

**Signalwege von Sphingosin-1-Phosphat  
und deren Bedeutung für  
die endozytotische Aktivität von  
Dendritischen Zellen**

**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  
**Lukasz Japtok**  
aus Berlin

September, 2012

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Burkhard Kleuser  
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Matthias F. Melzig

Tag der Disputation: 20.11.2012

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von

Herrn Prof. Dr. Burkhard Kleuser

am Institut für Pharmakologie und Toxikologie

des Instituts für Pharmazie

der Freien Universität Berlin

sowie

am Lehrstuhl für Toxikologie

der Universität Potsdam angefertigt.

Für Monika

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Burkhard Kleuser für die Überlassung des hochinteressanten Promotionsthemas. Außerdem danke ich ihm für die hervorragende Betreuung und die wissenschaftliche Unterstützung, die durch stete Gesprächsbereitschaft und konstruktive Kritik gekennzeichnet war. Seine Kompetenz und sein umfassendes Verständnis auf dem Gebiet der Sphingolipide haben zu dieser Arbeit entscheidend beigetragen.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. Matthias F. Melzig, Institut für Pharmazeutische Biologie, für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Herrn Professor Dr. Heinfried H. Radeke danke ich für das murine Knochenmark zur Gewinnung der SphK1-Knock-out-Zellen.

Ich danke Frau Dr. Stephanie Krämer, Deutsches Institut für Ernährungsforschung, für die Bereitstellung der Mäuse zur Gewinnung Dendritischer Zellen.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. Anja Lüth für die Unterstützung bei der Analyse meiner Proben mittels der HPLC-MS-Anlage.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises von Herrn Professor Dr. Burkhard Kleuser und Frau Professor Dr. Monika Schäfer-Körting danke ich für die gute Zusammenarbeit und das freundliche Arbeitsklima.

Ich danke außerdem Frau Dr. Angelika Bondzio, Frau Julia Spors und Herrn Jakob Morgenstern für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich vom ganzen Herzen bei meiner Familie und vor allem bei Frau Monika Wonchalla für die ausdauernde und vielseitige Unterstützung sowie das stetig offene Ohr während der gesamten Promotionsarbeit bedanken.

## Originalarbeiten

Japtok L, Kleuser B: The role of sphingosine-1-phosphate receptor modulators in the prevention of transplant rejection and autoimmune diseases. Current opinion in investigational drugs. 2009 Nov;10(11):1183-94

Gil PR, Japtok L, Kleuser B: Sphingosine 1-phosphate mediates chemotaxis of human primary fibroblasts via the S1P-receptor subtypes S1P<sub>1</sub> and S1P<sub>3</sub> and Smad-signalling. Cytoskeleton. 2010 Dec;67(12):773-83

Japtok L, Schaper K, Bäumer W, Radeke H.H, Jeong S, Kleuser B: Sphingosine 1-phosphate modulates Antigen Capture by Murine Langerhans Cells via the S1P<sub>2</sub> receptor subtype. PLoS ONE. (accepted)

Japtok L, Bäumer W., Kleuser B: Sphingosin-1-Phosphat als Signalmolekül der Haut-Bedeutung beim atopischen Ekzem. Allergo Journal. (submitted)

## Poster

Japtok L, Kleuser B:

Influence of FTY720 on Langerhans cells

The Gordon Research Conference on Glycolipid and Sphingolipid Biology, February 7-12, 2010, Ventura, CA, USA

Japtok L, Fayyaz S, Schaper K, Bäumer W, Kleuser B:

Sphingosine 1-phosphate regulates the endocytic capacity of Langerhans cells

The IX Sphingolipid Club Meeting, September 28<sup>th</sup> to October 1<sup>st</sup>, 2011, Favignana, Italy

## Buchkapitel

Kleuser B., Japtok L.: Sphingolipids and inflammatory diseases of the skin.

Sphingolipids in Health and Disease. Springer Wien New York, edited by Petrache I. and Gulbins E.

---

1.	Einleitung.....	1
1.1	Dendritische Zellen.....	2
1.1.1	Ontogenese und DC-Subtypen .....	3
1.1.2	Antigenaufnahme und -prozessierung.....	5
1.1.3	Migration und Reifung.....	7
1.1.4	Regulation der Immunstimulation.....	8
1.1.5	Regulation der Immuntoleranz .....	10
1.1.6	Methoden zur Gewinnung von DC`s .....	11
1.2	Endozytose .....	13
1.2.1	Phagozytose .....	14
1.2.2	Rezeptor-vermittelte Endozytose .....	15
1.2.3	Pinozytose.....	16
1.3	Sphingosin-1-Phosphat.....	20
1.3.1	Biosynthese, Metabolismus und Herkunft von S1P.....	21
1.3.2	S1P-Signaltransduktion.....	25
1.3.3	Zellulärer S1P-Transport.....	28
1.3.4	PI3K-Signalweg als S1P-Target.....	29
1.3.5	S1P ein Immunmodulator.....	31
1.4	Zielsetzung.....	34
2.	Material und Methoden.....	36
2.1	Material .....	37
2.1.1	Geräte .....	37
2.1.2	Reagenzien und Verbrauchsmaterialien .....	39
2.1.3	Verwendete Lösungen .....	43
2.1.3.1	Lösungen zur Zellkultivierung.....	43
2.1.3.2	Lösungen zur Zelllyse .....	45
2.1.3.3	Lösungen zur Poteinanalytik .....	46
2.1.3.4	Lösungen zur RNA-Analytik.....	48
2.1.3.5	Lösungen zur FACS-Analytik.....	49
2.1.3.6	Lösungen zur fluoreszenzmikroskopischen Analytik .....	50
2.1.3.7	Lösungen der Testsubstanzen .....	50
2.2	Methoden .....	51
2.2.1	Methoden zur Gewinnung und Kultivierung der Zellen.....	51
2.2.1.1	Kultivierung von XS52 Zellen .....	51

2.2.1.2	Kultivierung von NS47 Zellen .....	52
2.2.1.3	Gewinnung und Kultivierung von BM-DC .....	52
2.2.1.4	Quantifizierung und Einsaat von Zellen.....	53
2.2.1.5	Kryopräservierung und Reaktivierung von Zellen.....	54
2.2.2	Methoden zur Proteinanalytik.....	54
2.2.2.1	Proteingewinnung durch Zellyse .....	54
2.2.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	55
2.2.2.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	55
2.2.2.4	Western Blot und Detektion der Proteine .....	56
2.2.3	Methoden zur RNA-Analytik.....	58
2.2.3.1	Isolierung der Zell-RNA für die cDNA-Synthese.....	58
2.2.3.2	cDNA-Synthese aus mRNA .....	58
2.2.3.3	Relative Quantifizierung der cDNA mittels Real-Time PCR .....	59
2.2.3.4	Reduktion der mRNA Expression mittels siRNA .....	61
2.2.4	Methoden zur FACS-Analytik.....	62
2.2.4.1	Bestimmung der zellulären Oberflächenmoleküle .....	63
2.2.4.2	Bestimmung der Apoptoserate.....	64
2.2.4.3	Bestimmung der FITC-Dextran Endozytoserate.....	65
2.2.5	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen.....	65
2.2.6	Quantifizierung von S1P im biologischen Material .....	67
2.2.7	Untersuchung der FITC- Dextran Endozytose <i>in situ</i> .....	70
2.2.8	Statistik.....	71
3.	Ergebnisse .....	72
3.1	Bedeutung von S1P für die Antigenaufnahme durch dendritische Zellen... 73	
3.1.1	<i>In situ</i> Untersuchung der Endozytose von FITC-Dextran durch epidermale DC`s nach topischer S1P-Applikation .....	73
3.1.2	Einfluss von S1P auf die Endozytose von FITC-Dextran durch unreife BM-DC`s.....	75
3.1.3	Einfluss von S1P auf die Endozytose von FITC-Dextran durch XS52 Zellen.....	77
3.1.3.1	Apoptoseverhalten der XS52 Zellen nach S1P-Stimulation .....	79
3.1.3.2	Differenzierungsstatus der XS52 Zellen nach S1P-Stimulation.....	80
3.1.4	Mechanismus der Endozytose von FITC-Dextran.....	82

3.1.5	Einfluss der PI3K-Aktivität auf die Endozytose von FITC-Dextran und ihre Modulation durch S1P .....	83
3.1.6	Charakterisierung der an der S1P-induzierten Endozytosereduktion beteiligten Rezeptoren.....	86
3.1.6.1	Expression der S1P-Rezeptoren in den XS52 Zellen.....	86
3.1.6.2	Einfluss von S1P-Rezeptor-Agonisten auf die Endozytose von FITC-Dextran und PI3K-Aktivität .....	87
3.1.6.3	Fluoreszenzmikroskopische Analyse der FITC-Dextran Endozytose..	88
3.1.6.4	Reduktion der S1P <sub>2</sub> -Rezeptorexpression mittels spezifischer siRNA .	90
3.1.6.5	Einfluss der verminderten S1P <sub>2</sub> -Rezeptorexpression auf die Endozytose von FITC-Dextran und PI3K-Aktivität .....	92
3.2	Bedeutung der ABC-Transporter für die Antigenaufnahme durch dendritische Zellen .....	94
3.2.1	Expression der ABC-Transporter in den XS52 Zellen.....	94
3.2.2	Einfluss der ABC-Transporter Hemmung auf die Endozytose von FITC-Dextran.....	95
3.2.3	Einfluss des ABCC1-Transporters auf die extrazellulären S1P-Spiegel.....	97
3.3	Bedeutung der SphK1 für die Antigenaufnahme durch dendritische Zellen .....	98
3.3.1	Einfluss der SphK1-Aktivierung auf die Endozytose von FITC-Dextran und PI3K-Aktivität .....	98
3.3.2	Einfluss der SphK1-Hemmung auf die Endozytose von FITC-Dextran und PI3K-Aktivität .....	100
3.3.2.1	Überprüfung der inhibitorischen Wirkung von SKI II.....	101
3.3.2.2	Apoptoseverhalten der XS52 Zellen nach SKI II-Stimulation .....	103
3.3.2.3	Differenzierungsstatus der XS52 Zellen nach SKI II-Stimulation.....	104
3.3.2.4	Endozytose von FITC-Dextran und Differenzierungsstatus in SphK1-Knock-out-BM-DC`s.....	108
4.	Diskussion .....	110
4.1	Bedeutung des exogenen S1P für die endozytotische Aktivität der DC`s .....	111
4.1.1	S1P-vermittelte Hemmung der Endozytose in unreifen DC`s.....	114

---

4.1.2	Identifizierung der Makropinozytose als durch S1P modulierte Endozytosemechanismus.....	116
4.1.3	Regulation der Makropinozytose über den PI3K-Signalweg .....	119
4.1.4	Charakterisierung des Makropinozytose modulierenden S1P-Rezeptorsubtyps.....	121
4.2	Bedeutung des endogenen S1P für die endozytotische Aktivität der DC`s .....	123
4.2.1	Identifizierung des für die S1P-Sekretion verantwortlichen ABCC1-Transporters .....	126
4.2.2	Bedeutung der SphK1-Aktivierung bei der Modulation der Endozytose.....	128
4.2.3	Bedeutung der SphK1-Inhibierung bei der Modulation der Endozytose.....	130
5.	Zusammenfassung .....	134
5.1	Zusammenfassung.....	135
5.2	Abstract .....	139
6.	Abkürzungsverzeichnis.....	142
7.	Literaturverzeichnis .....	146

# 1. Einleitung

---

## 1.1 Dendritische Zellen

Die vor über dreißig Jahren von Ralph Steinman beschriebenen Dendritischen Zellen (DC`s) sind morphologisch durch unregelmäßig geformte Zellkörper mit langen Dendriten gekennzeichnet, die zur Ausbildung eines verzweigten Zellnetzwerks beitragen (Steinman et al., 1973). Sie gehören zu den wichtigsten Antigen-präsentierenden Zellen (APC`s) des Immunsystems und sind als Bindeglied zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunabwehr maßgeblich an der Regulation vieler immunologischer Prozesse beteiligt (Steinman et al., 1973; Banchereau et al., 1998; Katsnelson, 2006). Die Fähigkeit der DC`s ein breites Spektrum an Antigenen bereits im nanomolaren Bereich zu erkennen, aufzunehmen und zu prozessieren, verleiht ihnen unter den APC`s (B-Zellen, Makrophagen und Monozyten) die bedeutendste Stellung bei der Einleitung der Immunantwort (Lutz et al., 2002; Steinman et al., 2007; Burgdorf et al., 2008).

Vom Knochenmark ausgehend gelangen die DC-Vorläuferzellen über die Blutbahn in die Peripherie des Körpers. Dort siedeln sie sich bevorzugt an besonders stark von der Antigenexposition betroffenen Körperregionen wie der Haut an. Im unreifen Status als Wächter des Immunsystems positioniert tasten die DC`s ihre Umgebung nach möglichen Antigenen kontinuierlich ab und können diese aufgrund ihrer ausgeprägten Fähigkeit zur Endozytose aufnehmen. Dabei stehen den unreifen DC`s Mechanismen wie Makropinozytose, Phagozytose und Rezeptor-vermittelte Endozytose zur Verfügung, welche eine effektive Erkennung sowie Aufnahme von körperfremden Substanzen erlauben. Durch diesen immunologischen Stimulus durchlaufen die unreifen DC`s einem kontinuierlichen Reifungsprozess. Dabei findet eine Umwandlung der Antigen-aufnehmenden zu Antigen-präsentierenden, reifen DC`s statt und schafft somit die nötige Voraussetzung für die erfolgreiche Aktivierung von T-Lymphozyten (Banchereau et al., 2003). Es tritt dabei in erster Linie die Hochregulation der ko-stimulatorischen Moleküle sowie der Chemokinrezeptoren auf, eine Erniedrigung der Endozytoserate und die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine. In diesem Zustand kann die in der Peripherie aktivierte DC in die sekundären Lymphorgane einwandern. Die dort angesiedelten naiven T-Zellen stellen dabei den wichtigsten Kommunikationspartner für die eingewanderten DC`s dar und differenzieren im Zuge der Präsentation der aufgenommenen und prozessierten Antigene zu T-Effektorzellen.

Diese können im nächsten Schritt eine effiziente Beseitigung der entsprechenden Antigene einleiten (Satthaporn et al., 2001; Steinman, 2003). Neben der Beteiligung der DC`s an der immunologischen Abwehr der Fremdartigene tragen diese auch maßgeblich zur immunologischen Toleranz bei. Die Aktivierung der naiven T-Zellen kann neben der Induktion der T-Effektorzellen auch zur Bildung von regulatorischen T-Zellen führen, die eine immunsuppressive Wirkung gegenüber bestimmten Antigenen entfalten. Die Prägung solcher regulatorischer T-Zellen wird hauptsächlich durch unreife DC`s vermittelt (Manicassamy et al., 2011). Der essentielle Schritt für die Entfaltung der möglichen stimulierenden als auch inhibierenden Wirkung der DC`s ist die Aufnahme der entsprechenden Antigene. Somit besitzt dieser initiale Prozess eine Schlüsselfunktion für das Auslösen der nachgeschalteten immunologischen Signalkaskaden.

### 1.1.1 Ontogenese und DC-Subtypen

DC`s stellen eine heterogene Gruppe der APC`s dar, die in Abhängigkeit von ihren Eigenschaften in lymphatischen Organen und peripheren Geweben vorkommen. Alle DC-Subtypen haben ihren Ursprung in den pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks, die zunächst zu den zwei Stammzelltypen, der lymphoiden und der myeloiden Vorläuferzelle, differenzieren (Liu, 2001; Belz et al., 2012). Angesichts der funktionellen und phänotypischen Gemeinsamkeiten mit den beiden APC`s, Monozyten und Makrophagen, wurden die DC`s lange Zeit der myeloiden Quelle zugeordnet. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch von den lymphoiden Vorläuferzellen ausgehend die Bildung von DC`s im Rahmen der physiologischen Prozesse stattfindet (Vremec et al., 1992; Wu et al., 1996; Anjuere et al., 1999). Des Weiteren wird die Komplexität des Ursprungs der einzelnen DC-Subtypen durch Untersuchungen verdeutlicht, bei denen aus Vorläuferzellen myeloider als auch lymphoider Herkunft gleichsam lymphoide und myeloide DC`s gebildet werden können (Martin et al., 2000; Manz et al., 2001).

Die Einordnung der DC`s in Subtypen ist sehr diffizil und kann nach mehreren Kriterien erfolgen. Die Abstammung betrachtend unterscheidet man in den murinen sekundären lymphatischen Organen die klassischen und die plasmazytoiden DC`s. Letztere machen die kleinste DC-Population aus und zeichnen sich durch die Produktion von

Interferon (INF)  $\alpha$  nach einer viralen Infektion aus. Ein Unterscheidungsmerkmal gegenüber den klassischen DC`s ist das Vorhandensein des B-Zell-spezifischen Markers B220 und eine schwächere Expression des CD11c-Integrins (Segura et al., 2009). Die größte DC-Population im sekundären lymphatischen Gewebe stellen die klassischen DC`s dar. Diese zeigen eine hohe Expression an CD11c- bzw. MHC II-Oberflächenproteinen und können in residierende sowie migratorische DC`s eingeteilt werden. Die residierenden DC`s sind in allen lymphatischen Organen wie Thymus, Milz, Lymphknoten und Payerschen Plaques repräsentiert. Aufgrund der Expressionsmuster der beiden Glykoproteine CD4 und CD8 werden die residierenden DC`s in drei Gruppen eingeteilt: CD4-positive DC`s, CD8-positive DC`s und CD4/CD8-negative DC`s. Migratorische DC`s durchwandern im Gegensatz zu den residierenden DC`s das Gewebe und nehmen kontinuierlich Antigene auf. Diese können nach erfolgter Migration der DC`s in den sekundären lymphatischen Gewebe präsentiert werden. Angesichts der Oberflächenmarkerexpression lassen sich die migratorischen DC`s in drei Gruppen einordnen: CD11b DC`s, CD103 DC`s und Langerhanszellen (LC`s). Die beschriebene Einteilung der einzelnen DC-Subtypen ist in Tab. 1.1.1 dargestellt (Vremec et al., 2000; Shortman et al., 2007; Villadangos et al., 2007; Liu et al., 2010).

Die bereits 1868 durch Paul Langerhans entdeckten LC`s stellen den Prototypen der DC`s dar. Das Charakteristikum dieses Zelltyps ist das Vorhandensein des Oberflächenproteins E-Cadherin sowie des Langerin-Rezeptors, welcher bei der Antigenaufnahme involviert und mit Birbeck Granula assoziiert ist. Interessanterweise konnten die tennisförmigen Birbeck Granula bisher ausschließlich in LC`s identifiziert werden. Eine weitere Besonderheit ist die Tatsache, dass die LC`s bislang nur in Lymphknoten nachgewiesen werden können, welche sich in direkter Nachbarschaft zur Haut befinden. Im unreifen Zustand in der Epidermis lokalisiert übernehmen sie die Aufgabe der immunologischen Wächter der Haut. Dabei bilden sie die erste Antigen-Kontaktstelle und können somit die Immunantwort einleiten bzw. bei einer gestörten Homöostase an pathologischen Prozessen wie der Atopischen Dermatitis beteiligt sein (Romani et al., 2003; Kaplan et al., 2008).

Abschließend kann festgehalten werden, dass die hohe endozytotische Aktivität der DC`s im unreifen Differenzierungsstatus ein gemeinsames Merkmal aller DC-Subtypen darstellt und eine effektive Antigenaufnahme gewährleisten soll.

**Tab. 1.1.1: Murine DC-Subtypen**

<b>Vorkommen</b>	Milz, Lymphknoten				Lymphknoten, Peripherie		
<b>Subtyp</b>	pDC`s	CD8 <sup>+</sup> DC`s	CD4 <sup>+</sup> DC`s	CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> DC`s	LC`s	CD103 <sup>+</sup> DC`s	CD11b <sup>+</sup> DC`s
		klassische DC`s					
		residierend			migratorisch		
<b>CD11b</b>	-	-	+	+	+	-	+
<b>CD103</b>	-	+	-	-	-	+	-
<b>CD207</b>	-	+	-	-	+	+	-
<b>B220</b>	+	-	-	-	-	-	-

### 1.1.2 Antigenaufnahme und -prozessierung

Die im unreifen Zustand in der Peripherie angesiedelten DC`s besitzen die morphologischen Voraussetzungen, um die durch Körperbarrieren eingedrungenen Antigene aufzunehmen und diese letztendlich den T-Zellen zu präsentieren. Die Aufnahme der Fremdsbstanzen kann dabei durch die DC`s über verschiedene Wege wie Makropinozytose, Phagozytose oder Rezeptor-vermittelte Endozytose bewerkstelligt werden (Watts et al., 2001). Die Makropinozytose ist durch die Aufnahme extrazellulärer Flüssigkeiten mit den darin gelösten Antigenen gekennzeichnet und wird durch die Organisation der Actinfilamente des Zytoskeletts gesteuert (Lim et al., 2011). DC`s können die Antigene ebenfalls über die hochkonservierten Mustererkennungsrezeptoren (‘pattern recognition receptors’ PRR) wie Toll-like-, Mannose-, Langerin- und Scavenger-Rezeptoren effizient identifizieren und

im Rahmen der Rezeptor-vermittelten Endozytose aufnehmen (Gordon, 2002; McGreal et al., 2005; Benko et al., 2008). Neben dieser direkten Möglichkeit die Antigene zu erkennen, exprimieren die unreifen DC`s auch Fc-Rezeptoren, an die Antigen-Antikörper Immunkomplexe gebunden und aufgenommen werden (Fanger et al., 1996). Einen weiteren Mechanismus der Endozytose stellt die Phagozytose dar, bei der durch Einstülpung und Abschnürung der Zellmembran die Aufnahme von extrazellulären festen Partikeln in die DC`s ermöglicht wird (Nobes et al., 2000). Die Prozedur der über die verschiedenen endozytotischen Wege bereitgestellten Antigene findet in den Endosomen bzw. Lysosomen statt. Zunächst wird das Antigen mit Hilfe endozytotischer Proteasen in Peptidfragmente gespalten, um anschließend an das MHC II-Molekül gekoppelt zu werden. Die im endoplasmatischen Retikulum synthetisierten MHC II- $\alpha\beta$ -Dimere werden zunächst mit dem `Chaperon invariant chain` an der Antigen-Peptidbindungsstelle des Dimers komplexiert. Dies führt zu einer Stabilisierung des MHC II-Komplexes und verhindert eine vorzeitige Aufnahme eines Peptids an die Antigen-Peptidbindungsstelle. Im Anschluss werden die Chaperone in den MHC II-Komplexen gegen Peptidfragmente bzw. Antigenspaltprodukte in den Endosomen bzw. Lysosomen ausgetauscht. Daraufhin findet die Präsentation der mit dem Antigenfragment beladenen MHC II-Moleküle an der Zelloberfläche der DC`s statt (Banchereau et al., 2000). Ein immunologischer Stimulus wie die Antigenaufnahme führt somit in den DC`s zu einer erhöhten Oberflächenexpression der MHC II-Moleküle und kann als ein Kriterium für die Verschiebung des Differenzierungsstatus in Richtung reife DC`s angesehen werden (Pierre et al., 1998). Zusätzlich besitzen DC`s die Fähigkeit, exogene Antigene in Form von MHC I-Peptid-Komplexen an ihrer Zelloberfläche zu präsentieren. Diesbezüglich nehmen sie unter den anderen Zellen eine besondere Stellung ein, die nur endogene Antigene auf MHC I-Molekülen präsentieren können. Dieser Prozess ist besonders bei der immunologischen Abwehr von virusinfizierten oder entarteten Zellen von großer Bedeutung (Segura et al., 2011).

