier Stufen: Protrusion des vorderen Endes, Adhäsion am Substrat, Retraktion des hinteren Teils und De-adhäsion. Diese werden grundsätzlich durch ein Zusammenspiel von Aktin-Neubildung und ständiger Auf- und Abbau fokaler Adhäsionen ausgeführt. Das Lysophospholipid Sphingosin-1-phosphat (S1P) wird von aktivierten Thrombozyten in der EZM freigesetzt und agiert als intra- und extrazellulärer Mediator und besitzt pleiotrope Eigenschaften. Unter anderem spielt S1P eine wichtige Rolle bei der Zellmotilität; dabei wurde bereits gezeigt, dass S1P sowohl migratorisch als auch antimigratorisch wirken kann. S1P vermittelt den Großteil seiner Effekte durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren (S1P₁₋₅). Eine Real-Time PCR Analyse bestätigte erstmals die Anwesenheit von mRNA-Transkripten aller fünf bekannten S1P Rezeptoren (S1P₃ >> S1P₁ > S1P₂ > S1P₄, S1P₅) in humanen dermalen Primärfibroblasten. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von S1P auf die dermale Zellmotilität sowie deren zugrunde liegende molekulare Mechanismen untersucht. Die Ergebnisse ergaben, dass S1P seine migratorischen Eigenschaften konzentrationsabhängig über seine Rezeptoren vermittelt. Ein chemotaktischer Effekt wurde in einem Konzentrationsbereich von 10⁻⁶ – 10⁻⁹ M beobachtet, 10⁻⁵ M löste dagegen keine Migration aus, und 10⁻¹⁰ – 10⁻¹² M rief eine ungerichtete Migration (Chemokinesis) hervor. Die Hemmung der S1P-vermittelten Migration durch Vorbehandlung mit Pertussistoxin bestätigte die Beteiligung der

Rezeptoren und zeigte eine Partizipation von Gi-Proteinen. Antisense-Untersuchungen ergaben, dass S1P₁ und S1P₃ Rezeptoren für die Migration von Fibroblasten verantwortlich sind. Entsprechend der signifikant erhöhten Zellmigration, bewirkte S1P die Ausbildung von Lamellipodien und die Reorganisation des Aktinzytoskeletts sowie Auf- und Abbau von fokalen Adhäsionen. Dies wurde durch Phalloidininfärbung der Aktinfilamente beziehungsweise Anfärbung des Adhäsionsproteins Vinculin gezeigt.

Der chemotaktische Effekt von S1P ist mit jenem des Transformierenden Wachstumsfaktors- β (TGF- β) vergleichbar. TGF- β wird analog zu S1P von aktivierten Thrombozyten sezerniert und kommt in die beschädigte EZM, z.B. im dermalen Wundareal, in hohen Konzentrationen vor. Darüberhinaus besitzen beide Mediatoren bimodale Effekte hinsichtlich Migration und Proliferation bei epidermalen Zellen. Im Gegensatz zu S1P konnten die intrazellulären Signalwege von TGF- β bereits identifiziert werden. In der bedeutendsten Signalkaskade führt die Bindung des Wachstumsfaktors an TGF- β Typ-I (T β R-I)- und Typ-II (T β R-II)-Rezeptoren zu einer Phosphorylierung von R-Smads (Smad2/3), die nun in ihrem aktivierten Zustand mit dem Co-Smad (Smad4) heteromerisieren und nach der Translokation in den Zellkern Genaktivitäten regulieren. Untersuchungen an Fibroblasten nach Stimulation mit S1P zeigten ebenfalls eine Aktivierung von Smad3, die eine mit dem Wachstumsfaktor vergleichbare Kinetik aufwies. Analog zu TGF- β führte S1P zu einer Translokation von Smad-Proteinen in den Zellkern. Weiterhin zeigte sich eine Beteiligung von Gi-Proteinen der S1P₁- und S1P₃-Rezeptoren an der Smad-Aktivierung sowie an der Migration. Ferner belegen Studien an Smad3 Knockout (KO) Wunden, dass die TGF- β -induzierte Migration und Proliferation von Keratinozyten sowie die Infiltration von Monozyten ins Wundareal ebenfalls Smad3-abhängig ist. Dahingehend sollte geprüft werden, ob dieses Signalprotein eine essentielle Bedeutung für die chemotaktischen Wirkungen von TGF- β und S1P in Fibroblasten besitzt. Wie auch im Falle von TGF- β wurde an Smad3 KO Fibroblasten die chemotaktische Wirkung von S1P nahezu vollständig aufgehoben. Auf der anderen Seite war an diesen Zellen keine Hemmung der durch S1P-induzierten Chemokinese zu beobachten. Da eine Beteiligung der ERK-MAPK an der Migration verschiedener Zelltypen bereits nachgewiesen wurde, ließ sich vermuten, dass diese Kinasen bei der durch S1P vermittelten Migration eine Rolle spielen könnten. In der Tat die Ergebnisse an Fibroblasten zeigten eine Aktivierung