### 1.1.3 Migration und Reifung

Der Kontakt der unreifen DC`s mit dem Antigen führt zu ihrer Mobilisierung und Auswanderung aus der Peripherie in die regionalen Lymphknoten. Dort leitet die Präsentation der aufgenommenen Antigene gegenüber den T-Zellen die spezifische Immunantwort ein. Während der zunächst ablaufenden Migration findet eine phänotypische und funktionelle Veränderung der DC`s statt, welche die nötige Voraussetzung für eine erfolgreiche T-Zell-Aktivierung schafft. Die unreife, Antigen-aufnehmende DC, welche nur eine schwache zelluläre bzw. humorale Immunantwort initiiert, geht in den Antigen-präsentierenden, reifen Zustand über. Erst diese Differenzierung gestattet eine effiziente Induktion von Immunantworten (Aiba et al., 1998; Banchereau et al., 1998; Caux et al., 2000). Sie wird durch mehrere Faktoren wie Antigenerkennung, Balance zwischen pro- und anti- inflammatorischen Zytokinen wie zum Beispiel Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Interleukin (IL) 6, IL10, `Transforming Growth Factor  $\beta$ ` (TGF $\beta$ ) und schließlich Interaktion mit T-Lymphozyten über den CD40 Rezeptor gesteuert (Caux et al., 1994; Jonuleit et al., 1997). Außerdem können neben den exogenen Gefahrensignalen wie Lipopolysaccharid (LPS) als bakterielles Abbauprodukt auch endogene Proteine aus nekrotischen Zellen die Reifung auslösen (Sparwasser et al., 1998; Gallucci et al., 1999). Im Verlaufe dieses Prozesses kommt es zur Reduktion der endozytotischen Aktivität und zu einer ausgeprägten Präsentation der Antigen-MHC II-Komplexe auf der Zelloberfläche der DC`s. Weiterhin findet eine Erhöhung der Oberflächenexpression des DC-Aktivierungsmarkers CD83 und der für die T-Zell-Aktivierung notwendigen Korezeptoren CD40, CD80 und CD86 statt. Im Hinblick auf die Modulation der Aktivierung und der Differenzierung von T-Zellen wird zusätzlich die Ausschüttung verschiedener Zytokine wie zum Beispiel IL12 und IFN $\gamma$  durch die reifen DC`s gesteigert (Cella et al., 1996; Cella et al., 1997; de Jong et al., 2005). Nach der Ausdifferenzierung migrieren die reifen DC`s über afferente Lymphgefäße in die T-Zell-Bereiche der Lymphknoten. Diese essentielle, gerichtete Bewegung der Zellen wird vor allem durch das potente Chemokinsystem, das den membranständigen Rezeptor CCR7 und die beiden Liganden CCL19/CCL21 beinhaltet, realisiert. Chemokine bilden eine Gruppe von Zytokinen, welche die Migration von Zellen mit den entsprechenden Rezeptoren zur Quelle des Chemokinrezeptor-Stimulus bewirken.

Dabei reagieren die DC`s in Abhängigkeit von ihrem Differenzierungsstatus unterschiedlich stark auf verschiedene Chemokine. Während die unreifen DC`s eine sehr schwache CCR7-Chemokinrezeptorexpression aufweisen, nimmt diese mit steigender Differenzierung zu reifen DC`s zu und schafft somit die nötige Voraussetzung für einen Migrationsreiz. Vom peripheren Gewebe zu den Lymphknoten steigende Konzentrationsgradienten an CCL19 und CCL21 bilden dabei als CCR7-Rezeptor-Stimulus die treibende Kraft für die Einwanderung der Antigen-beladenen DC`s in die T-Zell-Areale (Papadopoulos et al., 1999; Robbiani et al., 2000; Forster et al., 2008).

### 1.1.4 Regulation der Immunstimulation

Das lymphatische Gewebe ist durch eine Übergangszone zwischen der Lymphknotenrinde und dem Lymphknotenmark gekennzeichnet, die durch das Vorhandensein vieler naiver T-Zellen geprägt wird. In diesen T-Zell Bereichen der Lymphknoten angekommen treten die mit Antigen beladenen DC`s mit naiven T-Lymphozyten in Kontakt. Dabei führt die Wechselwirkung des Antigens mit spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche der naiven T-Lymphozyten sowohl zu deren Aktivierung als auch klonaler Expansion und löst damit die adaptive Immunantwort aus. Dafür verantwortlich ist eine Vielzahl von Faktoren, wobei zwei voneinander unabhängige Wechselwirkungen zwischen der naiven T-Zelle und der DC von großer Bedeutung sind. Einerseits ist die Interaktion des T-Zell-Rezeptors mit dem an MHC I oder MHC II gekoppelten Fremdantigen von Bedeutung. Auf der anderen Seite wird die Ko-Stimulation durch Oberflächenmoleküle wie CD80, CD86 von Seiten der DC`s sowie CD28 seitens der T-Zellen benötigt. Die anschließend ausgelöste Signaltransduktion in den naiven T-Zellen führt zur Ausschüttung von IL2 (Rescigno et al., 1999; Granucci et al., 2003). Gleichzeitig finden eine Stabilisierung der IL2-mRNA sowie die Expression der IL2-Rezeptor- $\alpha$ -Kette statt, welche die Empfindlichkeit des IL2-Rezeptors gegenüber seinem Liganden erhöht. Als Folge der auto- und parakrinen IL2-Wirkung treten die naiven T-Zellen in die G1-Phase des Zellzyklus ein und proliferieren (Wang et al., 2009; Boyman et al., 2012).

Bei der adaptiven Immunantwort kommt zwei Arten von naiven T-Zellen, den CD4-positiven und den CD8-positiven, eine große Bedeutung zu. Abhängig von der Art der

Zytokine, welche durch die DC`s bei diesem Prozess sezerniert werden, können aus den naiven CD4-positiven T-Zellen drei Subtypen von T-Helferzellen (Th) entstehen (Zhu et al., 2010). Die Anwesenheit des Zytokins IL12 führt in der Regel zur Differenzierung zu Th1-Zellen, die sich ihrerseits durch IFN $\gamma$ -Produktion auszeichnen. Diese fördert vor allem die zelluläre Immunität über die Aktivierung von Makrophagen (Szabo et al., 2003). Der Th1-Immunabwehr wird aus pathologischer Sicht eine Beteiligung an der Entstehung von organspezifischen Autoimmunerkrankungen wie der Multiplen Sklerose zugeschrieben (Batoulis et al., 2011). Die Sekretion von IL4 durch die DC`s ermöglicht die Entwicklung von Th2-Zellen, die die humorale Abwehr begünstigen. Dabei steuert das Th2-Zytokinmuster, hauptsächlich bestehend aus IL4, IL5, IL13, die B-Zellaktivierung und beeinflusst damit entscheidend die Bekämpfung extrazellulärer Antigene (Liao et al., 2011). Im Hinblick auf allergische Reaktionen kann die Wechselwirkung der Th2-Effektorzellen mit den Antikörper-produzierenden B-Zellen die Bildung von Immunglobulin (Ig) E steigern und so die damit verbundenen Krankheiten wie die Atopische Dermatitis fördern (Matsushita et al., 2011). Die Entdeckung eines weiteren Bindungspartners IL12p19 für das Protein IL12p40 führte zur Identifizierung eines zusätzlichen durch die DC`s produzierten Zytokins, das die Th17-Immunantwort fördert. Während IL12p40 und IL12p35 gemeinsam IL12 bilden, welches die Th1-Antwort einleiten kann, erzeugt die Kombination aus den Untereinheiten IL12p40 und IL12p19 das für die Th17-Zellproliferation verantwortliche Zytokin IL23 (Awasthi et al., 2009). Diese T-Zellpopulation ist durch die Produktion von IL17 gekennzeichnet und spielt eine zentrale Rolle bei der Entstehung von vielen Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoide Arthritis oder Psoriasis (Zhu et al., 2012). Neben den verschiedenen CD4-positiven Th-Zellpopulationen spielt auch die Induktion von CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen durch die DC`s eine wichtige Rolle. Aktivierte zytotoxische T-Zellen nehmen vor allem bei der Abwehr viraler Infektionen eine zentrale Stellung ein. Sie sind in der Lage befallene Wirtszellen zu lysieren, bevor diese mit der Produktion infektiöser Partikel beginnen (Segura et al., 2011). Neben den beschriebenen Wechselwirkungen der DC`s mit den T-Zellen kann auch eine direkte Interaktion dieser APC`s mit den B-Lymphozyten beobachtet werden. Dabei fördern die DC`s unter Beteiligung von IL12 die Differenzierung der B-Zellen zu IgG-produzierenden Plasmazellen und tragen damit maßgeblich zur Induktion der humoralen Immunantwort bei (Dubois et al., 1998).

### 1.1.5 Regulation der Immuntoleranz

Die Homöostase des Immunsystems beinhaltet neben der Induktion von Immunantworten auch Kontrollmechanismen, die den Körper vor immunologischen Überreaktionen gegenüber Selbstantigenen bzw. unschädlichen Umwelteinflüssen schützen sollen. Dabei nehmen die DC`s bei der Einleitung und Aufrechterhaltung der sowohl zentralen als auch der peripheren Toleranz eine essentielle Rolle ein (Manicassamy et al., 2011). Im Rahmen der zentralen Toleranz findet im Thymus eine positive und negative Selektion der T-Zellen statt (Kyewski et al., 2006). Bei diesem Prozess kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen den T-Zellen und Selbstantigen-MHC-Komplexen auf den DC`s. Dabei werden die T-Zellen deletiert, deren Rezeptoren eine zu hohe Affinität zu den körpereigenen Strukturen haben (Bevan, 2007). Man kann davon ausgehen, dass nicht alle Selbstantigene hinreichend stark im Thymus exprimiert bzw. präsentiert werden, so dass in manchen Fällen einige autoreaktive T-Zellen der zentralen Selektion entkommen (Nossal, 1994). In diesen Fällen übernehmen die peripheren passiven und aktiven Toleranzmechanismen die Aufgabe, eine immunologische Überreaktion zu verhindern. Diese ist nämlich oft mit der Induktion einer Autoimmunerkrankung verbunden. Zu den passiven Regulationsmechanismen gehören die Deletion und Anergie. Im Rahmen der Deletion stellt der `Activation induced cell death` (AICD) die effektivste Signalkaskade dar, um autoreaktive T-Zellen in der Peripherie zu eliminieren. Dabei kommt es über die Interaktion von Fas (CD95) auf den autoreaktiven T-Zellen mit dem Liganden FasL (CD95L) auf der DC zur Einleitung des programmierten Zelltods und folglich zur Deletion der auf diese Weise überstimulierten T-Zellen (Zhang et al., 2004). Eine weitere Möglichkeit eine immunologische Dysregulation zu verhindern, stellt die Anergie dar. Dabei findet eine Wechselwirkung zwischen den T-Zellen und den mit Antigen beladenen DC`s statt, wobei die T-Zellen keine Aktivierung, sondern eine Verschiebung in den Ruhezustand erfahren. Der Grund dafür sind die phänotypischen Eigenschaften der DC`s, welche keine ko-stimulatorischen Moleküle auf der Oberfläche während der Antigenpräsentation exprimieren. Dies führt bei den T-Zellen zu einer unvollständigen T-Zellrezeptor-Aktivierung und folglich zu einer Erhöhung der Expression des Oberflächenmoleküls CTLA-4. Dieser vermittelt inhibitorische Eigenschaften, die unter anderem IL2-Signalwege negativ beeinflussen. Viele der auf diese Weise im anergischen Zustand residierenden T-Zellen werden anschließend

durch Apoptose eliminiert (Chappert et al., 2010). Des Weiteren nimmt die aktive Toleranz in der Peripherie eine zentrale Rolle bei der Verhinderung der Autoimmunität bzw. immunologischer Überreaktionen ein. Dazu zählen die regulatorischen T-Zellen, die sich in natürliche im Thymus entstehende (nTreg) T-Zellen bzw. in der Peripherie induzierte (iTreg), regulatorische T-Zellen gliedern (Lee et al., 2011). Sie vermitteln ihre immunsuppressiven Eigenschaften über die Verhinderung der Aktivierung, Proliferation bzw. Reifung von Th-Zellen, den zytotoxischen T-Zellen, B-Zellen, natürlichen Killerzellen und DC`s. Dies wird vor allem über ihre Fähigkeit gewährleistet, große Mengen an immunsuppressiven Zytokinen wie IL10 oder TGF- $\beta$  zu synthetisieren und in ihrer unmittelbaren Umgebung freizusetzen (Taylor et al., 2006). Im Zusammenhang mit DC`s kann gezeigt werden, dass im reifen bzw. Antigen-beladenen Differenzierungsstatus diese in der Lage sind, die Proliferation der Treg-Zellen zu induzieren und damit die Immuntoleranz zu fördern. Des Weiteren können die DC`s die Bildung von iTreg-Zellen induzieren bzw. sind nach der Aufnahme von Selbstantigenen in der Lage, im Lymphknoten über dort ansässige T-Zellen eine Toleranz zu vermitteln (Smits et al., 2005; Boks et al., 2012; Lutz, 2012). Zusammenfassend stellt die Effizienz der sowohl Antigenprozessierung als auch der Präsentation durch die DC`s bei allen Arten der Immuntoleranz einen der limitierenden Faktoren dar. Der Grund dafür ist die Tatsache, dass diese Mechanismen stark an die kontinuierliche Anwesenheit von Selbstantigenen gebunden sind.

### 1.1.6 Methoden zur Gewinnung von DC`s

Die Isolierung von DC`s in einer für *in vitro* Untersuchungen ausreichenden Ausbeute gestaltet sich schwierig, da diese im peripheren Blut nur marginal vorhanden sind und sie zudem über ein stark eingeschränktes Zellteilungsvermögen verfügen. Aus diesem Grund bedient man sich heutzutage verschiedener *ex vivo* Generierungsmethoden, die eine quantitativ relevante Ausbeute an diesen APC`s ermöglichen. Dabei werden die entsprechenden DC-Vorläuferzellen, deren Gewinnung bzw. Isolierung in ausreichender Menge möglich ist, unter Zusatz von definierten Zytokinen in DC`s transformiert. Bei diesem Prozess spielt der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierende Faktor (GM-CSF) eine entscheidende Rolle, da es einen essentiellen Kulturzusatz für die Differenzierung und das Überleben der auf diese Weise

gewonnenen DC`s darstellt (Zhan et al., 2012). In den vergangenen zehn Jahren wurden verschiedene Protokolle zur *in vitro* Generierung von DC`s etabliert. Die am weitesten verbreiteten Methoden bedienen sich dabei der beiden Vorläuferzellen: Monozyten und CD34-positiven Stammzellen des Knochenmarks. Das Standardverfahren für die Gewinnung von humanen DC`s besteht in der Kultivierung von Monozyten, die im Vorfeld aus dem Blut isoliert werden, in einem GM-CSF- und IL4-haltigen Kulturmedium. Die nach vier bis sechs Tagen unter diesen Bedingungen resultierenden unreifen DC`s lassen sich weiterhin durch die Anwesenheit von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF $\alpha$  oder mikrobiellen Produkten wie LPS zu reifen DC`s differenzieren (Sallusto et al., 1994). Die Knochenmarkzellen, die CD34-positive Stammzellen enthalten, dienen als Quelle für die routinemäßige Gewinnung von murinen Knochenmark-abgeleiteten DC`s (BM-DC`s). Diese werden ebenfalls unter Zusatz von GM-CSF generiert (Scheicher et al., 1992). Die zusätzliche Anwesenheit von TGF $\beta$  ermöglicht dabei die Differenzierung der entsprechenden humanen Vorläuferzellen zu Langerhanszellen (Caux et al., 1999; Zhang et al., 1999).

Neben den aufgeführten *in vivo* Methoden zur DC-Gewinnung werden auch immortalisierte dendritische Zelllinien genutzt (Shortman et al., 2002). Für die *in vitro* Zellkulturuntersuchungen von unreifen DC`s ist dabei die XS52 Zelllinie besonders gut geeignet. Diese besitzt ihren Ursprung in der Epidermis von neugeborenen BALB/c Mäusen und zeigt bei der Kultivierung im GM-CSF-haltigen Medium die Eigenschaften von unreifen, LC-ähnlichen DC`s über mehrere Kulturpassagen. Analog zu den aus der murinen Epidermis isolierten LC`s weisen die XS52 DC`s eine geringe Expression an MHC II- und CD80-Oberflächenmarkern auf. Darüber hinaus sind die XS52 Zellen nur begrenzt dazu in der Lage, naive T-Zellen zu aktivieren, was den Phänotyp von unreifen DC`s beschreibt. Weiterhin besitzen die XS52 Zellen ähnliche morphologische Eigenschaften wie unreife LC`s. Dazu gehört unter anderem die Expression des LC-typischen Markers Cadherin (Xu, Ariizumi, Caceres-Dittmar, et al., 1995; Xu, Ariizumi, Edelbaum, et al., 1995; Xu, Bergstresser, et al., 1995).

## 1.2 Endozytose

Endozytose bezeichnet die Fähigkeit von Zellen, Substanzen aus ihrer unmittelbaren Umgebung in den Intrazellularraum aufzunehmen. Wie in der Abbildung 1.2 dargestellt umfasst sie dabei die biologischen Prozesse der Phagozytose, der Rezeptor-vermittelten Endozytose und der Pinozytose, welche sich über die Art der aufgenommenen Antigene definieren (Doherty et al., 2009). In den DC`s konnte lange Zeit keine endozytische Aktivität nachgewiesen werden, bis an frisch isolierten Zellen gezeigt wurde, dass diese eine ausgeprägte Endozytoserate besitzen. Heute weiß man, dass die hohe Endozytoseaktivität ein typisches Charakteristikum der unreifen DC`s darstellt, die sie zur effektiven Antigenaufnahme befähigt (Inaba et al., 1993; Reis e Sousa et al., 1993; Sallusto et al., 1995). Im Rahmen der Reifung bzw. Differenzierung werden sowohl Phagozytose- als auch die Pinozytoseaktivität herunterreguliert und sind in endgültig ausdifferenzierten DC`s nicht mehr detektierbar. Die Rezeptor-vermittelte Endozytose dagegen kann auch im reifen Differenzierungsstatus weiterhin beobachtet werden (Platt et al., 2010). In Hinblick auf die immunologische Homöostase stellen diese Mechanismen der Antigenaufnahme eine essentielle Eigenschaft der unreifen DC`s dar und sollen im nachfolgenden näher betrachtet werden.

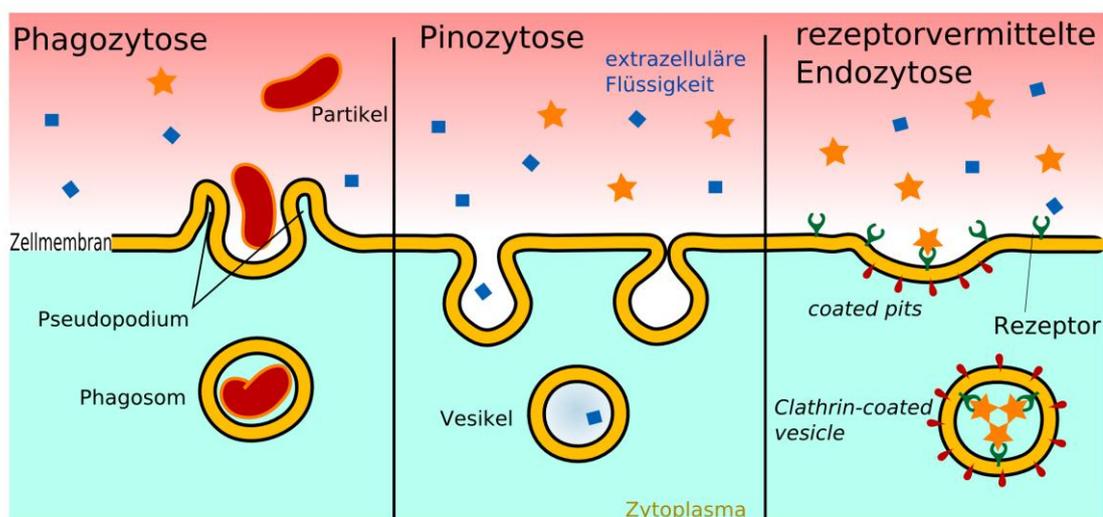


Abb. 1.2: Endozytose-Arten (Villarreal, 2007)

### 1.2.1 Phagozytose

Die Phagozytose stellt einen Mechanismus der Antigenaufnahme dar, der die APC`s dazu befähigt, feste Partikel in sich aufzunehmen. Die auf diesem Wege initiierte Eliminierung von apoptotischen Zellen, Zelltrümmern oder pathogenen Mikroorganismen gehört zwar zum Repertoire der DC`s, spielt jedoch nur eine untergeordnete Rolle im Hinblick auf die Einleitung der Antigen-induzierten Immunantworten (Savina et al., 2007). Vor allem die in den meisten Geweben angesiedelten Makrophagen bedienen sich dieser immunologischen Abwehrprozesse, welche an die Beteiligung bestimmter Oberflächenrezeptoren wie Fc-Rezeptoren, Rezeptoren für Kohlenhydrate und Komplementfaktoren geknüpft sind. Dabei wird die Aufnahme bzw. die Beseitigung der festen Partikel ähnlich wie bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose durch die genannten membranständigen Rezeptoren vermittelt (Aderem et al., 1999). Die Erkennung von bestimmten Kohlenhydraten auf den Bakterien durch lektinartige Rezeptoren, die Bindung von Vitronektin an die abgestorbenen Zellen oder die Erkennung von gebundenen Komplementfaktoren auf pathogenen Mikroorganismen können die Phagozytose nicht nur einleiten, sondern auch zu deren Steigerung führen. Des Weiteren können die Fc-Rezeptoren die Immunglobuline, mit welchen entartete Zellen oder Pathogene opsoniert werden, identifizieren und im Rahmen der Phagozytose eliminieren (Gordon et al., 1988; Kinet, 1989; Savill et al., 1990). Der initiale Schritt der aktivierten Zellen, der im Anschluss der Antigenerkennung stattfindet, kann aus dem linken Abschnitt der Abbildung 1.2 entnommen werden. Er umfasst die lokale Polymerisation des Aktinzytoskeletts am Ort der Phagozytose und das folglich ablaufende Umschließen des Antigens mit der Zellmembran bzw. den Pseudopodien. Die auf diese Weise entstandenen Phagosomen verschmelzen mit Lysosomen zu Phagolysosomen. Durch die dortige Anwesenheit von speziellen Enzymen können toxische Produkte wie Wasserstoffperoxid, Stickoxid oder Sauerstoffradikale gebildet werden. Diese führen letztendlich zur Zerstörung phagozytierter Partikel (Nicola et al., 2008).

## 1.2.2 Rezeptor-vermittelte Endozytose

Im Gegensatz zur Phagozytose, bei welcher feste Partikel in die Zelle aufgenommen werden, vermittelt die ebenfalls Rezeptor-vermittelte Endozytose die Aufnahme von definierten löslichen Antigenen in die DC`s. Dabei spielt eine Vielzahl an spezifischen Rezeptoren, die bestimmte molekulare Strukturen identifizieren bzw. binden können, eine Schlüsselrolle. Wie im rechten Abschnitt der Abbildung 1.2 dargestellt führt die Bindung der entsprechenden Liganden an die Rezeptoren zu deren Aufnahme über Membraneinschlüsse. Dabei können die Rezeptoren im Rahmen eines `Recyclings` wieder an die Membranoberfläche befördert werden und stehen so den Prozessen wieder zur Verfügung (Platta et al., 2011). Zu den prominentesten Rezeptoren für Endozytose von Antigen-Antikörper-Komplexen in den DC`s zählen die Fc-Rezeptoren. Die selektiven Fc $\gamma$ -Rezeptoren CD32 und CD64 vermitteln dabei die Aufnahme von an IgE bzw. IgG gebundenen Antigenen (Fanger et al., 1996; Fanger et al., 1997; Banki et al., 2003). Weiterhin sind die Toll-like-Rezeptoren (TLR) oder das Oberflächenprotein DEC-205 an der Rezeptor-vermittelten Endozytose beteiligt (Medzhitov, 2001; Bonifaz et al., 2002). Die Erkennung von vielen bakteriellen bzw. mykotischen Bestandteilen, die durch Zuckerreste wie Mannose, n-Acetylglucosamin oder Fucose gekennzeichnet sein können, wird bei den unreifen DC`s über den Mannose-Rezeptor vermittelt. Dieser zu der C-Typ-Lektin-Familie gehörende Rezeptor wurde zuerst auf Alveolarmakrophagen entdeckt, kann jedoch auf weiteren Zelltypen wie Endothelzellen, Muskelzellen, Pigmentzellen der Retina, renalen Mesangium-Zellen und den DC`s identifiziert werden (Stahl et al., 1978; Boyle et al., 1991; Lew et al., 1994; Bijsterbosch et al., 1996; Gazi et al., 2009). Eine Ausnahme bilden die LC`s, bei denen keine Expression des Mannose-Rezeptors nachgewiesen werden kann. Die Erkennung bzw. Bindung der entsprechenden Zuckerreste wird bei den LC`s durch das ebenfalls zu der C-Typ-Lektin-Familie gehörende Langerin bewerkstelligt. Langerin kann sowohl auf der Zelloberfläche als auch intrazellulär in den für LC`s typischen Birbeck Granula nachgewiesen werden und ist wie der Mannose-Rezeptor an der Aufnahme des Endozytosemarkers FITC-Dextran beteiligt (Mommaas et al., 1999; Valladeau et al., 2000). Untersuchungen belegen, dass die Expression von Langerin erst ab dem dritten Tag postnatal nachgewiesen werden kann. Dies trifft ebenfalls für die intrazelluläre Anwesenheit von Birbeck Granula zu (Bellette et al.,

2003). Darüber hinaus kann die Aufnahme der Antigene, für deren Erkennung spezifische Rezeptoren existieren, außer über die beschriebenen Mechanismen auch über die Pinozytose erfolgen. Diese findet nämlich stets gleichzeitig mit der Rezeptor-vermittelten Endozytose statt.

### 1.2.3 Pinozytose

Die überraschend große Vielfalt an pathogenen Strukturen, welche durch die DC`s aufgenommen und prozessiert werden können, lässt sich nicht alleine auf die Mechanismen der Rezeptor-vermittelten Endozytose zurückführen. Im Vergleich zu den T- und B-Zell-Rezeptoren verfügen die entsprechenden Erkennungsprozesse in den DC`s nicht über eine ausreichende genetische Diversität. Daraus resultiert die Notwendigkeit der DC`s, einen weiteren Aufnahmemechanismus für Antigene zu betreiben, der den Einschluss von unspezifischen Stoffen, die sich im Extrazellularraum befinden, erlaubt (Kerr et al., 2009; Lim et al., 2011). Diese Aufgabe wird durch die DC`s im Rahmen der Pinozytose wie im mittleren Abschnitt der Abbildung 1.2 dargestellt bewerkstelligt. Die Pinozytose gliedert sich in Makro- und Mikropinozytose, wobei letztere nur eine untergeordnete Rolle bei der Aufnahme von Antigenen spielt. Bei der in allen Zellen konstitutiv ablaufenden Mikropinozytose wird die extrazelluläre Flüssigkeit durch die Bildung von kleinen ( $0,1\mu\text{m}$ ) Clathrin-umhüllten Vesikeln aufgenommen. Aufgrund der marginalen endozytotischen Kapazität dieses Prozesses findet dabei jedoch keine ausreichende Aufkonzentrierung von Antigenen statt (Watts et al., 1992). Die Makropinozytose hingegen ist wesentlich effizienter als die Mikropinozytose oder andere endozytotische Aufnahmewege. Sie zeichnet sich durch die Aufnahme großer Flüssigkeitsmengen aus, die durch die Ausbildung von großen Zytoskelettvesikeln (bis  $5\mu\text{m}$ ) im Rahmen der dynamischen Reorganisation der Actinfilamente gewährleistet wird. Die Untersuchung der entsprechenden makropinozytotischen Kapazität bei unreifen DC`s zeigt, dass innerhalb einer Stunde Volumina aufgenommen und auf potentielle Antigene untersucht werden können, welche dem Eigenvolumen einer Zelle entsprechen. Dieser hohe Flüssigkeitsdurchsatz erlaubt den unreifen DC`s als „Immunwächter“ ausreichende Mengen an Molekülen eines Antigens aufzunehmen, welches nicht über Rezeptor-vermittelte Prozesse internalisiert werden kann. Die Makropinozytose stellt somit einen

unerlässlichen Bestandteil im Repertoire der Mechanismen zur Antigenaufnahme durch die DC`s dar (Sallusto et al., 1995).

Die Bildung von Makropinosomen, welche die Voraussetzung für diesen Aufnahmeprozess bilden, ist eng mit dem `Membran-ruffling` verbunden. Die Untersuchungen verschiedener Zelltypen hinsichtlich des `Membran-rufflings` zeigen, dass die Aktivität dieser dynamischen Prozesse im `steady state` sehr gering ist. Diese kann aber in Gegenwart von Wachstumsfaktoren oder Phorbolestern deutlich gesteigert werden kann (Grimmer et al., 2002). So zeigt zum Beispiel die epidermale Zelllinie A431 die Formierung von kreisförmigen Membranausstülpungen in Anwesenheit des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF), die in der Ausbildung von Makropinosomen resultiert (West et al., 1989). Die gleichen Ergebnisse können nach der Stimulation der Makrophagen mit dem Makrophagen-Kolonie stimulierenden Faktor (M-CSF) erhalten werden (Racoosin et al., 1992). Die Analyse der Bildung von Makropinosomen in unreifen DC`s resultiert hingegen in der Erkenntnis, dass diese Prozesse ohne Stimulation mit Wachstumsfaktoren oder Phorbolestern kontinuierlich und stark ausgeprägt stattfinden (Sallusto et al., 1995).

Die Beobachtung, dass Phorbolster in manchen Zelltypen die Makropinozytoserate „triggern“, führte zu intensiven Untersuchungen der involvierten Signaltransduktionswege. Dabei rückte vor allem die Analyse der kleinen GTPasen in den Mittelpunkt der Makropinozytoseforschung. Die Mitglieder dieser Proteinfamilie fungieren als molekulare Vermittler in zahlreichen Signaltransduktionsketten der Zelle. Sie übernehmen intrazellulär vielseitige Aufgaben wie die Regulation des Wachstums und der Differenzierung. Darüber hinaus kann eine Beteiligung mehrerer kleiner GTPasen am Aufbau des Zytoskeletts und an der damit verbundenen Modulation der Zellgestalt beobachtet werden. Tatsächlich zeigt die Mikroinjektion der aktivierten GTPase Ras in die Fibroblasten eine verstärkte Bildung von Makropinosomen ohne Beteiligung von Wachstumsfaktoren (Bar-Sagi et al., 1986; Burrige et al., 2004). Bezüglich der DC`s blockiert die Injektion von dominant negativen Formen der GTPase Rac die Makropinozytose in unreifen DC`s. Die Gegenwart von aktiviertem Rac in reifen DC`s führt jedoch nicht dazu, die Aufnahme von Flüssigkeiten wieder zu rekonstruieren. Studien hinsichtlich der GTPase Cdc42 zeigen auf der einen Seite, dass dominant negative DC`s keine Makropinozytose betreiben können und dass dies durch die Mikroinjektion von aktiviertem Cdc42 aufgehoben werden kann. Auf der anderen Seite beeinflusste die Injektion von dominant negativem Cdc42 in die aus der

Milz gewonnenen DC`s die makropinozytotische Aktivität nicht (Garrett et al., 2000; West et al., 2000). Diese Beobachtungen verdeutlichen die komplexe Regulation der makropinozytotischen Prozesse in den DC`s und können zwar die Beteiligung der kleinen GTPasen eindeutig belegen, jedoch nicht exakt charakterisieren. Weiterhin kann die Makropinozytose durch Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-Inhibitoren wie Wortmannin oder LY294002 komplett ausgeschaltet werden. Dabei wird nicht das `Membran ruffling`, sondern nur die Vesikelbildung beeinträchtigt. Ein Nachteil der Verwendung des Inhibitors Wortmannin besteht darin, dass neben der Makropinozytose auch die Phagozytose bzw. Migration der DC`s negativ beeinflusst wird (Araki et al., 1996; Araki et al., 2003). Die Untersuchung von zahlreichen Substanzen hinsichtlich der selektiven Hemmung der Aufnahme von Flüssigkeiten führte zur Identifikation mehrerer potentieller Kandidaten. Die Wirkung dieser Verbindungen ist jedoch stark vom Zelltyp abhängig und erweist sich somit als nachteilig. Die Verwendung von Cytochalasin, eines Modulators der für Makropinozytose essentiellen Aktinpolymerisation, führt ebenfalls zur Hemmung der Makropinozytose als auch der Phagozytose. Die Begründung liegt in den biochemischen Mechanismen der beiden Prozesse, bei denen die durch Cytochalasin beeinflussbare Aktinpolymerisation involviert ist (Racoosin et al., 1989). Der Ansatz, die makropinozytotische Antigenaufnahme über die Beeinflussung des zytoplasmatischen pH-Wertes zu inhibieren, kann durch Amilorid, einen Hemmstoff der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Pumpe, gezeigt werden. Die Analyse der Selektivität des Inhibitors zeigt jedoch, dass die Rezeptor-vermittelte Endozytose ebenfalls gehemmt wird (West et al., 1989). Die Benutzung des Proteinkinase C (PKC)  $\delta$ -Inhibitors Rottlerin resultiert hingegen in einer selektiven Hemmung der Makropinozytose. Dabei ist der dafür verantwortliche Mechanismus unbekannt und kann nicht auf eine Beeinflussung der entsprechenden PKC-Aktivität zurückgeführt werden. Die eingesetzten Konzentrationen des Inhibitors reichen nämlich nicht aus, die PKC $\delta$ -Aktivität zu modulieren. Durch die Verwendung von Rottlerin kann somit analog dem Effekt des PI3K-Inhibitors LY294002 eine Unterbrechung der makropinozytotischen Prozesse in den DC`s selektiv erreicht werden (Sarkar et al., 2005). Neben der Hemmung bzw. Aktivierung der Aufnahme von Flüssigkeiten durch die unreifen DC`s im Rahmen der konstitutiv ablaufenden Makropinozytose spielt die Wahl des entsprechenden Endozytoseindikators eine entscheidende Rolle. Bei der routinemäßigen Verwendung von fluoreszenzmarkiertem Dextran zeigt sich, dass dieser nicht nur über

Makropinozytose, sondern auch im Rahmen der Rezeptor-vermittelten Endozytose aufgenommen werden kann. Um die Aufnahme von Dextran für makropinozytotische Untersuchungen nutzen zu können, muss somit die Internalisierung des Zuckers über den Rezeptor vermindert werden bzw. der jeweilige Anteil ermittelt werden. Dazu bedient man sich eines kompetitiven Antagonisten Mannan, der die Rezeptor-vermittelte Aufnahme von Dextran unterbinden kann (Kato et al., 2000).

### 1.3 Sphingosin-1-Phosphat

Die Klasse der Sphingolipide wurde lange Zeit als ein essentieller Bestandteil der eukariotischen Zellmembran angesehen, der im Zusammenspiel mit Glycerolipiden und Sterolen maßgeblich zu deren Plastizität beiträgt. Die genauere Untersuchung der biochemischen Eigenschaften der verschiedenen Mitglieder dieser Gruppe zeigte jedoch eine Beteiligung bestimmter Sphingolipidderivate an weiteren physiologischen Zellprozessen auf und leitete damit die intensive Erforschung dieser Biomoleküle ein. Obwohl die Struktureigenschaften der einzelnen Mitglieder dieser Klasse durch hohe Komplexität und Diversität gekennzeichnet sind, bildet das Sphingosin ein molekulares Grundgerüst, das bei allen Sphingolipiden als ein gemeinsames Charakteristikum vorliegt. Sphingosin-1-Phosphat (S1P) ist dabei einer der wichtigsten Vertreter dieser Lipidklasse, dessen physiologische Funktion lange Zeit als Zwischenprodukt im Metabolismus des Sphingosins angesehen worden ist. In den letzten Jahren konnte jedoch die Bedeutung von S1P als bioaktiver Regulator multipler zellulärer Prozesse nachgewiesen werden. Die Identifizierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCR), von denen bis heute 5 Subtypen S1P<sub>1</sub>-S1P<sub>5</sub> bekannt sind, untermauert den biochemischen Einfluss von S1P auf eine Vielzahl von physiologischen Vorgängen (Lahiri et al., 2007). S1P kann beispielsweise in die Regulation von Proliferation, Apoptose, Angiogenese, Migration und Immunabwehr involviert sein. Vor allem die Regulation der immunologischen Homöostase durch S1P rückt seit der Entdeckung von FTY720, eines bereits für die humane Anwendung zugelassenen Immunsuppressivums, in den Fokus der intensiven Forschung (Hait et al., 2006; Hannun et al., 2008). Bei FTY720 handelt es sich um einen S1P-Rezeptor Modulator, der in seiner metabolisch aktiven Form an allen S1P-Rezeptoren bis auf den S1P<sub>2</sub>-Rezeptor agonistische Wirkung entfaltet. Dabei wird der S1P<sub>1</sub>-Rezeptor, der für den Austritt der aktivierten T-Zellen aus den Lymphknoten verantwortlich ist, dauerhaft internalisiert. Dies führt zu einer Retention der T-Zell in den Lymphorganen und unterdrückt damit die adaptive Immunantwort (Brinkmann et al., 2002). Die dabei auftretende Immunsuppression unterstreicht die hohe Priorität der S1P-Signalwege in immunologischen Prozessen, was ebenfalls in anderen Immunzellen wie Makrophagen, Mastzellen, B-Zellen aber auch DC`s experimentell belegt werden kann (Spiegel et al., 2011).

### 1.3.1 Biosynthese, Metabolismus und Herkunft von S1P

Die biochemischen Mechanismen der Biosynthese von S1P waren lange Zeit der Gegenstand intensiver Forschung und sind mittlerweile ausführlich analysiert worden (Abb. 1.3.1). Die intrazelluläre Bildung von Sphingosin als gemeinsamer Baustein aller Sphingolipide kann sowohl direkt durch *de novo* Synthese als auch durch den Abbau von zellulären Membransphingolipiden im Rahmen des `Recycling Pathways` erfolgen. Bei der *de novo* Produktion der einzelnen Sphingolipide übernimmt die zytosolische Seite des endoplasmatischen Retikulums den Reaktionsstartpunkt. Wie dem obersten Abschnitt der Abbildung 1.3.1 zu entnehmen ist, findet im ersten Schritt der Katalyse eine Kondensation von Serin und Palmitoyl-CoA durch die Serinpalmitoyltransferase statt. Die anschließende Reduktion des entstandenen 3-Ketosphinganins zu Dihydrosphingosin liefert die Ausgangsverbindung für die Sphinganin N-Acyltransferase. Die nach der N-Acylierung gebildeten Dihydroceramide werden im Zuge der Einführung einer trans-4,5-Doppelbindung durch die Dihydroceramid-Desaturase zu den entsprechenden Ceramiden oxidiert. Diese dienen als Quelle für die Biosynthese weiterer Sphingolipide, können allerdings selbst eine zentrale Rolle bei der Steuerung von zellulären Vorgängen wie zum Beispiel der Apoptose einnehmen. Einerseits können die Ceramide zu Glykosphingolipiden, Ceramid-1-Phosphat oder zu dem Membranlipid Sphingomyelin umgesetzt werden. Andererseits bilden sie das Substrat für die Ceramidasen, die anhand ihrer pH-Optima in alkalische, neutrale und saure Subtypen eingeteilt werden. Das bei dieser Reaktion entstehende Sphingosin liefert dabei die Ausgangssubstanz für die S1P-Biosynthese. Die über den `Recycling Pathway` ablaufende S1P-Biosynthese, die ebenfalls in dem essentiellen Ausgangsmolekül Sphingosin mündet, greift auf das membrangebundene Sphingomyelin als Startermolekül zurück. Wie im mittleren Abschnitt der Abbildung 1.3.1 dargestellt findet dabei die Umsetzung des Sphingomyelins zu dem entsprechenden Ceramid durch die Sphingomyelinase statt, welches anschließend in der durch Ceramidasen katalysierten Reaktion zu Sphingosin umgewandelt werden kann (Huwiler et al., 2000; Merrill, 2002).

Das auf den beiden Biosynthesewegen entstandene Sphingosin kann im letzten Schritt durch die Sphingosinkinasen (SphK) in S1P umgewandelt werden. Von den zu der Gruppe der Lipidkinasen angehörenden SphK existieren zwei Isoformen SphK1

und SphK2. Diese sind in der Lage, die S1P-Biosynthese über eine Phosphorylierung der primären Hydroxylgruppe am Sphingosin zu vervollständigen (Maceyka et al., 2005; Kihara et al., 2006). Die genetische Deletion der beiden Isoenzyme im Rahmen eines Knock-out-Tiermodells führt zur embryonalen Letalität aufgrund einer gestörten Neuro- und Angiogenese. Dies zeigt die Bedeutung nicht nur der entsprechenden Katalyse, sondern auch die von S1P (Mizugishi et al., 2005). SphK können durch eine große Vielzahl an Wachstumsfaktoren stimuliert werden. Dazu gehören sowohl der EGF, der Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF), der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) als auch andere Faktoren wie TNF- $\alpha$ , Estradiol, Acetylcholin, Lysophosphatidsäure, Thrombin und S1P selbst (Meyer zu Heringdorf et al., 2001; van Koppen et al., 2001; Shu et al., 2002; Pettus et al., 2003; Delon et al., 2004; Duan et al., 2004; Hait et al., 2005; Sukocheva et al., 2006; Niessen et al., 2008). Des Weiteren sind Antigene und bakterielle Bestandteile wie LPS befähigt, die Aktivität der SphK zu steigern (Fischer et al., 2011). Physiologisch gesehen katalysieren die beiden Isoenzyme zwar die gleiche Reaktion, können jedoch aufgrund unterschiedlicher intrazellulärer als auch organspezifischer Expression gegensätzliche Effekte vermitteln. Für die SphK1 kann eine zytosolische Lokalisation nachgewiesen werden, die im Rahmen einer Phosphorylierung eine Translokation Richtung Plasmamembran erfährt. Diese wird vor allem durch die Phosphorylierung der SphK1 an Serin225 realisiert, die durch das intrazelluläre Enzym Phospho-ERK vermittelt werden kann. Das Enzym Phospho-ERK gehört zur Familie der `Mitogen Activated Protein` Kinasen (MAPK), die vor allem im Rahmen der Wirkung von zellulären Wachstumsfaktoren aktiviert werden können (Pitson et al., 2003). Weitere Untersuchungen der Translokationsprozesse der SphK1 belegen, dass die SphK1 aus dem Zytosol in den Extrazellularraum transportiert werden kann (Ansellin et al., 2002). Während die SphK1-Expression überwiegend in Milz, Blut und Lunge nachgewiesen werden kann, findet man die SphK2 vornehmlich in der Leber, dem Gehirn und dem Herzen. Im Gegensatz zu der SphK1 ist die SphK2 zwar auch im Zytosol, vorwiegend jedoch im Nukleus lokalisiert (Siow et al., 2011). Dabei kann für das durch SphK2 im Zellkern gebildete S1P eine direkte Regulation der Aktivität der Histondeacetylase 1 bzw. 2 und eine damit verbundene Beeinflussung der Genexpression nachgewiesen werden (Riccio, 2010).

Wie im unteren Abschnitt der Abbildung 1.3.1 dargestellt wird der Abbau von S1P über zwei verschiedene Wege, einen reversiblen und einen irreversiblen Weg, realisiert. Die

Lipidphosphat-Phosphohydrolasen bzw. die substratspezifischen S1P-Phosphatasen (SPP1 und SPP2) katalysieren dabei die reversible Spaltung des S1P-Moleküls zu Sphingosin, welches dann als Grundgerüstbaustein dem Sphingolipidstoffwechsel wieder zur Verfügung steht. Die Pyridoxalphosphat-abhängige S1P-Lyase führt dagegen zu einer irreversiblen Spaltung des Moleküls in Hexadecenal und Phosphoethanolamin, deren zellphysiologische Bedeutung noch nicht analysiert worden ist (Huwiler et al., 2000). Allerdings kann für die Hemmung der S1P-Lyase mittels des Lebensmittelfarbstoffs 2-Acetyl-4-Tetrahydroxybutylimidazol (THI) eine Retention der Lymphozyten in den Lymphknoten aufgrund eines unphysiologisch veränderten S1P-Spiegels gezeigt werden. Diese Beobachtung führte zur Entwicklung des S1P-Lyase-Hemmstoffs LX2931, der sich bereits in der klinischen Prüfung als Immunsuppressivum befindet. Darüber hinaus verdeutlicht die Immunmodulation, welche durch S1P-Lyase Inhibierung induziert wird, die Bedeutung von den fein abgestimmten S1P-Konzentrationen in Körperflüssigkeiten für den Ablauf bestimmter physiologischer Prozesse (Bagdanoff et al., 2010).

Die höchsten S1P-Konzentrationen werden (200 - 900 nM) unter physiologischen Bedingungen im Plasma bestimmt (Murata et al., 2000). Allerdings kann im humanen Serum ein S1P-Spiegel (400 - 1100 nM) nachgewiesen werden, der auf das während der Thrombozytenaggregation freigesetzte S1P zurückgeführt werden kann. Andere extrazelluläre Flüssigkeiten wie zum Beispiel die Lymphe weisen hingegen eine weitaus geringere S1P-Konzentration (100 nM) auf (Caligan et al., 2000). Dies führt zur Ausbildung eines S1P-Konzentrationsgradienten zwischen dem Blut und der Körperperipherie, der unter anderem für Migrationsvorgänge von Immunzellen wie die der Lymphozyten oder DC's verantwortlich ist (Schwab et al., 2005). Aufgrund der Tatsache, dass die Thrombozyten keine S1P-Lyase exprimieren und deren Aggregation zur Erhöhung des S1P-Serumspiegels führt, wurden diese lange Zeit als Hauptbildungsorte für S1P im Blut angesehen. Die Demonstration der über ein Knock-out-Tiermodell generierten Maus, die frei von Thrombozyten normale S1P-Spiegel im Blut aufweist, schloss diesen Zelltyp als S1P-Quelle jedoch aus. Untersuchungen, bei denen Wildtyp-Erythrozyten einer SphK-Knock-out-Maus appliziert wurden, zeigen eine Normalisierung der S1P-Plasmaspiegel und identifizieren damit eine neue, alternative S1P-Bildungsquelle im Blut. Das Fehlen der beiden S1P-abbauenden Enzyme S1P-Lyase und SPP in den roten Blutkörperchen unterstützt dabei diese Hypothese (Hanel et al., 2007; Ito et al., 2007; Venkataraman et al., 2008).