der ERK1/2 durch S1P und deuteten auf eine Beteiligung des MAPK-Systems hin, weil die Hemmung von ERK1/2 Phosphorylierung durch Einsatz des MEK Inhibitors, PD098059, die S1P-Chemokinesis aufhob.

Aufgrund der Ähnlichkeit der Signalwege von S1P und TGF- β und vorangegangener Untersuchungen an Keratinozyten, die eine Mitwirkung von T β R-I an der S1P-vermittelten Migration ergaben, wurde der T β R-I Inhibitor SB431542 zur Ermittlung der Beteiligung von TGF- β -Rezeptoren (T β R) an der S1P-Signalkaskade in Fibroblasten eingesetzt. Tatsächlich waren die S1P-induzierte Migration und Smad Aktivierung verringert. Eine Besonderheit trat allerdings auf, wenn Fibroblasten zunächst mit S1P vorinkubiert wurden und anschließend die Migration auf TGF- β gemessen wurde. Unter diesen Bedingungen zeigten Fibroblasten keine erhöhte Migration und waren nicht mehr in der Lage, eine Smad2-Phosphorylierung zu induzieren. Da die vorgeschaltete Stimulation mit S1P bereits die Smad2-Phosphorylierung verursacht durch TGF- β hemmte, und R-Smads direkt durch aktivierte T β R phosphoryliert werden, erschien eine Interaktion auf Ebene der Rezeptoren wahrscheinlich. Eine solche Wechselwirkung wurde bereits für S1P₁ und PDGFR beschrieben. Im nächsten Schritt wurden Fibroblasten mit einem HA-Epitop markierten T β R-I transfiziert und anschließend wurde durch Migrationanalyse die Funktionalität der Rezeptoren bestätigt. Eine Westernblot-Analyse der isolierten Membranproteine von transient transfizierten Fibroblasten ergab eine vollständige Internalisierung des T β R-I nach Stimulation mit S1P oder TGF- β . Rezeptorendozytose kann über Caveolin- oder Clathrinvesikel ablaufen. Eine Hemmung der Internalisierung durch Kaliumdepletion wies auf eine Clathrin-abhängige Endozytose hin. Um die Annahme einer Crossaktivierung beider Signalwege weitergehend zu untersuchen, wurde eine Immunopräzipitation des membranständigen T β R-I, gefolgt von einer Westernblot-Analyse gegen S1P₁ durchgeführt. Die Ergebnisse ergaben, dass die Stimulation mit S1P eine Dimerisierung des S1P₁ und T β R-I induzierte und verifizierten somit die direkte Wechselwirkung dieser Rezeptoren.

Zusammenfassend konnten in der vorliegenden Arbeit zwei aktive Konzentrationsbereiche unterschieden werden. Niedrige S1P-Konzentrationen erzeugten eine Smad-unabhängige ERK-MAPK-vermittelte Chemokinese, wohingegen höhere Konzentrationen einen chemotaktischen Effekt auslösten. Die S1P-induzierte Chemotaxis wird über S1P₁ und S1P₃ und die Beteiligung von deren

Gi-Proteinen hervorgerufen. Dieser Signalweg erfordert die Anwesenheit des Smad3-Proteins, welches durch S1P aktiviert und in den Zellkern transloziert wird, und des T β R-I, der über eine Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert wird.