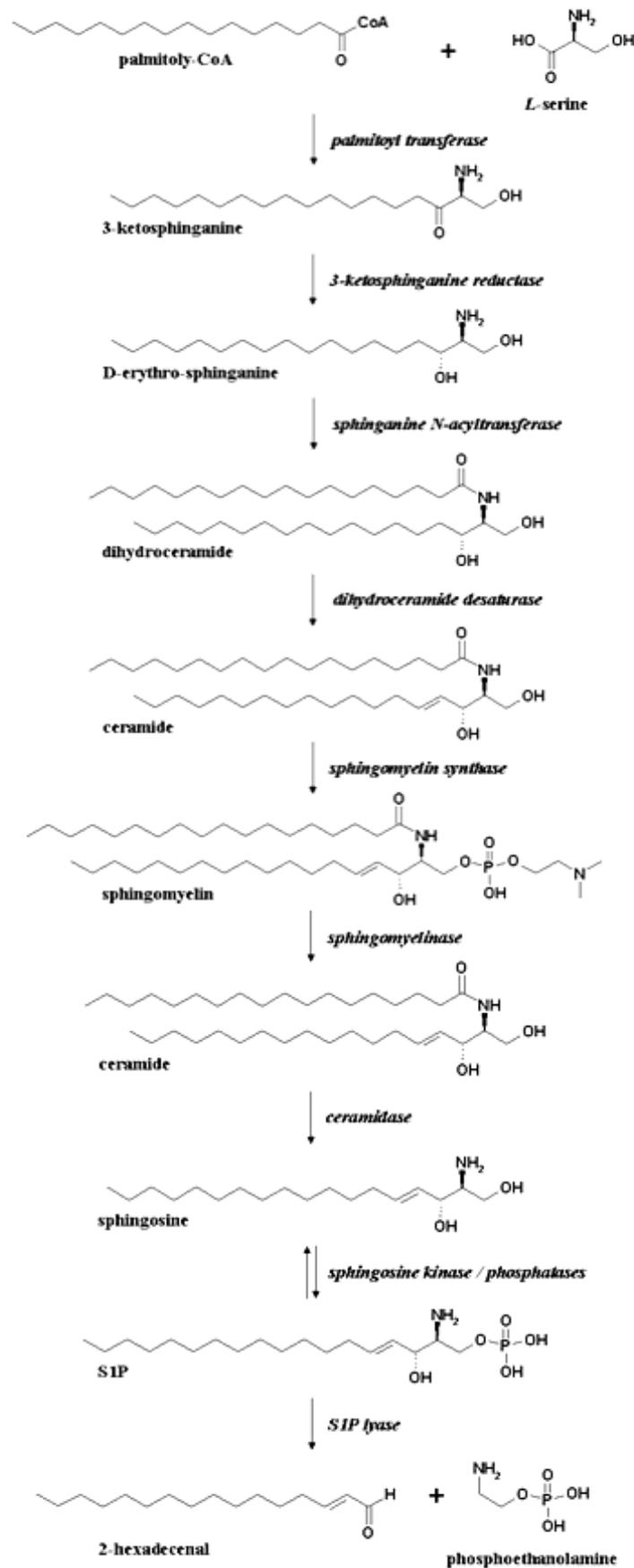


Abb. 1.3.1: Sphingolipid-Rheostat

### 1.3.2 S1P-Signaltransduktion

Die S1P-Signaltransduktion beinhaltet nicht nur intrazelluläre, sondern in erster Linie die extrazellulären und hauptsächlich über membranständige Rezeptoren vermittelten Effekte (Zhang et al., 1991; Takabe et al., 2008). Der im Jahre 1990 erstmals klonierte Rezeptor für S1P wurde aus Endothelzellen isoliert und zunächst nach seiner Funktion als `endothelialer Differenzierungs-gen-Rezeptor 1` (EDG1) bezeichnet. Der Grund dafür war die beobachtete Veränderung der Endothelzellen zu Blutgefäß-ähnlichen Gebilden, die auf eine erhöhte Expression des entsprechenden EDG1-Rezeptors zurückgeführt werden konnte (Hla et al., 1990). Die Bedeutung von EDG1 und weiterer zum damaligen Zeitpunkt entdeckter EDG-Rezeptorsubtypen wurde erst mit der Entdeckung des physiologischen Liganden S1P erkannt. Im Rahmen der Empfehlung von `International Union of Pharmacology` führte die Identifizierung von S1P als Ligand mit der höchsten Affinität zu den entsprechenden EDG-Rezeptoren zu ihrer Umbenennung. Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten fünf S1P-Rezeptorsubtypen, die zu einer Familie von GPCR`s gehören, beschrieben werden: S1P<sub>1</sub> (EDG1), S1P<sub>2</sub> (EDG5), S1P<sub>3</sub> (EDG3), S1P<sub>4</sub> (EDG6) und S1P<sub>5</sub> (EDG8) (An et al., 1998; Hla, 2001). Des Weiteren wurden Rezeptoren wie GPR3, GPR6 und GPR12 identifiziert, an denen S1P als Ligand mit geringer Affinität binden kann. Diese weisen eine Übereinstimmung von 40 % mit den S1P-Rezeptoren in der Aminosäuresequenz auf und sind für die intrazelluläre Calcium-Homöostase verantwortlich (Uhlenbrock et al., 2002).

Die zellspezifische Expression der einzelnen S1P-Rezeptorsubtypen einerseits, sowie die unterschiedliche Kopplung der einzelnen GPCR`s andererseits verleiht dem Signalmolekül S1P eine breite Facette an physiologischen Wirkungen. Während die S1P-Rezeptorsubtypen S1P<sub>1-3</sub> weit verbreitet sind und verstärkt in Gehirn, Herz, Niere, Leber oder Skelettmuskeln exprimiert werden, kann S1P<sub>4</sub> nur in der Lunge und den Zellen des Immunsystems nachgewiesen werden. Die Expression des S1P<sub>5</sub>-Rezeptorsubtyps kann hingegen exklusiv im Gehirn und der Milz beobachtet werden (Rosen et al., 2009). Die Aktivierung unterschiedlicher Signalkaskaden, welche durch S1P ausgelöst werden, begründet sich zusätzlich in den drei G-Protein-Untereinheiten G<sub>i</sub>, G<sub>q</sub> und/oder G<sub>12/13</sub>, die durch die einzelnen S1P-Rezeptorsubtypen bedient werden können. Die G<sub>i</sub>-Kopplung, hemmbar durch Pertussistoxin, kann dabei für alle fünf S1P-Rezeptorsubtypen nachgewiesen werden, stellt jedoch die einzige

bisher bekannte biochemische Signalvermittlung des S1P<sub>1</sub>-Rezeptorsubtyps dar (Aarhi et al., 2011). Die genetische Modifikation der Mäuse, bei der die Expression des S1P<sub>1</sub>-Rezeptorsubtyps unterdrückt wird, ist durch eine Störung der Angiogenese bzw. der Vaskularisierung gekennzeichnet und führt folglich zur embryonalen Letalität. Diese essentielle Bedeutung kann in den zahlreichen Signalwegen, die über den S1P<sub>1</sub>-Rezeptorsubtyp beeinflusst werden, ihre Begründung finden. Dazu gehören die Erhöhung der im nachfolgenden Kapitel näher erörterten PI3K-Aktivität und die proliferationsmodulierende Aktivierung der bereits beschriebenen MAPK ERK. Von den nachgeschalteten Signalwegen der PI3K ist bekannt, dass diese sowohl anti-apoptotische, über Akt-Phosphorylierung vermittelte Wirkung als auch migratorische, über Rac initiierte Effekte vermitteln. Die letzteren spielen vor allem bei der Migration von glatten Muskelzellen und der damit verbundenen Gefäßentwicklung eine entscheidende Rolle (Liu et al., 2000; Liu et al., 2001; Takuwa et al., 2002). Das Ausschalten der S1P<sub>2</sub>-Rezeptorexpression resultiert hingegen in einer gestörten Funktion des Gehör- und Gleichgewichtssinns, was zur Taubheit führt. Des Weiteren sind die entsprechenden Knock-out-Mäuse durch spontan auftretende letale Krämpfe zwischen der 3. und 7. Lebenswoche gekennzeichnet. Der ubiquitär exprimierte S1P<sub>2</sub>-Rezeptorsubtyp kann seine Signale über die Kopplung an alle drei G-Protein-Untereinheiten vermitteln und fungiert als funktioneller Antagonist des S1P<sub>1</sub>-Rezeptors. Dabei findet eine Hemmung der Rac-Aktivierung und der damit verbundenen Migration der Zellen statt. Zusätzlich können eine Aktivierung von ERK bzw. der Phospholipase C aber auch eine Inhibierung der Akt-Phosphorylierung mit der Stimulation des S1P<sub>2</sub>-Rezeptors in Verbindung gebracht werden (Okamoto et al., 2000; MacLennan et al., 2001; Herr et al., 2007; Kono et al., 2007). Der S1P<sub>3</sub>-Rezeptorsubtyp kann ebenfalls die gleichen G-Proteine wie S1P<sub>2</sub> stimulieren, ähnelt jedoch in seinem Signalverhalten dem S1P<sub>1</sub>-Rezeptorsubtyp. So resultiert die Stimulation des S1P<sub>3</sub>-Rezeptors in der Aktivierung der Phospholipase C bzw. ERK sowie in der Erhöhung der PI3K-Aktivität und des damit verbundenen Rac-vermittelten Migrationsverhalten. Des Weiteren kann im Rahmen der Vitalitätsuntersuchungen an Zellkulturen eine Beteiligung der S1P<sub>2</sub>- und S1P<sub>3</sub>-Rezeptorsubtypen an der Regulation der apoptotischen Signalwege beobachtet werden (Ishii et al., 2004; Nofer et al., 2004; Schuppel et al., 2008). Die möglichen, molekularen Effekte der beiden Rezeptoren S1P<sub>4</sub> und S1P<sub>5</sub> rücken immer mehr in den Fokus der Forschung, sind jedoch weitgehend unbekannt. Die Signaltransduktion wird bei beiden Rezeptorsubtypen über

die Kopplungen  $G_i$  und  $G_{12/13}$  realisiert. Die  $S1P_4$ -Rezeptor-Stimulation führt zu einer Aktivierung von ERK aber auch von Phospholipase C und ist in die Regulation des Immunsystems involviert (Graler et al., 2003; Inagaki et al., 2005; Wang et al., 2005; Schulze et al., 2011). Der  $S1P_5$ -Rezeptorsubtyp hingegen entfaltet seine Effekte sowohl über die Hemmung von ERK als auch über die Aktivierung von PI3K und konnte bisher in Verbindung mit Proliferationshemmung und Apoptose gebracht werden. Neue Untersuchungen bestätigen jedoch die Beteiligung des  $S1P_5$ -Rezeptors an der Regulation der natürlichen Killerzellen (Jaillard et al., 2005; Walzer et al., 2007). Vor diesem Hintergrund kann somit von der Beteiligung nicht nur der ubiquitär vorkommenden  $S1P_{1-3}$ , sondern auch der beiden seltener vorkommenden  $S1P_{4-5}$  Rezeptorsubtypen an der Regulation der immunologischen Homöostase ausgegangen werden.

Neben den extrazellulären S1P-Wirkungen, die über die Aktivierung des jeweiligen S1P-Rezeptorsubtyps realisiert werden, sind eine Reihe von intrazellulären physiologischen Effekten dieses Lipidmediators beschrieben worden. Dazu gehören die Regulation der Apoptose, der Proliferation oder des intrazellulären Calciumspiegels (Mattie et al., 1994; Spiegel et al., 2003). Neuere Untersuchungen weisen auch auf die Beteiligung des Sphingolipids bei der Signaltransduktion des Zytokins  $TNF\alpha$  hin, bei der S1P als Kofaktor für das intrazelluläre Adapterprotein TRAF2 agiert (Alvarez et al., 2010). Des Weiteren kann eine Verbindung zwischen der PI3K- und der SphK1-Aktivität gezeigt werden, die über intrazellulär gebildetes S1P vermittelt wird. Dabei kann eine positive Korrelation nachgewiesen werden, wobei die Erhöhung der SphK1-Aktivität bzw. des intrazellulären S1P-Spiegels eine Verstärkung der PI3K-Aktivität zur Folge hat und mit zytoprotektiven Effekten verbunden ist (Guan et al., 2011; Song et al., 2011).

Ein weiterer Aspekt der Signaltransduktion dieses Sphingolipids ist die auto- bzw. parakrine Regulation der Zellhomöostase durch intrazellulär produziertes und anschließend sezerniertes S1P. Die Untersuchungen an Fibroblasten belegen, dass Dexamethason-induzierte Erhöhung der SphK1-Expression und die damit verbundene gesteigerte S1P-Produktion mit einem anti-apoptotischen, über den  $S1P_3$ -Rezeptorsubtyp vermittelten Effekt verbunden ist (Nieuwenhuis et al., 2010). Weiterhin kann gezeigt werden, dass die Erhöhung der intrazellulären S1P-Produktion in Gegenwart von `Insulin-like growth factor 1` (IGF-1) bzw. EGF auf eine gesteigerte Aktivität der SphK1 zurückgeführt werden kann. Diese geht mit einer Sensibilisierung

der Adrenorezeptoren einher, welche über den S1P<sub>1</sub>-Rezeptorsubtyp vermittelt wird (Castillo-Badillo et al., 2012). In Bezug auf die Vertreter des Immunsystems kann eine auto- bzw. parakrine Regulation der Mastzellen durch S1P beobachtet werden. Dabei führt die Aktivierung des IgE-Rezeptors auf den Mastzellen zu einer Steigerung der S1P-Produktion, welches extrazellulär sowohl das Migrationsverhalten über den S1P<sub>1</sub> als auch die Degranulation über den S1P<sub>2</sub>-Rezeptorsubtyp moduliert (Jung et al., 2009). Die beschriebenen regulatorischen Mechanismen sind stets von der erfolgreichen Sekretion des Lipidmediators aus dem Intrazellulär- in den Extrazellulärraum abhängig. Dabei erscheinen passive Mechanismen, die mit einer Passage des Sphingolipids durch die Zellmembran verbunden sind, aufgrund der polaren Phosphatgruppe am S1P als ungeeignet. Die Entdeckung von `ATP binding cassette` (ABC)-Transportern als essentielle Strukturen für den Transport von Lipiden durch die Zellmembran führte zu der intensiven Auseinandersetzung mit dieser Transportoption für die S1P-Homöostase. Mehrere Untersuchungen können dabei tatsächlich die Beteiligung von bestimmten ABC-Transportern an den S1P-Sekretionsprozessen, welche für die auto- und parakrinen Regulationsmechanismen benötigt werden, demonstrieren (Kim et al., 2009).

### 1.3.3 Zellulärer S1P-Transport

Die bereits angedeutete Beteiligung der ABC-Transporter an dem S1P-Export aus dem Zellinneren in den Extrazellulärraum konnte zuerst in Erythrozyten beobachtet werden. Dabei führte die unspezifische Inhibierung mehrerer ATPasen durch Vanadat zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der S1P-Translokation aus den roten Blutkörperchen und rückte damit die Einbeziehung der ABC-Transporter in den Fokus der S1P-Forschung (Kobayashi et al., 2006; Kobayashi et al., 2009). Die Familie der ABC-Transporter, welche zu den integralen Membranproteinen gehört, nimmt eine zentrale Rolle bei den zellulären Transportprozessen von Substanzen wie Proteine, Lipide, Sterole, Schwermetalle oder anorganische Ionen ein. Dabei kann der aktive Transport der Substrate durch die Lipiddoppelschicht der Zellmembran sowohl auswärts als auch einwärts gerichtet sein und ist von der ATP-Hydrolyse als Energielieferant der Zelle abhängig. Im Rahmen des Transportmechanismus führt die Anbindung des Zielmoleküls an die substratspezifische, transmembranäre Domäne

des ABC-Transporters zu einer Aktivierung der Nukleotid-bindenden Domäne, was mit dem Verbrauch von einem ATP-Äquivalent einhergeht. Die dabei stattfindende Änderung der Konformation des ABC-Transporters ermöglicht den Transport des Substrats durch eine kurzfristig gebildete Membranpore. Die Spaltung eines weiteren ATP-Moleküls bringt den ABC-Transporter wieder in den Substrat-bindenden Zustand zurück (Rea et al., 1998; Holland et al., 1999; Biemans-Oldehinkel et al., 2006). Bis zum heutigen Zeitpunkt können sieben verschiedene ABC-Transporter-Familien (A-G) identifiziert werden, wobei eine Beteiligung der Familien ABCA, ABCB, ABCC und ABCG für den S1P-Transport diskutiert wird (Dean et al., 2001; Liu, Zhang, et al., 2012). So zeigen Untersuchungen an der Brustkrebszelllinie MCF-7 die Beteiligung der ABCC1- und ABCG2-Transporter bei der Estradiol-induzierten S1P-Sekretion (Takabe et al., 2010). Weiterhin kann die Beteiligung des ABCC1-Transporters an der S1P-Freisetzung in Fibroblasten, Mastzellen und uterinen Leiomyomzellen nachgewiesen werden (Mitra et al., 2006; Nieuwenhuis et al., 2010; Tanfin et al., 2011). ABCA1 spielt hingegen für die Erythrozyten und Astrozyten hinsichtlich der S1P-Homöostase eine entscheidende Rolle (Sato et al., 2007; Kobayashi et al., 2009).

### **1.3.4 PI3K-Signalweg als S1P-Target**

Die Modulation der PI3K-Aktivität, die im Rahmen der S1P-Signaltransduktion sowohl gesteigert als auch erniedrigt werden kann, ist in viele zelluläre Prozesse involviert. Dazu gehören in erster Linie die Regulation der Proliferation und Apoptose. Dabei ist eine Erniedrigung der PI3K-Enzymaktivität mit einer Steigerung des programmierten Zelltods assoziiert (Hennessy et al., 2005). Des Weiteren kann eine Vielzahl von zellulären PI3K-abhängigen Effekten in Immunzellen beobachtet werden. So führt die Hemmung der PI3K zu einer starken Erniedrigung der Migration von Makrophagen, was bei den Neutrophilen zusätzlich von einer Abschwächung der ROS-abhängigen Erregerabwehr begleitet wird. Die Mastzellen reagieren auf die entsprechende Unterdrückung der Enzymaktivität mit einer reduzierten Degranulation, während bei den T- und B- Lymphozyten ein gestörtes Differenzierungs- und Proliferationsverhalten beobachtet werden kann (Ghigo et al., 2010). Bei den DC`s kann ebenfalls eine PI3K-Abhängigkeit vieler Prozesse wie zum Beispiel die der Zytokinfreisetzung oder Oberflächenexpression bestimmter Differenzierungsmarker festgestellt werden (Di

Caro et al., 2011; Marshall et al., 2012). Im Allgemeinen besteht jedoch in den meisten Fällen der zellulären Untersuchungen eine Korrelation zwischen der PI3K-Aktivität und der Immunabwehr, wobei eine Reduktion der PI3K-Aktivität eine Immunsuppression zur Folge hat.

Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten drei verschiedene PI3K-Klassen identifiziert werden, wobei die Klasse I die am intensivsten untersuchte Enzymgruppe darstellt. Diese umfasst vier verschiedene katalytische Untereinheiten  $p110\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , deren jeweilige Lipidkinase-Aktivität durch die Kopplung mit einer der zwei weiteren regulatorischen Untereinheiten  $p85$  oder  $p101$  reguliert werden kann. Dabei können die Effekte, welche von der PI3K-Klasse I-Aktivität vermittelt werden, in Abhängigkeit von der Art des extrazellulären Signals stark variieren. Dies lässt sich damit begründen, dass die einzelnen Untereinheiten unterschiedlich stark von den verschiedenen Rezeptoren bzw. Signalvermittlern bedient werden (Cantley, 2002; Dituri et al., 2011). So führt die Stimulation von Tyrosin-Kinase-Rezeptoren zu einer Translokation der Untereinheiten  $p110\alpha$  oder  $\delta$  an die Plasmamembran und deren anschließender Aktivierung. Die Signalvermittlung über die Untereinheit  $p110\gamma$  findet hingegen im Rahmen der GPCR-Aktivierung statt (Guillermat-Guibert et al., 2008). Für die Aktivierung der Untereinheit  $p110\beta$  kann eine Beteiligung der beiden oben genannten Rezeptortypen nachgewiesen werden. Neuere Untersuchungen demonstrieren dies auch für die bereits beschriebene Untereinheit  $p110\delta$  (Saudemont et al., 2009). Die übrigen PI3K-Klassen, die monomere Klasse II und die heterodimere Klasse III, besitzen im Gegensatz dazu nur eine untergeordnete Bedeutung für die Regulation der zellulären Homöostase.

Einmal aktiviert katalysiert die PI3K die Phosphorylierung von Phosphoinositiden in der Position 3' des Inositolringes, was in der Entstehung von 3-Phosphoinositiden und vor allem von Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PIP3) resultiert. Die entsprechenden Lipide wie PIP3, die in der Plasmamembran aktiviert wurden, bilden die Andockstellen für eine Vielzahl von Effektorproteinen. In dem Zusammenhang stellt die Pleckstrin-Homologie Domäne auf den Effektorproteinen ein Motiv dar, welches bevorzugt von PIP3 erkannt und gebunden wird. Die Anbindung der Proteine resultiert schließlich in deren Konformationsänderung und eröffnet damit den Weg für deren Aktivierung sowie die damit verbundenen Signale bzw. Effekte (Klippel et al., 1997; Currie et al., 1999; Saito et al., 2001; Milburn et al., 2003). Zu den möglichen Zielproteinen von PIP3 gehört unter anderem die Proteinkinase Akt, die nach der entsprechenden

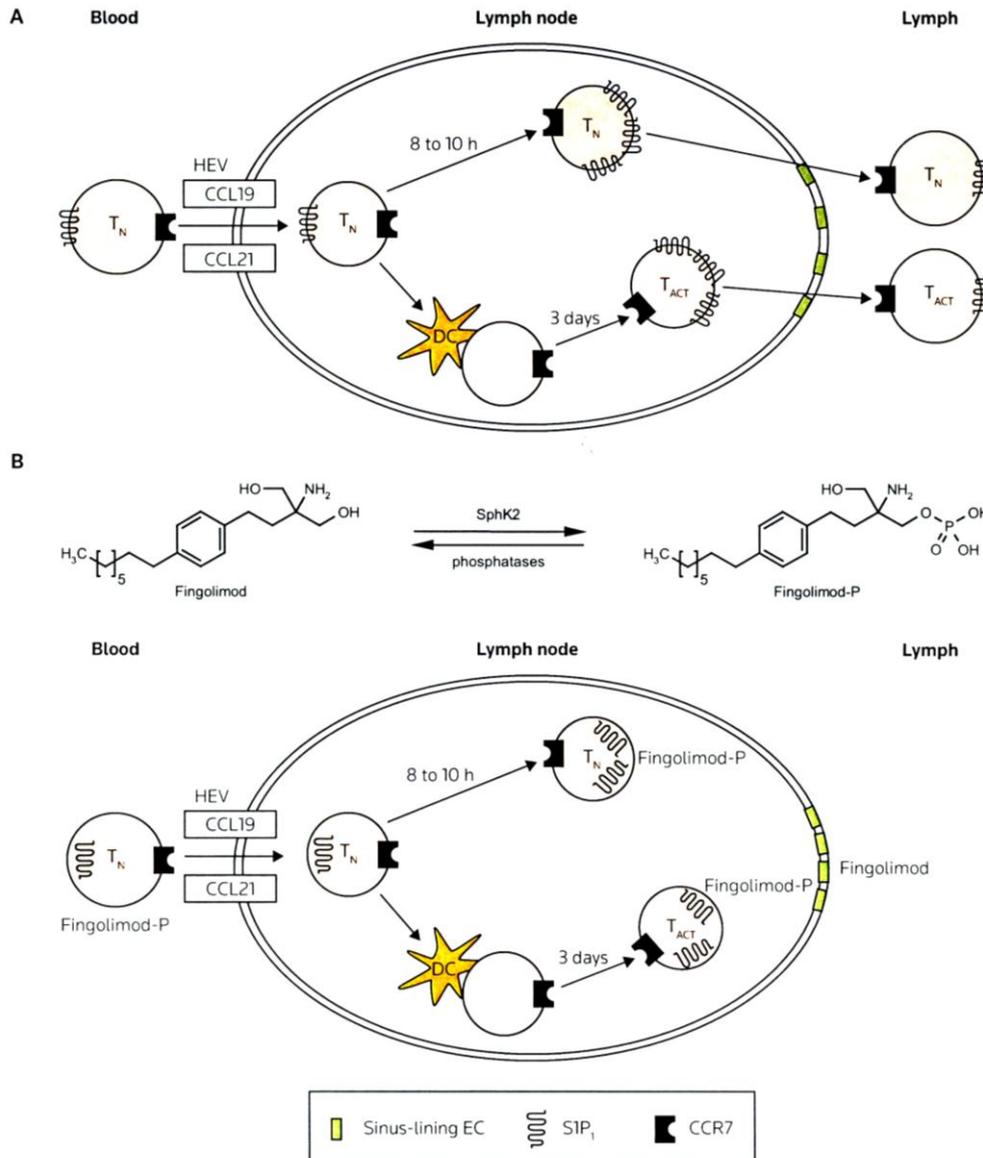
Anbindung im Zuge einer Phosphorylierung an Threonin 308 und Serin 473 aktiviert wird. Die Phosphorylierung von Akt kann somit direkt als ein Indikator für die PI3K-Aktivität einer Zelle verwendet bzw. angesehen werden (Fayard et al., 2005).

### 1.3.5 S1P ein Immunmodulator

S1P fungiert als ein zentraler Regulator in vielen immunologischen Prozessen. Dabei verdeutlicht die Erkenntnis, dass der vor kurzem zugelassene Arzneistoff FTY720 (*Fingolimod*) seine immunsuppressiven Eigenschaften über eine S1P-Rezeptormodulation entfaltet, die außerordentliche Bedeutung dieser Lipidklasse für das Immunsystem. Im Jahre 1992 führte eine chemische Modifikation der aus dem *Ascomyceten Isaria sinclairii* isolierten Natursubstanz Myriocin zur Entdeckung von FTY720, des ersten Vertreters einer neuen Klasse von Immunsuppressiva (Sasaki et al., 1994). Im Gegensatz zu Myriocin, das ebenfalls immunsuppressive Eigenschaften besitzt, zeigt FTY720 jedoch keine Inhibierung der Serinpalmitoyltransferase bzw. der bereits beschriebenen S1P *de novo* Synthese. Wie in der Abbildung 1.3.5 dargestellt führt die physiologische Anwesenheit von FTY720 stattdessen zu einer S1P-Rezeptor-vermittelten Retention von Lymphozyten in sekundären Lymphorganen, wodurch die zelluläre Immunantwort negativ beeinflusst wird (Brinkmann et al., 2002; Mandala et al., 2002; Sanna et al., 2006). FTY720 stellt zunächst ein Prodrug dar, das erst nach einer erfolgten Phosphorylierung durch die SphK2 in seine Wirkform übergeht. In diesem Zustand bindet FTY720-Phosphat (FTY720-P) als Agonist an alle S1P-Rezeptorsubtypen bis auf den S1P<sub>2</sub>. Im Rahmen dieser agonistischen Wirkung wird eine lang anhaltende Internalisierung des S1P<sub>1</sub>-Rezeptorsubtyps hervorgerufen. Dieser, über S1P vermittelte S1P<sub>1</sub>-Rezeptorstimulus, ist für die Wanderung von naiven und aktivierten T-Lymphozyten aus den sekundären Lymphorganen in die Peripherie essentiell und wird im Rahmen der immunsuppressiven FTY720 Wirkung ausgeschaltet (Chun et al., 2011).

Die intensive Auseinandersetzung mit dem Sphingolipid S1P als immunologisches Signalmolekül zeigt neben den Lymphozyten die Modulation weiterer Immunzelltypen wie Mastzellen, Makrophagen, Granulozyten und DC's auf (Martino, 2007; Weigert et al., 2009; Allende et al., 2011; Olivera et al., 2011). Im Rahmen der funktionellen Analyse der DC's in Anwesenheit von S1P kann bisher die Relevanz der

Rezeptorsubtypen S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub>, S1P<sub>3</sub> und S1P<sub>4</sub> postuliert werden. Die Untersuchungen an SphK1-Knock-out-DC`s führt zu dem Ergebnis, dass die LPS-induzierte IL12p70-Produktion, die eine Th1-Immunantwort fördert, im Rahmen einer auto- bzw. parakrinen Regulation über die S1P-S1P<sub>1</sub>-Rezeptorstimulation unterdrückt werden kann (Schroder et al., 2011). Das Fehlen des S1P<sub>4</sub>-Rezeptorsubtyps in den DC`s zeigt dagegen eine Veränderung der Zytokinsekretion, bei der eine Th2-Immunantwort bevorzugt, die Th17-Immunantwort jedoch verhindert wird (Schulze et al., 2011). Darüber hinaus zeigt die Analyse des Migrationsverhaltens der DC`s in Richtung eines S1P-Gradienten eine S1P<sub>1</sub>- und S1P<sub>3</sub>-vermittelte Steigerung bzw. eine S1P<sub>2</sub>-induzierte Hemmung der gerichteten DC-Bewegung (Radeke et al., 2005). Die bisherigen Erkenntnisse über den S1P-Einfluss auf die DC-Homöostase, bei dem essentielle Mechanismen wie die Migration und T-Zellaktivierung von dem Sphingolipid kontrolliert werden, lassen die Modulation weiterer Funktionen im Repertoire dieser APC`s vermuten.



**Abb. 1.3.5: S1P-vermittelte Regulation der T-Zellen** (Japtok et al., 2009) **(A)** Naive T-Lymphozyten ( $T_N$ ) zirkulieren kontinuierlich zwischen dem Blut und dem lymphatischen Gewebe. Der chemotaktische Reiz über die bereits beschriebenen Chemokine CCL19 und CCL21 führt zur Einwanderung der naiven T-Zellen in den Lymphknoten. Die gegenüber dem Blut und der Lymphflüssigkeit niedrigere S1P-Konzentration im Lymphknoten initiiert daraufhin eine Erhöhung der S1P<sub>1</sub>-Rezeptorexpression auf der Oberfläche der naiven T-Zellen und bewirkt damit die Auswanderung der naiven T-Zellen durch die sinusinodiale Endothelzellen (sinus-lining EC) in die efferente Lymphflüssigkeit. Diese Migration wird durch die Stimulation des S1P<sub>1</sub>-Rezeptors realisiert. Findet im Rahmen der Antigenpräsentation durch DC's eine Aktivierung der naiven T-Zellen statt, kommt es zu einer vorübergehenden Herunterregulation des S1P<sub>1</sub>-Rezeptors. Dies verhindert eine vorzeitige Auswanderung der aktivierten T-Zellen ( $T_{ACT}$ ) aus dem Lymphknoten. Am Ende der Aktivierungsphase kommt es zu einer erneuten Hochregulation der S1P<sub>1</sub>-Rezeptoren auf der Oberfläche der aktivierten T-Zellen und folglich zu deren Auswanderung in die Lymphflüssigkeit. **(B)** Im Gegensatz zu S1P führt die Anwesenheit von FTY720-P (Fingolimod-P) zu einer dauerhaften Internalisierung der S1P<sub>1</sub>-Rezeptoren auf den T-Zellen, was in einer Unempfindlichkeit gegenüber dem chemotaktischen S1P-Reiz und damit verbundenem Verbleib im Lymphknoten mündet.

## 1.4 Zielsetzung

S1P stellt einen neuen biologischen Mediator dar, der eine zentrale Rolle bei der Modulation von Immunantworten besitzt. Eine der wichtigsten Aufgaben des Sphingolipids ist dabei die Regulation der Zirkulation von Lymphozyten zwischen Blut, Lymphe und sekundären lymphatischen Geweben. Verantwortlich hierfür ist ein S1P-Konzentrationsgradient mit höchsten S1P-Spiegeln im Blut und niedrigsten S1P-Konzentrationen in den Lymphorganen. Dieser Gradient stellt einen chemotaktischen Reiz für die Lymphozyten dar. Dabei fungiert der S1P<sub>1</sub>-Rezeptorsubtyp als Signalvermittler, welcher die Migration der Lymphozyten aus den lymphatischen Organen über die Lymphe ins Blut initiiert und so die zellulären Immunantworten moduliert. Darüber hinaus zeigen eigene Untersuchungen der Arbeitsgruppe in Kooperation mit der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, dass eine topische Applikation von S1P oder auch von FTY720 eine immunmodulatorische Wirkung im Tiermodell der Atopischen Dermatitis besitzt. Diese lässt sich nicht auf einen systemischen Effekt des S1P zurückführen, sondern kann in der direkten Wirkung des Sphingolipids auf die Immunzellen der Haut begründet werden. Die im Rahmen der tierexperimentellen Atopischen Kontaktdermatitis beobachtete antientzündliche Wirkung von S1P wird dabei auf eine negative Beeinflussung der Migration von DC`s bzw. LC`s in die sekundären lymphatischen Organe und auf ein damit verbundenes Ausbleiben der Lymphozyten-Aktivierung zurückgeführt. Allerdings sind weitere Modulationen der immunologischen Funktion der DC`s oder LC`s denkbar. Im Hinblick auf andere etablierte Immunsuppressiva wie Tacrolimus oder Rapamycin kann ebenfalls eine ähnliche anti-migratorische Wirkung auf die DC`s nach einer topischen Applikation gezeigt werden. Zusätzlich führt jedoch die Anwesenheit von Rapamycin auch zu einer Modulation der Antigenaufnahme durch die APC`s.

Ziel der Arbeit war daher die Untersuchung einer möglichen Beeinflussung der endozytotischen Aktivität der DC`s bzw. LC`s durch das Sphingolipid S1P und die Charakterisierung der dafür verantwortlichen biochemischen Mechanismen. Folgende Aspekte standen dabei im Vordergrund:

- Untersuchung des endozytotischen Verhaltens der unreifen DC`s in Gegenwart von S1P
- Charakterisierung des durch S1P modulierten Endozytosemechanismus
- Analyse des für die S1P-Wirkung verantwortlichen, intrazellulären Signalwegs
- Charakterisierung der an der Endozytosemodulation beteiligten S1P-Rezeptorsubtypen
- Untersuchung der endogenen Endozytoseregulation durch S1P unter Berücksichtigung einer möglichen Beteiligung der SphK1 und der ABC-Transporter

## **2. Material und Methoden**

---

## 2.1 Material

### 2.1.1 Geräte

Autoklav	VarioklavH+P Medizintechnik, Oberschleißheim
Brutschrank	CB-150 Binder, Tuttlingen
ChemiDoc XRS+ System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Einfrierhilfe Mr. Frosty	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Elektrophoresesystem	Mini-PROTEAN 3 Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Flow Cytometer	FACS Canto II BD Biosciences, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop	BZ9000 Keyence, Neu-Isenburg Leica TCS SP5, Wetzlar
Sterilarbeitsbank	Hera-Safe Heraeus, Hanau
Chromatographie	6530 QTOF LC/MS System 1200 Series Agilent Technologies, Böblingen
Magnetrührer	MR3001 Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Neubauer-Zählkammer	Carl Roth, Karlsruhe
PCR-Maschine	LightCycler 480 II Roche Applied Sciences, Mannheim
Phasenkontrast-Mikroskop	Eclipse TS100 Nikon Instruments, Düsseldorf
pH-Meter	ProfiLab pH 597 WTW, Weilheim
Pipetten	Eppendorf Research, Hamburg
Pipettierhilfe	Pipetboy Integra Biosciences GmbH, Fernwald

Vortex	Vortex Genie 2 Scientific Industries, New York, USA
Photometer	Ultrospec 2100 Amersham Biosciences, Freiburg
Reinstwasseranlage	Elix 10 Millipore, Schwalbach
Stromversorgung	Power Pac 1000 Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Thermomixer	Thermomixer comfort Eppendorf, Hamburg
Transfektionsgerät	Neon, Invitrogen Karlsruhe
Trockenschrank	WTB Binder, Tuttlingen
Ultraschallbad	Sonorex RK100H Bandelin, Berlin
Vakuumpumpe	Laboport KNF Neuberger AG, Balterswil Schweiz
Vakuumentrifugen	Centrivac II Heraeus, Hanau Speed Vac SC 210 ARC Thermo Fisher, Dreieich
Vortexmixer	Vortex-Genie 2 Scientific Industries, New York, USA
Waagen	BP211D Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	SUB Universal Water Bath Grant, Cambridge UK
Wippschüttler	RT 45° Fröbel Labortechnik, Schachen PMR-30 Grant, Cambridge UK
Zentrifugen	Biofuge fresco 7500 3325 Heraeus, Hanau Centrifuge 5810R Eppendorf AG, Hamburg

## 2.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Acetonitril	VWR, Darmstadt
Acrylamid Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose (Elektrophorese-Grad)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Agarosegelmarker	New England Biolabs, Frankfurt
Allophycocyanin (APC) anti-mouse	
CD115 Antikörper	eBioscience, Frankfurt
Allophycocyanin (APC) anti-mouse	
MHC class II Antikörper	eBioscience, Frankfurt
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Annexin V- Allophycocyanin (APC)	BD Bioscience, Heidelberg
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
BD Falcon Zellsiebe 40µm	VWR, Darmstadt
Blotfilterpapier	Bio-Rad
	Laboratories GmbH, München
Borsäure	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Bradford-Reagenz RotiQuant	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
C17-Sphingosin-1-Phosphat	AvantiPolarLipids, USA
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
CellWash	BD Bioscience, Heidelberg
Chloroform	VWR, Darmstadt
control siRNA	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Coomassieblau	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Desoxycholinsäure	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Dikaliummonohydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	VWR, Darmstadt
Dihydrosphingosin-1-phosphat	Biomol, Hamburg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	VWR, Darmstadt
DNA Größenmarker	Fermentas, St. Leon-Rot
DNA Ladepuffer (Orange loading dye)	Fermentas, St. Leon-Rot

Dithiothreitol (DTT)	New England Biolabs, Frankfurt
eFluor450 anti-mouse CD11c Antikörper	eBioscience, Frankfurt
Einmalkanülen (Sterican Braun Gr.18)	VWR, Darmstadt
Einmalküvetten, reduziert	VWR, Darmstadt
Einmalspritzen (Braun Injekt 20 ml)	VWR, Darmstadt
Eppendorfgefäße Safe-Lock (0,5, 1,5, 2 ml)	VWR, Darmstadt
Ethanol	VWR, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
FACS Clean	BD Bioscience, Heidelberg
FACS Flow	BD Bioscience, Heidelberg
FACS-Röhrchen	BD Bioscience, Heidelberg
FACS Shutdown Solution	BD Bioscience, Heidelberg
Fetales Kälberserum Superior (FKS)	Biochrom, Berlin
Filterpapier, 10 cm	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
FITC-Dextran, wt 4000	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Fluoromount	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
FTY720-Phosphat	Biomol, Hamburg
Fumitremorgin C	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Glycerol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Glycin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
High-Pure-RNA-Isolation-Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
HRP-gekoppelter Anti-beta Actin-IgG-Antikörper	Abcam, Cambridge UK
HRP-gekoppelter Anti-Rabbit-IgG-Antikörper	New England Biolabs, Frankfurt
Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure (HEPES)	Gibco BRL, Karlsruhe
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) with Glutamax	Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
K6PC-5	NeoPharm, Korea
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf

LightCycler 480® Multiwell Platte 96	Roche Diagnostics, Mannheim
LightCycler 480® Sealing Foil	Roche Diagnostics, Mannheim
Lipopolysaccharides (LPS)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
LumiGlo® Chemilumineszenz Reagenz LY294002	New England Biolabs, Frankfurt Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Magermilchpulver Sucofin	TSI, Zeven
Mannan	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Methanol	VWR, Darmstadt
MK571	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Monoklonaler Akt Antikörper Rabbit	New England Biolabs, Frankfurt
Monoklonaler Phospho Akt (Ser473) XP Antikörper Rabbit	New England Biolabs, Frankfurt
Muriner Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF)	Miltenyi Biotec, Teterow
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumorthovanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Neon Transfection System 100µl Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Parafilm M	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
PcDNA6.2/emGFP Vector	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Pepstatin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Phosphatgepufferte Salzlösung, Ca <sup>2+</sup> - und Mg <sup>2+</sup> -frei	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Phycoerythrin (PE) anti-mouse CD86 Antikörper	eBioscience, Frankfurt
Polyklonaler SphK1-Antikörper Rabbit	New England Biolabs, Frankfurt
Polyvinyliden-difluorid (PVDF)-Transfermembran	Millipore, Eschborn

Ponceau S	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Primer	Eurofins, Ebersberg
Probenecid	Biomol, Hamburg
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Proteingrößenmarker	New England Biolabs, Frankfurt
Rat IgG2a K Isotype Controls Antikörper	eBioscience, Frankfurt
Reversin 121	Santa Cruz, Heidelberg
Revert-Aid -First-Strand-cDNA-Synthesis-Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
Rottlerin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Rundboden-Röhrchen, Falcon	VWR, Darmstadt
Serumalbumin vom Rind, Fettsäure-frei (BSA) SEW2871	Sigma-Aldrich, Schnelldorf Merck Biosciences, Darmstadt
Silikonlösung in Isopropanol	Serva, Heidelberg
Skalpellschneidmesser (25 KGY)	Schreiber GmbH, Fridingen
SKI II	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Sphingosin-1-Phosphat (S1P)	Biomol, Hamburg
S1P <sub>2</sub> Rezeptor siRNA	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Sterilfilter Minisart®, 0,22 µm	Sartorius, Göttingen
Stickstoff, flüssig	Air Liquide, Berlin
Streptomycin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
SYBR Green PCR Master Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
Tetrahydrofuran	VWR, Darmstadt
Trichloressigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris-Base	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Trypanblau-Lösung (0,4%)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypsin	Biochrom, Berlin
Tween 20	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
VPC24191	AvantiPolarLipids, USA
Zellkulturflaschen TPP (25 cm <sup>2</sup> und 75 cm <sup>2</sup> )	Biochrom, Berlin
Zellkulturplatten 6-Loch, Flachboden, TPP	Biochrom, Berlin
Zellkulturschalen TPP, 10 cm	Biochrom, Berlin
Zellkulturschaber	Biochrom, Berlin
Zentrifugenröhrchen TPP (15 und 50 ml)	Biochrom, Berlin

## 2.1.3 Verwendete Lösungen

### 2.1.3.1 Lösungen zur Zellkultivierung

#### **XS52 Wachstumsmedium**

Für die Kultivierung der murinen, dendritischen XS52 Zelllinie wurde XS52 Wachstumsmedium (XS52GM) aus IMDM Glutamax durch Zugabe folgender Substanzen hergestellt:

10 %	hitzeinaktiviertes FKS
10 %	konditioniertes NS47 Medium
100 Einheiten/ml	Penicillin
100 µg/ml	Streptomycin
10 ng/ml	murines GM-CSF

Am Vortag der Versuche fand ein Mediumwechsel auf Antibiotika-haltiges IMDM Glutamax statt. Des Weiteren wurden die siRNA-Experimente in Antibiotika-freiem XS52GM durchgeführt.

#### **NS47 Wachstumsmedium**

Für die Kultivierung der murinen NS47 Fibroblastenzelllinie wurde NS47 Wachstumsmedium (NS47GM) aus IMDM Glutamax durch Zugabe folgender Substanzen hergestellt:

10 %	hitzeinaktiviertes FKS
100 Einheiten/ml	Penicillin
100 µg/ml	Streptomycin

Die Kultivierung der NS47 Zelllinie diente der Gewinnung von konditioniertem NS47 Medium als Bestandteil von XS52GM.

### **BM-DC Wachstumsmedium**

Für die Gewinnung und Kultivierung der BM-DC`s wurde BM-DC Wachstumsmedium (DCGM) aus IMDM Glutamax durch Zugabe folgender Substanzen hergestellt:

10 %	hitzeinaktiviertes FKS
100 Einheiten/ml	Penicillin
100 µg/ml	Streptomycin
20 ng/ml	murines GM-CSF

### **Einfriermedium XS52**

10 %	DMSO
10 %	hitzeinaktiviertes FKS

gelöst in XS52GM

### **Einfriermedium NS47**

10 %	DMSO
10 %	hitzeinaktiviertes FKS

gelöst in NS47GM

### **Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)**

0,2 g/l	KCl
8,0 g/l	NaCl
0,2 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1,44 g/l	NaHPO <sub>4</sub>

gelöst in destilliertem Wasser

### **Stoppmedium**

10 %	FKS
100 Einheiten/ml	Penicillin
100 µg/ml	Streptomycin

gelöst in IMDM Glutamax

### Trypsin-EDTA-Lösung

1,67 mg/ml Trypsin

0,67 mg/ml EDTA

gelöst in PBS

### 2.1.3.2 Lösungen zur Zellyse

#### Erythrozyten Lysepuffer (pH 7,3)

2,25 g NH<sub>4</sub>Cl

0,25 g KHCO<sub>3</sub>

0,93 mg EDTA

gelöst in 250 ml destilliertem Wasser

#### RIPA-Puffer:

50 mM Tris/HCl, pH 7,5

150 mM NaCl

1 % Nonidet P-40

0,5 % Desoxycholinsäure

0,1 % SDS

gelöst in in Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>- freier PBS-Lösung. Unmittelbar vor der Verwendung  
Supplementierung der Lösung mit folgenden Substanzen:

10 mM NaF

1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>

2 µg/ml Aprotinin

10 µg/ml Leupeptin

1 µg/ml Pepstatin

1 mM PMSF

5 mM EDTA

1 mM EGTA

### 2.1.3.3 Lösungen zur Poteinanalytik

#### **Blockpuffer**

5 % Magermilchpulver Sucofin

gelöst in TBST

#### **Blotpuffer**

14,4 g/l Glycin

3,02 g/l Tris HCl

gelöst in destilliertem Wasser

#### **Laufpuffer (pH 8,3)**

14,4 g/l Glycin

3,03 g/l Tris HCl

1 g/l SDS

gelöst in destilliertem Wasser

#### **Ponceau S Lösung**

0,2 % Ponceau S

gelöst in 3 % iger Trichloressigsäure

#### **Probenauftragspuffer nach Laemmli (6-fach)**

1,2 g SDS

6,0 g Glycerol

6 mg Bromphenolblau

0,385 g DTT

gelöst in 2,5 ml Tris-HCl 1,5 M (pH 6,8)

#### **Sammelgellösung zur Herstellung eines 4 % igen Polyacrylamidgels**

6,1 ml destilliertes Wasser

1,3 ml Acrylamid Rotiphorese Gel 30

0,1 ml 10 % SDS in destilliertem Wasser

2,5 ml Sammelgelpuffer

unmittelbar vor dem Gelgießen Zugabe von:

10 µl TEMED

50 µl 10 % Ammoniumpersulfat in destilliertem Wasser

### **Sammelgelpuffer (pH 6,8)**

0,5 M Tris HCl

gelöst in destilliertem Wasser

### **Strip-Puffer**

3,51 g Tris-HCl

0,34 g Tris-Base

3,57 ml Mercaptoethanol

10 g SDS

gelöst in 500 ml destilliertem Wasser

### **TBST-Puffer (pH 7,4)**

20 mM Tris HCl

137 mM NaCl

0,1 % Tween 20

gelöst in destilliertem Wasser

### **Trenngellösung zur Herstellung eines 10 % igen Polyacrylamidgels**

4,1 ml destilliertes Wasser

3,3 ml Acrylamid Rotiphorese® Gel 30

0,1 ml 10 % SDS in destilliertem Wasser

2,5 ml Trenngelpuffer

unmittelbar vor dem Gelgießen Zugabe von:

5 µl TEMED

100 µl 10 % Ammoniumpersulfat in destilliertem Wasser

### **Trenngelpuffer (pH 8,8)**

1,5 M Tris-HCl

gelöst in destilliertem Wasser

### 2.1.3.4 Lösungen zur RNA-Analytik

#### Agarosegel

2 % Agarose (Elektrophoresegrad)

in TBE Puffer unter kochenden Bedingungen gelöst

#### DEPC- Wasser

0,1 % DEPC

über Nacht destilliertem Wasser zugesetzt und anschließend autoklaviert

#### Primer

Für die Polymerase-Ketten-Reaktion wurden Primer der Firma Eurofins (Ebersberg) (Synthesemaßstab: 0,01 µmol, Reinigungsgrad: High Purity Salt Free) mit DEPC-Wasser zu einer Konzentration von 100 µM gelöst. Aus diesen Stammlösungen wurden mit DEPC-Wasser 10 µM Gebrauchslösungen hergestellt.

**Tab. 2.1.3.4A:** Sequenz der Primer für die Real-Time PCR

<b>Zielgen</b>	<b>Vorwärts-Primer</b>	<b>Rückwärts-Primer</b>
ABCB1	5`-AGTGGACCCAACAGTACTCTGAT-3`	5`-GCACCAATCCCGGTGTAATA-3`
ABCC1	5`-GCCCCAGTGTTACTGGTCA-3`	5`-CAAAAAGGTGGCGAGCAG-3`
ABCG2	5`-GCCTTGGAGTACTTTGCATCA-3`	5`-AAATCCGCAGGGTTGTTGTA-3`
GAPDH	5`-CCTCGTCCCGTAGACAAAATG-3`	5`-TGAAGGGGTCGTTGATGGC-3`
HPRT1	5`-TGGATACAGGCCAGACTTTGTT-3`	5`-CAGATTCAACTTGCGCTCATC-3`
S1P1	5`-TTCTCATCTGCTGCTTCATCATCC-3`	5`-GGTCCGAGAGGGCTAGGTTG-3`
S1P2	5`-TACTGGCTATCGTGGCTCTG-3`	5`-ATGGTGACCGTCTTGAGCAG-3`
S1P3	5`-GCGTGTTCCCTTCTGATTGG-3`	5`-GCAAGATGGTAGAGCAGTC-3`
S1P4	5`-CTGTCAGGGACTCGTACC-3`	5`-CGTGAAGAGCAGACTGAAG-3`
S1P5	5`-CCAACAGCTTGCAGCGATCCCC-3`	5`-GGTTGCTACTCCAGGACTGCCG-3`

#### siRNA

Für die Transfektionsversuche wurde siRNA der Firma Sigma (Schnelldorf) mit DEPC-Wasser zu einer Konzentration von 100 µM gelöst.

**Tab. 2.1.3.4B:** Sequenz der siRNA für Transfektionsversuche

<b>Ziel-mRNA</b>		<b>Sequenz</b>
S1P <sub>2</sub>	sense	5`-CGACAUUUCUGGAGGGUAA[dT] [dT]-3`
	anti-sense	5`-UUACCCUCCAGAAAUGUCG[dT] [dT]-3`
S1P <sub>2</sub>	sense	5`-CUCUCUAUGCUAAGCACUA[dT] [dT]-3`
	anti-sense	5`-UAGUGCUUAGCAUAGAGAG[dT] [dT]-3`

### TBE-Puffer (pH 8)

445 mM Tris Base  
445 mM Borsäure  
10 mM EDTA

gelöst in destilliertem Wasser

### 2.1.3.5 Lösungen zur FACS-Analytik

#### Annexin V-Bindungspuffer (pH 7,4)

2,5 mM CaCl<sub>2</sub>  
10 mM HEPES  
140 mM NaCl

gelöst in destilliertem Wasser

#### Cell Staining-Puffer

0,5 % BSA

gelöst in CellWash (0,1 % ige Natriumazid-PBS Lösung)

#### Propidiumiodid-Lösung

20 mg Propidiumiodid

gelöst in 1000 ml destilliertem Wasser

### 2.1.3.6 Lösungen zur fluoreszenzmikroskopischen Analytik

#### Zellfixierungslösung

1 % Paraformaldehyd

gelöst in PBS

#### Zellkern-Färbelösung

100 µg 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)

gelöst in 1 ml destilliertem Wasser

### 2.1.3.7 Lösungen der Testsubstanzen

<b>FITC-Dextran:</b>	1 mg/ml Lösung des Endozytose-Indikators in IMDM Glutamax (immer frisch hergestellt)
<b>FTY720-Phosphat:</b>	1 mM Lösung des S1P-Rezeptormodulators in DMSO
<b>Fumitremorgin C:</b>	10 mM Lösung des ABCG2-Inhibitors in DMSO
<b>K6PC-5:</b>	100 mM Lösung des SphK-Aktivators in DMSO
<b>LY294002:</b>	10 mM Lösung des PI3K-Inhibitors in DMSO
<b>Mannan:</b>	1 mg/ml Lösung des Mannose-Rezeptorantagonisten in IMDM Glutamax (immer frisch hergestellt)
<b>MK571:</b>	10 mM Lösung des ABCC1-Transporter-Hemmstoffs in DMSO
<b>Probenecid:</b>	250 mM Lösung des ABCC-Inhibitors in 1N NaOH
<b>Reversin 121:</b>	10 mM Lösung des ABCB1-Inhibitors in DMSO
<b>Rottlerin:</b>	1 mg/ml Lösung des Makropinozytose-Inhibitors in Wasser
<b>S1P:</b>	500 µM Stammlösung des Lipidmediators in Methanol (Sonifizierung bis Lösungsklarheit); Aliquotierung und Abdampfung der S1P-Stammlösung mit Stickstoff; Lösung des S1P-Feststoffaliquots unmittelbar vor dem Einsatz mit entsprechendem Volumen 0,5 % BSA/PBS Lösung zu einer wässrigen 100 µM S1P-Lösung (15-minütige Sonifizierung der Lösung)
<b>SEW2871:</b>	5 mM Lösung des S1P <sub>1</sub> -Rezeptorantagonisten in DMSO

<b>SKI II:</b>	50 mM Lösung des SphK1-Inhibitors in DMSO
<b>VPC24191:</b>	20 mM Stammlösung des S1P-Rezeptormodulators in DMSO/1N HCl (95:5 V/V); anschließend Verdünnung der Stammlösung mit 3 % BSA/PBS Lösung zu 1 mM Lösung

Wenn nicht anders angegeben erfolgte die Lagerung der gelösten und aliquotierten Substanzen bei -20 °C. Die in dem Experiment benötigten Konzentrationen wurden unmittelbar vor Testbeginn durch Verdünnung im IMDM Glutamax hergestellt. In den Kontrollexperimenten wurden die entsprechenden Lösungsmittelmengen eingesetzt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Methoden zur Gewinnung und Kultivierung der Zellen

#### 2.2.1.1 Kultivierung von XS52 Zellen

Die Kultivierung der murinen unreifen dendritischen Zelllinie XS52 erfolgte in XS52GM bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und mindestens 95 % Luftfeuchte. Es wurden Zellen der Passagen 9 bis 24 für die Experimente eingesetzt. Als Wachstumsfaktor für XS52 Zellen diente neben dem hitzeinaktiviertem FKS das GM-CSF. Die Zugabe des konditionierten NS47 Medium zu XS52GM hatte die Aufgabe, das Ausreifen der XS52 Zellen zu reifen DC`s zu verhindern.

Nachdem die Zellen einen Konfluenzgrad von 80 – 90 % erreichten (üblicherweise nach 3 – 4 Tagen), wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und durch den Einsatz eines Zellschabers von der Kulturflasche durch sanftes Abkratzen im PBS abgelöst. Die Zellen wurden in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt und mit einer Pipette homogenisiert. Nach der Zentrifugation (400 g, 5 min, 4 °C) wurden die Zellen im XS52GM aufgenommen und mit einer Zellzahl von 0,8 – 1 x 10<sup>6</sup> Zellen in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit 15 ml vorgelegtem XS52GM ausgesät.

### **2.2.1.2 Kultivierung von NS47 Zellen**

Die Kultivierung der murinen Fibroblastenzelllinie NS47 erfolgte in NS47GM bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und mindestens 95 % Luftfeuchte und diente der Gewinnung vom konditionierten NS47 Medium. Es wurden Zellen der Passagen 7 bis 15 für die Experimente eingesetzt.

Nachdem die Zellen einen Konfluenzgrad von etwa 85 – 90 % erreichten (üblicherweise nach 3 – 4 Tagen), wurde das konditionierte Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und durch Zusatz von 1,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung bis zum Ablösen im Brutschrank inkubiert. Das Ablösen wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 3,5 ml Stoppmedium beendet. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt und mit einer Pipette homogenisiert. Nach der Zentrifugation (400 g, 5 min, 4 °C) wurden die Zellen in NS47GM aufgenommen und im Verhältnis 1:10 in 35 ml NS47GM in einer 175 cm<sup>2</sup> Schale verbreitert. Die bei der Kultivierung gewonnenen konditionierten NS47 Medien wurden vereinigt, sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

### **2.2.1.3 Gewinnung und Kultivierung von BM-DC**

Die Gewinnung der BM-DC's erfolgte nach der Methode von Lutz (Lutz et al., 1999) aus einem murinen Knochenmark. Der Femur einer C57BL/6 Maus wurde nach sorgfältigem Entfernen des Fells und des umliegenden Fett- und Muskelgewebes für 3 Minuten im 70 % igen Ethanol behandelt. Nach der Überführung des Knochens in PBS und Entfernung der Femurköpfe mit einer Skalpellklinge wurde die Knochenmarkshöhle mittels einer Spritze und Kanüle mit 5 ml PBS ausgespült. Nach der Homogenisierung und der Zentrifugation (400 g, 5 min, 4 °C) der Zellsuspension erfolgte die Inkubation der Knochenmarkszellen in 10 ml Erythrozyten Lysepuffer für 3 Minuten bei Raumtemperatur, um die roten Blutkörperchen zu entfernen. Die Lysereaktion wurde durch Zugabe von 20 ml DCGM (ohne GM-CSF) beendet und die Zellsuspension durch ein Zellsieb (40 µm) gespült, um Gewebereste abzutrennen. Nach der Zentrifugation (400 g, 5 min, 4 °C) wurden die Zellen in PBS aufgenommen. 100 µl der Zellsuspension wurde mit Trypanblau-Lösung (0,2 %) 1:1 gemischt und die Anzahl der vitalen Zellen mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Nach der Zentrifugation (400 g, 5 min, 4 °C) wurden die Zellen mit einer Dichte von  $2,5 \times 10^6$  Zellen/10 ml in DCGM auf einer 10 cm Schale ausgesät (Tag 0). Am Tag 3 wurden weitere 10 ml DCGM der Zellkultur hinzugefügt. Am Tag 6 und 8 wurden 10 ml des Kulturmediums abgenommen, die Zellen daraus abzentrifugiert (400 g, 5 min, 4 °C) und zusammen mit 10 ml frischem DCGM zurück auf die Schale überführt. Am Tag 10 wurden die nicht adhärenen Zellen (BM-DC`s) für die Experimente verwendet.

### 2.2.1.4 Quantifizierung und Einsaat von Zellen

Die Aussaat einer definierten Zellzahl stellt eine benötigte Voraussetzung dar, um optimale Zellkulturbedingungen zu schaffen und um die Reproduzierbarkeit der Experimente zu gewährleisten. Für die Zählung einer Zellsuspension wurde ein Hämozytometer (Neubauer Zählkammer:  $0,0025 \text{ mm}^2/0,1 \text{ mm}$ ) verwendet. Nachdem ein Deckgläschen unter Ausbildung von Newtonringen auf die Zählkammer gedrückt worden war, wurden 10  $\mu\text{l}$  der homogenisierten Zellsuspension in die Kammer gefüllt. Die Neubauer Zählkammer besteht aus neun großen Quadranten, wobei die Zellzahlbestimmung durch Auszählung der vier großen Eckquadranten mittels eines Phasenkontrastmikroskops erfolgte. Der Mittelwert der Einzelwerte multipliziert mit  $10^4$  lieferte die Zellzahl in einem ml der Zellsuspension. So konnten definierte und identische Zellzahlen für die jeweiligen Versuche eingesät werden.

Bei der Gewinnung von BM-DC`s wurden die Knochenmarkszellen vor der Auszählung mittels Trypanblau-Lösung angefärbt. Dieser Vitalitätstest wurde verwendet, um den Anteil vitaler Zellen nach einer möglicherweise traumatischen Prozedur wie das Ausspülen der Zellen aus Knochenmarkhöhle zu bestimmen. Dieser Test stützt sich auf die veränderte Membrandurchlässigkeit abgestorbener Zellen, bei der Farbstoffe, für die die Zellmembran normalerweise nicht durchlässig ist, aufgenommen werden. Vitale Zellen nehmen derartige Farbstoffe wie Trypanblau nicht auf und können im Mikroskop bei der Zählung von den abgestorbenen Zellen abgegrenzt werden.

### **2.2.1.5 Kryopräservierung und Reaktivierung von Zellen**

Die Langzeitlagerung der verwendeten Zelllinien (XS52, NS47) erfolgte durch Aufbewahrung bei -196 °C in flüssigem Stickstoff. Hierzu wurden die jeweiligen Zellen bei einem Konfluenzgrad von 80 – 90 % von der Kulturflasche abgelöst und nach der Zentrifugation (400 g, 5 min, 4 °C) mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in dem jeweiligen Einfriermedium resuspendiert. Jeweils 1,5 ml dieser Zellsuspension wurden in Cryoröhrchen überführt und zunächst für ca. 48 Stunden mittels der Einfrierhilfe Mr. Frosty bei -80 °C aufbewahrt. Anschließend erfolgte die Überführung in flüssigen Stickstoff.

Zur Reaktivierung der Zellen wurde das entsprechende Cryoröhrchen schnell im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Um das zelltoxische DMSO zu entfernen, wurde die Zellsuspension zunächst in das jeweilige vorgewärmte (37 °C) Wachstumsmedium aufgenommen und abzentrifugiert (400 g, 5 min, 4 °C). Anschließend wurden die Zellen in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche, die mit auf 37 °C temperiertem frischem Wachstumsmedium gefüllt war, überführt. Die Anzucht der Zellen bis zum gewünschten Konfluenzgrad erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

## **2.2.2 Methoden zur Proteinanalytik**

### **2.2.2.1 Proteingewinnung durch Zellyse**

Für die Proteingewinnung wurden XS52 Zellen in einer Zelldichte von  $2 \times 10^5$  Zellen pro Zellkultureinheit in einer 6-Loch-Platte eingesät. Nach der jeweiligen Stimulation wurde die Testplatte auf Eis überführt, das Stimulationsmedium abgesaugt und die Zellen zweimal mit 2 ml eiskaltem PBS gewaschen. Nach dem Einleiten der Zellyse durch die Zugabe von 50 µl RIPA Puffers wurde die Zellkulturplatte bei 4 °C für 30 Minuten auf einem Wippschüttler inkubiert. Nach optischer Überprüfung der vollständigen Zellyse mittels eines Phasenkontrastmikroskops wurden die Zellysate in Eppendorfgefäße überführt. Die festen Zellbestandteile der gewonnenen Zellysate

wurden bei 4 °C und 16000 g für 30 Minuten abzentrifugiert und die Überstände direkt zur Proteinbestimmung bzw. Western Blot Analyse eingesetzt.

### **2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Proteinkonzentration der einzelnen Zelllysateüberstände wurde mit Hilfe einer modifizierten Methode nach Bradford gemessen (Bradford 1976) und erlaubte den Einsatz von definierten Proteinmengen bei der Western Blot Analyse. Der im Bradford-Reagenz (RotiQuant) enthaltene Farbstoff Coomassie-Brilliant-B führt bei der Anlagerung an kationische und unpolare Seitenketten der Proteine zu einer Verschiebung des Extinktionsmaximums von 465 nm (rotbraun) zu 595 nm (blau). Die photometrische Messung der Extinktion der Probelösung bei 595 nm ist somit ein Maß für die Proteinkonzentration der isolierten Zelllysate. Zur Quantifizierung der Proteinkonzentrationen wurde zunächst eine Standardgerade mit Hilfe einer BSA-Lösung (1 mg/ml gelöst in destilliertem Wasser) erstellt, indem die Extinktionswerte der BSA-Konzentrationen einer Regressionsanalyse unterzogen wurden. Für die Proteinbestimmung der Proben wurden 5 µl des Zelllysats mit 95 µl destilliertem Wasser und 1 ml Bradford-Reagenz gemischt und 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Aus der sich anschließenden photometrischen Bestimmung des Extinktionwertes bei 595 nm wurde mittels der zuvor erstellten Standardgeraden die Proteinkonzentration der einzelnen Proben ermittelt.

### **2.2.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE stellt ein biochemisches Verfahren dar, mit dessen Hilfe die gewonnenen Zelllysate in die einzelnen Proteinfractionen im elektrischen Feld aufgetrennt werden können. Als Trennmatrix dient ein Gel auf Polyacrylamidbasis, das je nach der gewählten Konzentration des Polymers unterschiedliche Porengröße aufweisen kann. Zusätzlich kommt das anionische Tensid SDS zum Einsatz, das durch Wechselwirkung mit Proteinen ihre Eigenladungen überdeckt, so dass die Proteine eine konstante negative Ladungsverteilung aufweisen und nur nach der Größe aufgetrennt werden.

Vor der Auftrennung der Proteine in einer SDS-PAGE wurden 20 – 40 µg Protein äquivalenten Volumina des Zellysats die entsprechende Menge an Probenauftragspuffer nach Laemmli versetzt. Anschließend erfolgte die Erhitzung dieses Gemisches auf 95 °C im Heizblock für 5 Minuten, um eine vollständige Denaturierung der Proteine und Anlagerung des Tensids zu gewährleisten. Die aufbereiteten Proben und der Proteingrößenmarker wurden in die Geltaschen eines diskontinuierlichen Systems aus Sammel- und Trenngel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte elektrophoretisch bei konstanter Spannung von 200 V und maximaler Stromstärke von 120 mA in einem mit Laufpuffer gefüllten vertikalen Elektrophoresesystem. Das diskontinuierliche Trennsystem unterteilt sich in zwei Abschnitte, ein Sammelgel (4 % iges Polyacrylamidgel) mit Geltaschen oben und ein Trenngel (10 % iges Polyacrylamidgel) unten, um eine scharfe Trennung der Proteinfractionen zu ermöglichen. Das Sammelgel enthält weniger Acrylamid als das Trenngel (nur bis zu 4 %), ist grobporiger und bewirkt, dass die Proteine aus der Geltasche an der Grenze zum Trenngel fokussiert werden. Dies bewirkt, dass die gesamten Proteine der Probe gleichzeitig im Trenngel elektrophoretisch aufgetrennt werden können. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Bromphenolblaubanden des Probenauftragspuffers nach Laemmli den unteren Bereich des Gels erreicht hatten.

### **2.2.2.4 Western Blot und Detektion der Proteine**

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Zellproteine wurden im nächsten Schritt zur Immundetektion aus dem Gel auf eine PVDF-Membran positionsgenau übertragen (geblottet) und immobilisiert. Dazu wurden das proteinhaltige Gel, die mit Methanol aktivierte PVDF-Membran und Blotfilterpapier im Blotpuffer für mindestens 15 Minuten equilibriert und anschließend zu einem Blotsandwich geschichtet. Der Proteintransfer erfolgte bei 90 mA über Nacht in einem mit 1000 ml Blotpuffer befüllten Tank-Blot. Dabei wurde ein zur vorherigen SDS-PAGE senkrecht verlaufendes elektrisches Feld auf das Gel angelegt, das die Wanderung der Proteine Richtung Membran auslöste. Die so erhaltene Membran, der Western Blot, wurde anschließend für den Nachweis, die Lokalisation und Quantifizierung bestimmter Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper verwendet.

Die PVDF-Membran wurde zunächst durch Schwenken in der Ponceau-S-Lösung auf den erfolgreichen Proteintransfer überprüft. Ponceau-S bindet reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine und färbt diese rötlich. Nach der Überprüfung wurde der Blot bis zur Entfärbung mit TBST-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Membranen in der Blocklösung bei 37 °C inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper an der Membran zu verhindern. Nach drei Waschschritten mit TBST-Puffer für jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Membranen mit dem primären Antikörper (1:2000 in TBST verdünnt) behandelt, um die Zielproteine spezifisch zu markieren. Die Inkubation erfolgte für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Wippschüttler. Danach wurde die Membran erneut dreimal mit TBST-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden Meerrettich-Peroxidase (HRP) -gekoppelten Sekundär- bzw. beta-Actin Antikörper (1:2000 in Blocklösung verdünnt) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBST-Puffer erfolgte die Detektion der gebundenen HRP-Antikörper mit Hilfe des LumiGlo® Chemilumineszenz-Reagenzes. Dazu wurde die Membran für 2 Minuten mit Lumineszenzfarbstoff sowie Peroxid-Lösung (jeweils 1:20 Verdünnung) behandelt. Bei dieser Reaktion wird Wasserstoffperoxid durch HRP reduziert, wobei die dafür benötigten Elektronen aus Luminol gewonnen werden. Die dabei entstehenden Luminolradikale bilden ein Luminol-Endoperoxid, welches sofort unter Abstrahlung von Chemilumineszenz zerfällt. Durch den Zusatz von „Enhancern“ wird die Menge des emittierten Lichtes erhöht und zugleich die Emission verlängert. Diese Lumineszenzsignalstärke wurde mit Hilfe des Detektors, ChemiDoc XRS+ System, zu verschiedenen Zeiten erfasst und ausgewertet. Für die Detektion von weiteren Proteinen auf der gleichen Membran wurden die Antikörper durch Inkubation der Membran in 50 ml Strip-Puffer bei 50 °C für 30 Minuten entfernt und einer erneuten Immundetektion unterzogen.

## **2.2.3 Methoden zur RNA-Analytik**

### **2.2.3.1 Isolierung der Zell-RNA für die cDNA-Synthese**

Die Isolierung von mRNA, die nach dem Umschreiben in cDNA und Quantifizieren mittels Real-Time PCR Aussagen über Expressionsstatus von Genen erlaubt, erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen High-Pure-RNA-Isolation-Kit nach den Angaben des Herstellers. Hierzu wurden zunächst  $1 \times 10^6$  XS52 Zellen nach der entsprechenden Stimulation mit PBS gewaschen, in ein Eppendorfgefäß überführt und durch Zugabe von 200 µl PBS und 400 µl Lysis/-Binding Buffer (15 s Vortexen) lysiert. Anschließend wurden die Lysate auf eine Säule, High-Pure-Filter-Tube, überführt und für 15 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert, wobei die Bindung von RNA/DNA an die Säule stattfand. Um die ebenfalls im Säulenfilter gebundene DNA zu eliminieren, wurde der Säulenfilter mit 100 µl einer DNase I-Lösung für 15 Minuten inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die an der Säule gebundene RNA durch jeweilige Zugabe und anschließende Zentrifugation von Wash Buffer I/Wash Buffer II aufgereinigt. Die Gesamt-RNA wurde aus der Säule mit 50 µl Elution Buffer in ein Eppendorfgefäß eluiert. Die Konzentration der nun erhaltenen wässrigen RNA-Lösung wurde mit Hilfe eines Photometers unter Verwendung eines pH-neutralen sterilen 10 mM Tris-HCl-Puffers bestimmt. Dazu wurde jede Probe 1:50 in Tris-HCl-Puffer verdünnt und bei 260 nm und 280 nm vermessen. Zur Überprüfung der Reinheit der isolierten Gesamt-RNA wurde neben der RNA-Konzentration in ng/µl auch der Quotient der Absorption bei 260 nm und 280 nm von dem Photometer berechnet. Um größere Verunreinigungen ausschließen zu können, wurden nur RNA-Proben verwendet, bei denen dieser Quotient einen Wert von 1,8 nicht unterschritt. Die Proben wurden bis zur Transkription in cDNA bei -80 °C gelagert.

### **2.2.3.2 cDNA-Synthese aus mRNA**

Zur Umschreibung von cDNA aus der mRNA wurde das Revert-Aid-First-Strand-cDNA-Synthesis-Kit der Firma Fermentas verwendet. Bei dieser biochemischen Methode wird mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Reverse

Transkriptase) eine Reaktion katalysiert, bei der zu jeder RNA-Matrize ein komplementärer DNA-Strang gebildet wird. Die verwendete M-MuLV Reverse Transkriptase (M-MuLV RT) verfügt über eine geringe RNase-Aktivität und ist somit für die Arbeiten mit RNA besonders gut geeignet. Im ersten Schritt wurden 1 µg RNA äquivalente Volumina der isolierten RNA-Lösung und 1 µl Oligo(dT)18-Primer (0,5 µg/ml) mit DEPC-Wasser zu einem Gesamtvolumen von 12 µl verdünnt und bei 65 °C für 5 Minuten inkubiert. Dieser Schritt dient der Denaturierung der RNA bzw. der Primer und führt in anschließender Abkühlung des Reaktionsgemisches auf 0 °C zur Anlagerung der Primer an die Poly-A-Sequenzen der mRNA, so dass ausschließlich die mRNA aus der Gesamt-RNA der Zelle in cDNA umgeschrieben werden konnte. Im nächsten Schritt wurde der Lösung ein Reaktionsgemisch zusammengesetzt aus 4 µl Reaktionspuffer (20 nM Tris-HCl pH 8,3, 3,75 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 1 µl Ribonuclease-Inhibitors RiboLock™ 20 Einheiten/µl, 2 µl Desoxynukleosidtriphosphaten 10 mM und 1 µl M-MuLV RT (20 Einheiten/µl) hinzugefügt. Die sich anschließende cDNA-Synthese wurde bei 42 °C (optimale Aktivität der reversen Transkriptase) für 60 Minuten durchgeführt und durch Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 70 °C (Zerstörung der reversen Transkriptase) beendet. Die abgekühlten Proben wurden zur Aufbewahrung und späteren Weiterverwendung für Real-Time PCR bei -80 °C eingefroren.

### **2.2.3.3 Relative Quantifizierung der cDNA mittels Real-Time PCR**

Die Real-Time PCR hat sich als Standard-Methode für den Nachweis und die Quantifizierung von DNA bzw. RNA etabliert. Dabei kann die Expression der untersuchten Gene über die in cDNA umgeschriebene totale Menge an mRNA nachgewiesen werden. Die Polymerase-Kettenreaktion besteht aus drei Schritten: der Denaturierung der doppelsträngigen DNA, Anlagerung der Primer an die jeweiligen komplementären DNA-Stränge (Annealing) und Polymerisation neuer DNA-Doppelstränge (Elongation). Durch die Sequenz der Primer werden dabei nur die zu untersuchenden Gene vervielfältigt. Gleichzeitig findet eine Messung der Menge an gebildeten Nukleinsäuren in Echtzeit (‘Real-Time’) statt. Diese Quantifizierung im Verlauf der PCR wird durch die Detektion von Fluoreszenzsignalen am Ende bzw. während eines PCR-Zyklus ermöglicht, deren

Stärke von der Menge an gebildeten DNA-Replikaten abhängt. Die Fluoreszenzsignale entstehen dabei durch die Laser-induzierte Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes und DNA-Interkalators SYBR-Green I. Daher nimmt die entstandene Fluoreszenz proportional zur Menge an gebildetem PCR-Produkt zu und erlaubt die Quantifizierung der entstandenen DNA-Zielsequenz. Für die Amplifikation wurde ein LightCycler480 II der Firma Roche Diagnostics verwendet. In dieser Arbeit wurde mittels Real-Time PCR die basale Genexpression sowie die Veränderungen dieser nach `siRNA Silencing` untersucht. Für jedes Primerpaar wurde im Vorfeld eine Standardkurve mit unterschiedlichen Konzentrationen an der zu amplifizierenden DNA-Sequenz aufgenommen, um die Effizienz, die idealerweise bei 2 liegen sollte, zu bestimmen. Die Amplifikation von 1 µl cDNA fand in einem Reaktionsansatz bestehend aus 0,5 µl der jeweiligen Lösung des Primers (0,5 µM), 5 µl des zweifach konzentrierten SYBR Green Master-Mix und 3 µl RNase-freiem Wasser in einer 96-Loch-Platte statt. Die Real-Time PCR wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt. Initiale Denaturierung für 10 Minuten bei 95 °C, gefolgt von 45 Zyklen: Denaturierung für 10 Sekunden bei 95 °C, Annealing für 10 Sekunden bei 60 °C und Elongation für 10 Sekunden bei 72 °C. Anschließend wurde eine Schmelzkurvenanalyse der gebildeten DNA-Produkte durchgeführt, um die mögliche Bildung von unspezifischen Primerdimeren bzw. die Spezifität der Primer zu kontrollieren. Im Anschluss an die Normalisierung der einzelnen Daten gegen GAPDH und HPRT1 als Referenzgene wurde die relative mRNA-Expression des untersuchten Gens ermittelt.

Neben der Untersuchung des Schmelzverhaltens der bei der Real-Time PCR gebildeten DNA-Produkte wurden die bei der Bestimmung der Primereffizienz entstandenen PCR-Amplikons zusammen mit DNA-Ladepuffer in 2 % igen Agarosegel bei 90 V aufgetrennt. Nach der Ethidiumbromid-Färbung der im Gel aufgetrennten DNA wurde diese im ChemiDoc XRS+ System detektiert. Das Vorhandensein der richtigen DNA-Produktgröße sowie das Fehlen von anderen DNA-Nebenbanden bestätigten die Eignung und Spezifität der Primer.

#### 2.2.3.4 Reduktion der mRNA-Expression mittels siRNA

RNA-Interferenz (RNAi) ermöglicht die Aufklärung von Genfunktionen durch die gezielte Expressionsminderung der Erbinformations-übertragenden mRNA. Sie beruht auf einer Wechselwirkung kurzer Stücke von in die Zelle eingeschleuster siRNA mit der zellulären mRNA unter Beteiligung mehrerer Enzymkomplexe. Dabei kommt es zur Spaltung der mRNA in mehrere Bruchstücke, wodurch die Translation in ein Protein verhindert wird. Eingeschleust in die Zelle bindet die doppelsträngige siRNA zunächst an den Multienzym-Komplex RISC (RNA induced silencing complex). Im ersten Schritt wird der Sense-Strang der siRNA durch RISC-Aktivität zerstört, dessen Sequenz mit der zelleigenen mRNA übereinstimmt. Der Antisense-Strang bleibt an RISC gebunden und kann im nächsten Schritt durch komplementäre Basenpaarung spezifisch an die Ziel-mRNA binden. Dies führt zum Abbau der gebundenen mRNA durch die Nuklease-Untereinheit „Slicer“. Die dabei entstehenden RNA-Bruchstücke werden im Zytoplasma durch die zelleigenen RNAsen weiter degradiert. Für das Einbringen der siRNA in die XS52 Zellen wurde das Transfektionsgerät Neon der Firma Invitrogen verwendet. Bei dieser Methode findet eine Elektroporation der Zellen statt, die die kurzzeitige Zerstörung des Membranpotentials der Zelle durch einen elektrischen Impuls zur Folge hat. Die dabei entstehenden Membranporen ermöglichen die Diffusion der siRNA in das Zytoplasma mit anschließendem Abbau der Ziel-mRNA. Nachdem die XS52 Zellen ein Konfluenzgrad von 70 – 90 % erreicht haben, wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und von der Kulturflasche abgelöst. Nach der Zentrifugation (400 g, 5 min, 4 °C) wurden die XS52 Zellen mit einer Zelldichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml in Resuspension-Buffer/siRNA-Lösung (Endkonzentration siRNA im XS52GM: 100 nM) aufgenommen. 100 µl der Zellsuspension wurden in einer Neon-Pipettenspitze aufgenommen und in den Electrolytic-Buffer der Neon-Pipette-Station eingetaucht. Nach der erfolgreichen elektrischen Impulsauslösung wurde die Zellsuspension aus der Neon-Pipettenspitze in 2 ml vorgewärmtes Antibiotika-freies XS52GM in einer 6-Loch-Platte überführt und im Brutschrank inkubiert. Als Kontrolle diente ein Nukleotidduplex gleicher Größe mit zufälliger Sequenz (control siRNA), der selbst nicht zum Abbau einer bekannten zellulären RNA führt. Die optimalen Einstellungen des Transfektionsgerätes hinsichtlich der Spannung, der Impulsdauer und der

Impulszahl ist zellspezifisch und musste für die XS52 Zelllinie ermittelt werden. 24 Stunden nach der Transfektion der Zellen wurden die entsprechenden Versuche durchgeführt bzw. Proben zur Kontrolle der effektiven Reduktion der mRNA-Expression über Real-Time PCR gewonnen.

### 2.2.4 Methoden zur FACS-Analytik

Durchflusszytometrische Verfahren, auch FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) -Analysen genannt, dienen der quantitativen automatischen Analyse von fluoreszenzmarkierten vereinzelt Zellen. Sie besitzen den Vorteil einer exakten Quantifizierung der betrachteten Markierung und ermöglichen die gleichzeitige Messung mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe bzw. Zelleigenschaften. Zur Analyse werden die Zellen einer Zellsuspension in einem laminaren Flüssigkeitsstrom einzeln an einem gebündelten Laserstrahl vorbeigeleitet. Das Auftreffen der Lichtstrahlen auf die Zellen führt in Abhängigkeit der zellulären Eigenschaften zu einer Lichtstreuung. Das von je einer entsprechend angebrachten Linse gesammelte und photometrisch detektierte Vorwärtsstreulicht (FSC) gibt Auskunft über die Größe einer Zelle, während der Seitwärtsstreulichtdetektor (SSC) deren Granularität erfasst. Anhand dieser Kriterien kann die gewünschte Zellpopulation ausgewählt und auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht werden. Die quantitative Analyse von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen beginnt zunächst mit der Markierung der Zellen mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern bzw. fluoreszierenden Farbstoffen. Im Anschluss findet die Messung der jeweiligen Fluoreszenzintensitäten statt. Die Fluorochrome absorbieren das Laserlicht und reemittieren ein Licht von einer niedrigeren Energie und längeren Wellenlänge (Fluoreszenz), das durch Linsen gesammelt und durch Spiegel bzw. Filter nach Wellenlängenbereichen aufgetrennt und detektiert wird. So können die Signale mehrerer verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe bei der Mehrfarbenanalyse getrennt aufgenommen und quantitativ ausgewertet werden. Dabei ist die Fluoreszenzintensität proportional zur Anzahl der pro Zelle gebundenen Fluorochrome und damit zur Anzahl der untersuchten Zieleigenschaften. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und die spektralen Eigenschaften können der Tabelle 2.2.4 entnommen werden. Mit Hilfe der FACS-Analytik wurde an einem BD

FACS Canto II Zytometer, der über 3 Laser verfügt, neben der Oberflächenexpression von Proteinmarkern auch die Apoptose und die Endozytose von FITC-Dextran gemessen.

**Tab. 2.2.4:** *Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe*

<b>Fluoreszenzfarbstoff</b>	<b>Excitations- maximum (nm)</b>	<b>Emissions- maximum (nm)</b>	<b>Excitations- wellenlänge (nm)</b>
Allophycocyanin (APC)	650	660	633
eFluor450	401	456	405
Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)	494	519	488
Phycoerythrin (PE)	496	578	488
Propidiumiodid (PI)	351	617	488

### **2.2.4.1 Bestimmung der zellulären Oberflächenmoleküle**

Für die Analyse der Oberflächenmoleküle der BM-DC`s und der XS52 Zellen wurden nach der jeweiligen Stimulation  $1-2 \times 10^5$  Zellen zweimal mit je 1 ml Cell Staining-Puffer gewaschen und anschließend mit den entsprechende Fluorochromgekoppelten Antikörpern angefärbt. Dazu wurden die Zellen in einem FACS-Röhrchen in 100 µl des Antikörper-haltigen Cell Staining-Puffers suspendiert und für 30 Minuten bei 4 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurden zwei Waschschrte mit je 1 ml Cell Staining-Puffer pro Röhrchen durchgeführt. Nach dem letzten Waschschrte bzw. der Zentrifugation (400 g, 5 min, 4 °C) und dem Abdekantieren des Überstandes wurden die Zellen in 200 µl Cell Staining-Puffer

resuspendiert. Die Fluoreszenzintensität der markierten Zellen wurde mit dem Durchflusszytometer gemessen und mit dem Programm Flowjo (BD Bioscience, Heidelberg) ausgewertet.

### 2.2.4.2 Bestimmung der Apoptoserate

Zur Detektion apoptotischer und nekrotischer Zellmarker wurden die XS52 Zellen nach der jeweiligen Stimulation mit APC-gekoppelten Annexin V und dem Fluoreszenzfarbstoff PI markiert und anschließend hinsichtlich der Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch analysiert. In der frühen Phase der Apoptose werden Phosphatidylserin-Reste von der Innenseite der Plasmamembran zur Außenseite transloziert, an welche Annexin V spezifisch bindet. Früh-apoptotische Zellen sind nur mit Annexin V anfärbbar, wohingegen spät-apoptotische und nekrotische Zellen durch eine gleichzeitige Färbung mit PI detektierbar sind. Der Grund dafür ist, dass PI nur in Zellen mit durchlässiger Zytoplasmamembran eindringt und in die DNA interkaliert. Es erfolgte auf diese Weise eine Bestimmung der früh- und spät-apoptotischen Zellen. Nach der Überführung des jeweiligen Stimulationsmediums mit den darin enthaltenen Zellen in ein FACS-Röhrchen wurden die anhaftenden Zellen abgelöst und durch Waschen der Kulturplatte mit PBS quantitativ zu dem jeweiligen FACS-Röhrchen hinzugefügt. Nach der anschließenden Zentrifugation (300 g, 5 min, 4 °C) der vereinigten Zellsuspensionen wurden die Zellen mit kaltem Annexin V-Bindungspuffer gewaschen und in 100 µl des frischen Bindungspuffers resuspendiert. Unter Lichtausschluss folgte eine Inkubation der Zellsuspensionen mit APC-gekoppelten Annexin V in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Die Färbereaktion wurde durch die Zugabe von 1 ml Annexin V-Bindungspuffer und anschließende Zentrifugation beendet. Nach dem Resuspendieren der Zellen in 190 µl des frischen Annexin V-Bindungspuffers erfolgte die Zugabe der Propidiumiodid-Lösung in einer Endkonzentration von 1 µg/ml. Die Fluoreszenzintensität der markierten Zellen wurde mit dem Durchflusszytometer gemessen und mit dem Programm Flowjo ausgewertet.

### **2.2.4.3 Bestimmung der FITC-Dextran Endozytoserate**

Zur Quantifizierung der Endozytoseaktivität in den DC`s (BM-DC`s und XS52 Zellen) wurden die Zellen mit FITC-markierten Dextranmolekülen inkubiert und anschließend hinsichtlich der Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch analysiert.  $2 \times 10^5$  XS52 Zellen bzw. BM-DC`s wurden in der Zellkultureinheit einer 6-Loch-Platte bzw. in einem FACS-Röhrchen gegebenenfalls entsprechend vorstimuliert, auf Eis überführt und vom Medium befreit. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml FITC-Dextran-haltiges IMDM Glutamax (1 mg/ml) Medium aufgenommen, welches mit entsprechenden Stimulantien supplementiert wurde und für 15 Minuten bei 37 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Die Aufnahme des FITC-Dextrans wurde durch Überführung der Zellen auf Eis beendet. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit FITC-Dextran bei 4 °C inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen viermal mit je 2 ml eiskaltem CellWash gewaschen und im Durchflusszytometer hinsichtlich der intrazellulären FITC-Dextran-Aufnahme analysiert. Bei der Analyse der BM-DC`s wurden vor der durchflusszytometrischen Endozytosemessung bestimmte Oberflächenmoleküle mittels Antikörper angefärbt, was die eindeutige Identifizierung der zu untersuchenden dendritischen Zellpopulation erlaubte. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe von Flowjo.

### **2.2.5 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen**

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung der veränderten Endozytoseaktivität der DC`s bietet die Fluoreszenzmikroskopie, wobei die aufnahmefähige fluoreszierende Verbindung FITC-Dextran intrazellulär nachgewiesen werden kann. Zur Detektion der Aufnahme des Indikators wurden XS52 Zellen in 6-Loch-Platten mit eingesetzten Deckgläsern in einer Zelldichte von  $5 \times 10^4$  Zellen/Zellkultureinheit ausgesät. Die Zellen wurden analog den durchflusszytometrischen Untersuchungen gegebenenfalls entsprechend vorstimuliert, auf Eis überführt und vom Medium befreit. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml FITC-Dextran-haltiges IMDM Glutamax (1 mg/ml) Medium aufgenommen, das mit entsprechenden Stimulantien supplementiert wurde und für 15 Minuten bei 37 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Die Aufnahme des FITC-Dextrans wurde durch die Überführung der Zellen auf Eis und viermaliges Waschen

der Zellen mit je 2 ml eiskaltem PBS beendet. Es folgte die Behandlung der Zellen mit 1 ml Zellfixierungslösung für 10 Minuten. Daran schloss sich nach zweimaligem Waschen mit je 2 ml PBS die Anfärbung der Zellkerne an. Dazu wurden die Zellen in je 1 ml Zellkern-Färbelösung (Endkonzentration 5 µg/ml in PBS) für 15 Minuten inkubiert und abschließend zweimal mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden aus der 6-Loch-Platte entfernt, mit einem Tropfen Fluoromount auf Objektträgern fixiert und bis zur fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme unter Lichtausschluss gelagert.

Mit Hilfe der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung wurde weiterhin die Optimierung der Parameter bei der Transfektion der XS52 Zellen mittels Neon durchgeführt. Eine möglichst hohe Transfektionseffizienz der Elektroporation ist für die erfolgreiche mRNA Reduktion mittels siRNA essentiell. Dazu wurden je  $5 \times 10^5$  XS52 Zellen (siehe 2.2.3.4) bei den von dem Hersteller empfohlenen unterschiedlichen Elektroporationsparametern (Spannung, Impulsdauer; Anzahl der Impulse) mit einem kommerziell erhältlichen GFP-Vektor (2 µg je 100 µl Transfektionansatz) transfiziert. Das erfolgreiche Eindringen des Vektors in die Zelle führt zur Proteinbiosynthese des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) im Cytosol und kann somit als Maß für die Transfektionseffizienz herangezogen werden. Nach der Inkubation der Zellen im Antibiotika-freien XS52GM für 24 Stunden im Brutschrank, wurden die Zellen nach zweimaligen Waschen mit je 2 ml PBS in 1 ml PBS aufgenommen und hinsichtlich der grünen Fluoreszenzintensität untersucht. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten am Keyence BZ9000 Fluoreszenzmikroskop.

### 2.2.6 Quantifizierung von S1P im biologischen Material

Die Gehaltsbestimmung von S1P in XS52 Zellen bzw. Kulturmedium erfolgte nach der Extraktion des Lipidmediators aus dem biologischen Material unter Verwendung von `electrospray ionisation liquid chromatography/tandem mass spectrometry` (ESI-LC-MS/MS). Bei dieser Methode findet zunächst eine flüssigchromatographische Auftrennung des Extraktionsgemischs statt, anschließend kann die zu untersuchende Substanz mittels zwei hintereinander geschalteten Massenspektrometern (quadrupol- und time of flight- Analysator) identifiziert und quantifiziert werden. Die genauen Messparameter des Systems können der Tabelle 2.2.6 entnommen werden. Die Extraktion des Sphingolipids für die Gehaltsbestimmung wurde dabei nach der Methode von Ruwisch (Ruwisch et al., 2001) durchgeführt. Diese basiert auf einem zweistufigen Zweiphasen-Extraktionsverfahren unter Anwendung verschiedener pH-Extraktionsbedingungen.

Für die Durchführung der Versuche wurden  $1 \times 10^6$  XS52 Zellen in Zellkulturschalen (100 mm Durchmesser) ausgesät. Nach der entsprechenden Stimulation der Zellen erfolgte die Überführung des Kulturmediums in ein silikonisiertes Eppendorfgefäß und das Waschen der Zellen mit PBS. Anschließend wurden die Zellen von der Kulturschale abgelöst und in einem silikonisiertem Eppendorfgefäß mit 1 ml 0,25 % HCl/Methanol-Lösung aufgenommen. Zur Homogenisierung und Freisetzung von S1P aus den Zellen wurde die Zellsuspension im Ultraschallbad für zwei Stunden behandelt. 1 ml des gewonnenen Kulturmediums wurde zusammen mit 100 pmol C17-S1P (interner Standard) in einem silikonisierten Glasröhrchen mit 100 µl einer 3 N NaOH-Lösung alkalisiert und durch Zugabe von 1 ml Chloroform und 1 ml 0,2 % HCl/Methanol-Lösung extrahiert. Bei der Gewinnung des Sphingolipids aus den Zellen wurde 1 ml der methanolischen Zellsuspension zusammen mit dem internen Standard, 900 µl 1 N NaCl-Lösung, 100 µl 3 N NaOH-Lösung und 1 ml Chloroform in einem silikonisierten Glasröhrchen extrahiert. In beiden Fällen wird die Deprotonierung des Sphingolipids durch den alkalischen pH-Wert gewährleistet, welches sich dann aufgrund seiner hohen Polarität in der wässrigen Phase des Extraktionsgemisches ansammeln kann. Um eine effektive Trennung der wässrigen und der organischen Phase zu erreichen, wurden die Extraktionslösungen (Emulsion) zentrifugiert (300 g, 5 min). Anschließend wurde die wässrige Phase gesammelt und

die organische Chloroform Phase mit 0,5 ml Methanol, 0,5 ml 1 N NaCl-Lösung und 50 µl 3 N NaOH-Lösung reextrahiert. Dieser Schritt sollte eine vollständige Überführung des möglicherweise in Chloroform gelösten S1P in die wässrige Phase gewährleisten. Die S1P-haltigen gesammelten wässrigen Phasen wurden vereinigt, mit 100 µl konzentrierter Salzsäure angesäuert und zweimal mit 1,5 ml Chloroform extrahiert. Eine Erniedrigung des pH-Wertes bei diesem Extraktionsschritt hatte die Aufgabe die Sphingolipidbase in die korrespondierende Säure zu überführen, so dass die Anreicherung des dabei gebildeten ungeladenen Moleküls in der Chloroformphase stattfinden kann. Nach Vereinigung der organischen Phasen wurde das Lösungsmittel mit Hilfe des Speed-Vac® SC201 ARC Vakuum-System entfernt und der Rückstand in 200 µl Methanol aufgenommen. Nach einer kurzen Inkubation im Ultraschallbad konnten die Proben der ESI-LC-MS/MS zugeführt werden.

**Tab. 2.2.6:** Verwendete LC-MS/MS Arbeitsbedingungen

<b>Parameter</b>	<b>Einstellung</b>																		
Mobile Phase																			
Eluent A	Wasser/Ameisensäure 100:0,1 [%]																		
Eluent B	Acetonitril/Tetrahydrofuran/Ameisensäure 50:50:0,1[%]																		
Elutionsdauer	15 min																		
Elutionsart	Gradientenelution:																		
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Zeit [min]</th> <th>Eluent A [%]</th> <th>Eluent B [%]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>57,5</td> <td>42,5</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>57,5</td> <td>42,5</td> </tr> <tr> <td>9</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>13</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>16</td> <td>57,5</td> <td>42,5</td> </tr> </tbody> </table>	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	0	57,5	42,5	4	57,5	42,5	9	0	100	13	0	100	16	57,5	42,5
Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]																	
0	57,5	42,5																	
4	57,5	42,5																	
9	0	100																	
13	0	100																	
16	57,5	42,5																	
Flussrate	0,5 ml/min																		
Stationäre Phase																			
Vorsäule	Waters X-Brigde C18 guard column (4.6 mm x 20 mm)																		
Trennsäule	Waters X-Bridge (C18, 4.6x150 mm, 3,5 µm Partikelgröße, 138 Å Porengröße)																		
MS/MS im positiven Modus																			
Sheatgastemperatur	300 °C																		
Sheatgasflussrate	9 l/min																		
Nebulizerdruck	30 psig																		
Dryinggastemperatur	300 °C																		
Dryinggasflussrate	8 l/min																		
Kapillarspannung	5400V																		
Fragmentatorspannung	200V																		
Nozulespannung	2000V																		
Kollisionsenergie	15V																		
Precrusor-Ionen	S1P (m/z 380.2560); C17 S1P (m/z 366.2404)																		
Fragment-Ionen	S1P (m/z 264.2700); C17 S1P (m/z 250.2529)																		

### 2.2.7 Untersuchung der FITC- Dextran Endozytose *in situ*

Die folgende Untersuchung der Aufnahme von FITC-Dextran durch die epidermalen DC`s wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Bäumer an der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover durchgeführt. Dazu wurden 2 Gruppen von Mäusen (6 Mäuse je Gruppe) über einen Zeitraum von 3 Tagen einmal täglich mit S1P (100 µg/80 µl Methanol) bzw. Vehikel topisch an den Ohren behandelt. 24 Stunden nach der letzten Applikation erfolgte die Tötung der Mäuse und anschließende Isolierung der Ohren. Die dorsalen Ohrhälften wurden nach der Methode von Sparber (Sparber et al., 2010) mit der epidermalen Seite für zwei Stunden in einem Kulturbad bestehend aus 250 µl RPMI-1640 mit 0,4 % BSA und 250 µl PBS mit FITC-Dextran (1 mg/ml) bei 37 °C inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die Epidermis von der Dermis nach der Methode von Bäumer (Baumer et al., 2003) durch eine Ammoniumthiocyanat-Behandlung separiert und für die Detektion der epidermalen DC`s vorbereitet. Dazu wurde die Epidermis mit dem primären Anti-Maus-MHC II-Antikörper behandelt, der anschließend mit Hilfe eines biotinylierten Sekundärantikörpers und Streptavidin-Biotin-Technik visualisiert worden ist. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laser-Mikroskops (Leica TCS SP5, Wetzlar), wobei die prozentuelle FITC-Dextran-Aufnahme der MHC II-positiven Zellen über die grüne Fluoreszenzintensität analysiert worden ist.

### 2.2.8 Statistik

Bei den Ergebnissen handelt es sich um arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD) von mindestens einer Zweifachbestimmungen. Dabei wurden die gewonnenen Ergebnisse in mindestens zwei weiteren voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten bestätigt. Für die Prüfung auf Signifikanz diente der Students t-Test. Als Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % (\*  $p \leq 0,05$ ) gewählt. Die als Voraussetzung für die Prüfung auf Signifikanz notwendige Normalverteilung der Stichprobenmenge erfolgte mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests. Die Überprüfung der Varianzhomogenität als ein weiteres benötigtes Kriterium für die Anwendung des Students t-Tests erfolgte im Rahmen eines F-Tests nach Fischer. Im Falle einer Varianzinhomogenität wurde die Signifikanz mittels Welch-Test überprüft.

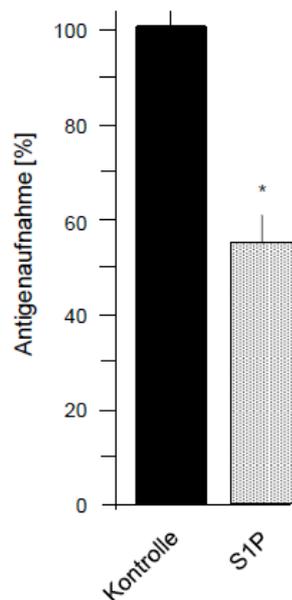
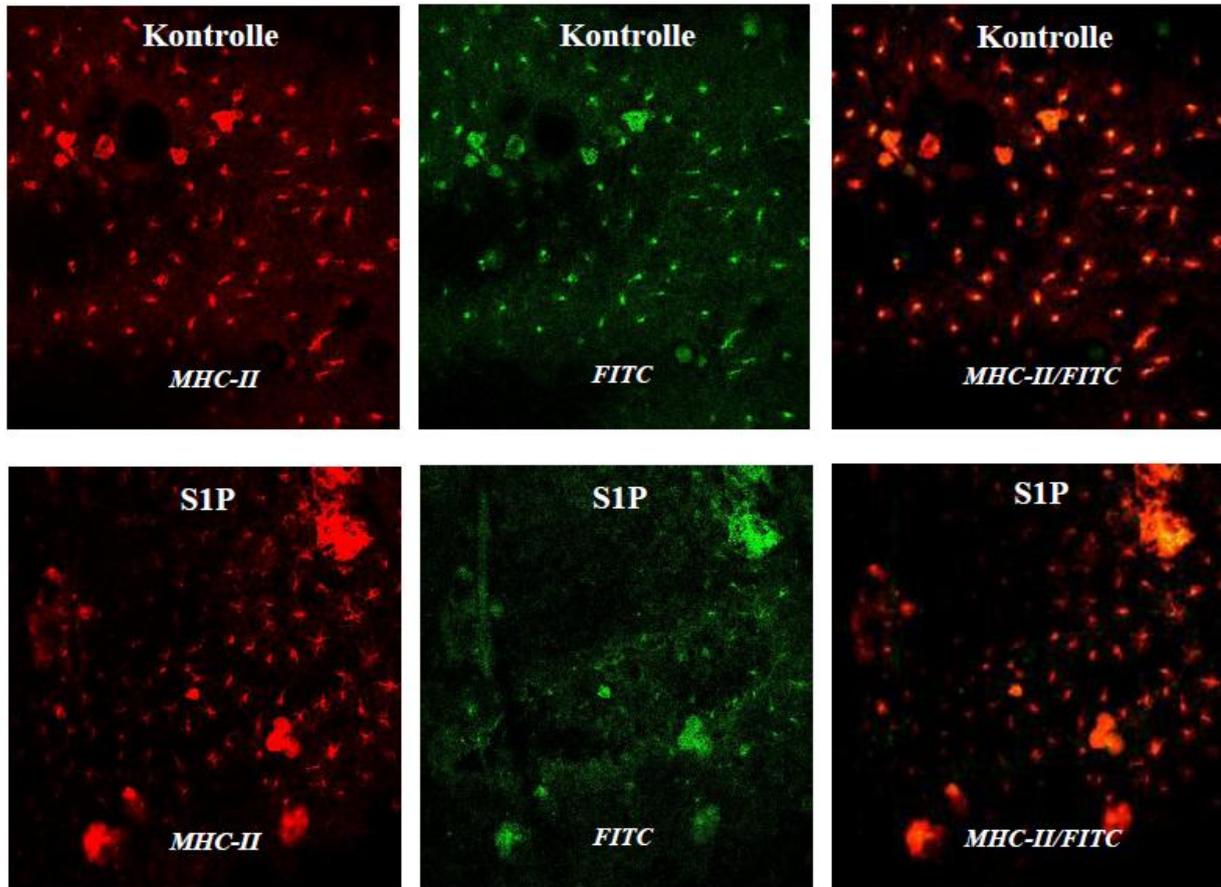
### **3. Ergebnisse**

---

### **3.1 Bedeutung von S1P für die Antigenaufnahme durch dendritische Zellen**

#### **3.1.1 *In situ* Untersuchung der Endozytose von FITC-Dextran durch epidermale DC`s nach topischer S1P-Applikation**

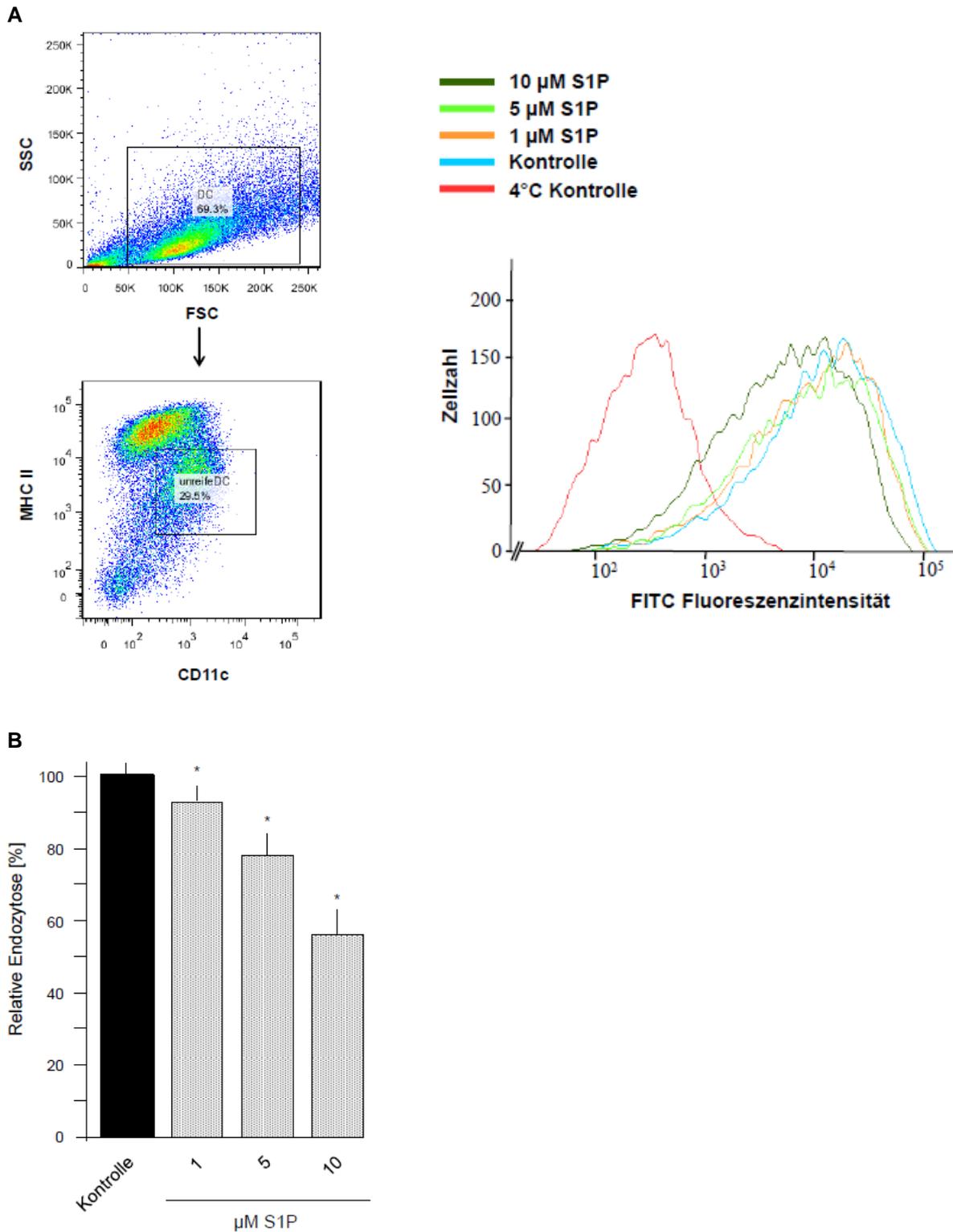
Die DC`s, die zu den wichtigsten APC`s des Immunsystems gehören, besitzen eine Schlüsselfunktion als Vermittler der Immunität. Im unreifen Differenzierungsstatus haben sie die Hauptaufgabe, Antigene aus dem Umfeld über die verschiedenen endozytotischen Mechanismen aufzunehmen und zu prozessieren. Im reifen Differenzierungsstatus sorgen sie dann für die Aktivierung von T-Zellen, indem sie diesen die aufgenommenen Antigene in Form von MHC-Peptid-Komplexen an ihrer Oberfläche präsentieren und so die spezifische Immunantwort einleiten. Da bereits gezeigt werden konnte, dass die topische Applikation von S1P eine Antigen-induzierte Hautentzündungsreaktion unterdrücken kann, wurde der Einfluss von S1P auf die Antigenaufnahme durch DC`s, den essentiellen Schritt der Aktivierung des spezifischen Immunsystems, untersucht (Reines et al., 2009). Dazu wurde zunächst die Aufnahmefähigkeit von Antigenen durch DC`s in der Haut, die durch das Vorhandensein vieler APC`s besonders gut geeignet ist, nach topischer Applikation von S1P untersucht. In einem *in situ* Experiment wurde Mäusen drei Tage lang eine methanolische S1P-Lösung topisch auf Ohrinnen- sowie Außenseite appliziert. Als Kontrolle diente eine Behandlung mit Methanol. Anschließend wurde die Endozytose der DC`s in der Haut durch die Inkubation der isolierten Ohren in einer FITC-Dextran Lösung provoziert. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der im Anschluss gewonnenen epidermalen Hautschnitte zeigt die Aufnahme des grün fluoreszierenden Endozytoseindikators FITC-Dextran durch die rot fluoreszierenden MHC II-positiven DC`s. Im Vergleich zu den Kontrolltieren führte die Behandlung der Mäuse mit S1P zu einer signifikant reduzierten Endozytose von FITC-Dextran durch die epidermalen DC`s, die der Population der LC`s angehören (Abb.3.1.1).



**Abb. 3.1.1** FITC-Dextran Endozytose durch epidermale DC`s. S1P (100 µg/80 µl Methanol) bzw. Vehikel wurden 3 Tage lang topisch auf Mäuseohren appliziert. Nach der Tötung der Mäuse wurden die isolierten Mäuseohren für 2 Stunden in einer FITC-Dextran (1 mg/ml) Lösung inkubiert. Nach der Immunfärbung der epidermalen DC`s mit dem MHC II-Antikörper erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der DC`s hinsichtlich der grünen FITC-Fluoreszenzintensität. \*p<0,05

### 3.1.2 Einfluss von S1P auf die Endozytose von FITC-Dextran durch unreife BM-DC`s

Das Lysosphingolipid S1P steuert eine Vielzahl an zellulären Prozessen wie Wachstum, Differenzierung, Motilität, Zytoskelett-Organisation und Calcium-Homöostase. Auf diese Weise können nicht nur die DC`s, sondern auch andere Zelltypen in der Haut durch S1P beeinflusst werden und eventuell die Antigenaufnahme modulieren (Hannun et al., 2008). Um einen indirekten S1P-Effekt im Bezug auf die Hemmung der Endozytose von DC`s bei dem *in situ* Versuch auszuschließen, wurde die Aufnahme von FITC-Dextran durch BM-DC`s in Gegenwart von S1P mittels FACS untersucht. Darüber hinaus konnte hierdurch die S1P-Wirkung in einer weiteren DC-Subpopulation neben den LC`s charakterisiert werden. Als Positivkontrolle diente ein Ansatz ohne S1P. Als Negativkontrolle wurde ein weiterer Ansatz auf Eis verwendet, da bei einer Temperatur um 4 °C keine aktive Endozytose stattfinden kann. Die durchflusszytometrische Analyse der aus dem Knochenmark generierten BM-DC`s zeigte eine Population von unreifen DC`s, die durch die Oberflächenexpression der Marker CD11c und MHCII<sup>low</sup> identifiziert worden ist. Dabei sind die beiden membranständigen Proteine ein typisches Merkmal von unreifen DC`s, wobei der CD11c Marker eine Eigenschaft aller DC`s, die schwache Expression an MHC II ein Charakteristikum des unreifen Differenzierungsstatus darstellt. In Übereinstimmung mit den *in situ* Versuchen zeigte die Population der unreifen BM-DC`s eine hohe Endozytoserate, die durch die Stimulation mit S1P konzentrationsabhängig verringert worden ist. Wie an den Histogrammen eindeutig zu erkennen ist, führte die Anwesenheit des Lipidmediators im Vergleich zu der Positivkontrolle zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Fluoreszenzintensität. Diese stellt ein Maß für die FITC-Dextran-Aufnahme bzw. Endozytose durch die Zellen dar (Abb.3.1.2A). Eine signifikante Reduktion der Antigenaufnahme durch die BM-DC`s konnte bei der Konzentration von 1 µM S1P beobachtet werden. Die Stimulation der Zellen mit 10 µM S1P zeigte hingegen eine maximale Hemmung der FITC-Dextran-Aufnahme (Abb.3.1.3B).

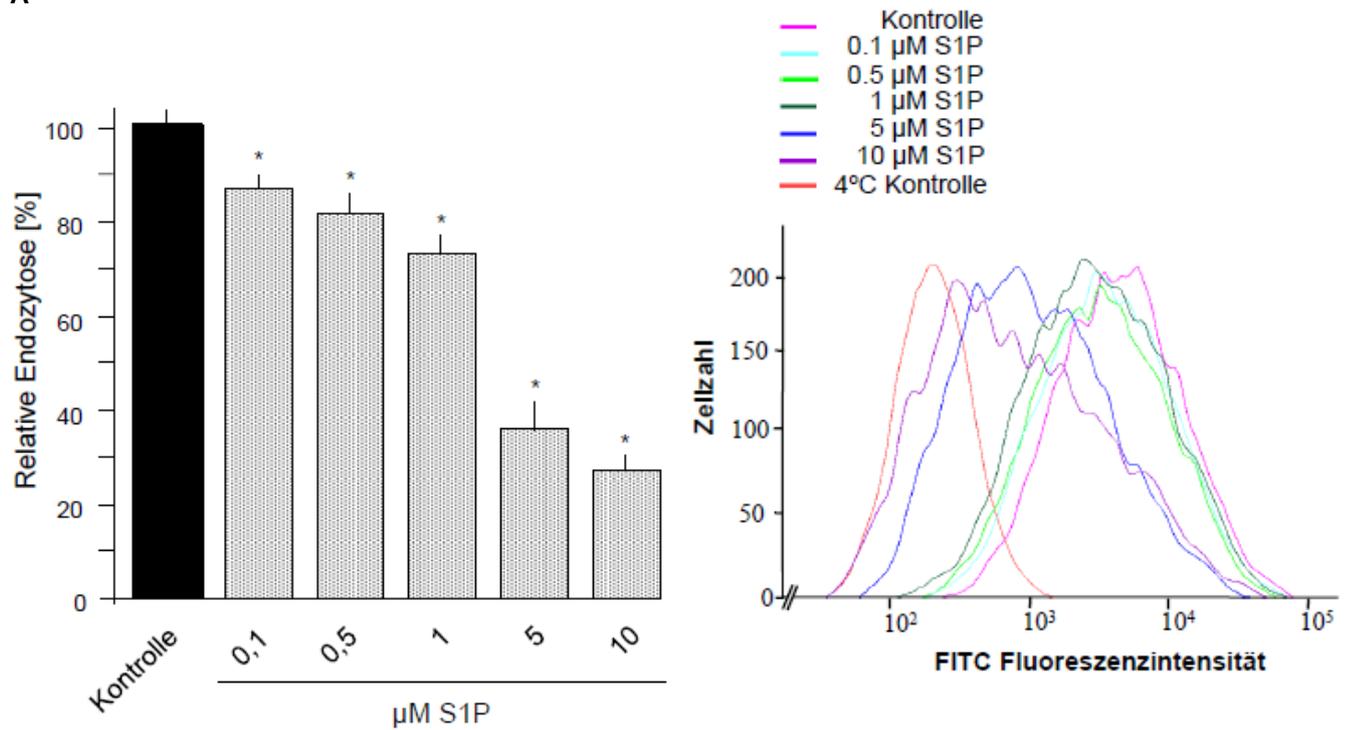


**Abb. 3.1.2 FITC-Dextran Endozytose durch unreife BM-DC's.** Die am 10. Tag der DC Generierung aus murinem Knochenmark gewonnene Zellen wurden 15 min lang mit oder ohne S1P unterschiedlicher Konzentration in einer FITC-Dextran (1 mg/ml) Lösung bei 37 °C bzw. 4 °C inkubiert. Nach der Immunfärbung der Zellen mit CD11c- / MHC II-Antikörpern zwecks Identifizierung der unreifen BM-DC-Population wurde diese mittels FACS-Analyse hinsichtlich der FITC-Fluoreszenzintensität untersucht. Die Histogramme eines exemplarischen Experiments zeigen die FITC-Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Proben (A). Nach dem Abzug der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der bei 4 °C behandelten Zellen von dem jeweiligen Ziel-MFI-Wert wurde die relative Endozytoserate kalkuliert (B). \* $p < 0,05$

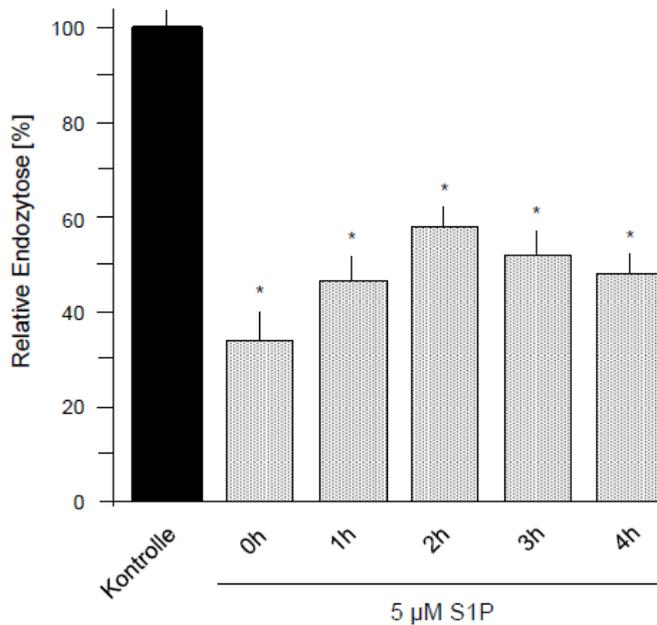
### 3.1.3 Einfluss von S1P auf die Endozytose von FITC-Dextran durch XS52 Zellen

Im nächsten Schritt wurde der inhibitorische Effekt von S1P im Bezug auf die Antigenaufnahme durch DC`s in der LC-Zelllinie XS52 untersucht. Diese Zelllinie besitzt ihren Ursprung in der Epidermis von neugeborenen BALB/c Mäusen und weist bei Kultivierung über mehrere Passagen die Charakteristika von unreifen DC`s auf (Xu, Ariizumi, Caceres-Dittmar, et al., 1995). Durch die Verwendung dieser Zelllinie war es für die nachfolgenden Versuche möglich, die BM-DC`s durch eine Monokultur von unreifen DC`s mit LC-Eigenschaften zu ersetzen. Die durchflusszytometrische Untersuchung der FITC-Dextran-Aufnahme durch die XS52 Zellen in Gegenwart von S1P bestätigte die inhibitorische Wirkung des Lipidmediators. S1P zeigte eine konzentrationsabhängige Hemmung der Endozytose von FITC-Dextran durch die XS52 Zellen. Eine signifikante Reduktion der Antigenaufnahme durch die DC`s konnte bei der Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  S1P beobachtet werden. Die Stimulation der Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  S1P führte zur maximalen Hemmung der FITC-Dextran-Aufnahme (Abb.3.1.3A). Die anschließende Untersuchung der Zeitabhängigkeit der inhibitorischen Wirkung von S1P auf die Endozytose zeigte eine dauerhafte Reduktion der Antigenaufnahmefähigkeit durch die stimulierten XS52 Zellen gegenüber der unbehandelten Positivkontrolle. Eine Vorstimulation der XS52 Zellen mit 5  $\mu\text{M}$  S1P über verschiedene Zeiträume vor der FITC-Dextran +/- S1P Zugabe führte zu einer signifikanten Hemmung der Endozytose. Die Vorinkubation der XS52 Zellen mit S1P zeigte jedoch auch eine Abschwächung der maximalen inhibitorischen Wirkung von S1P, die ohne Vorstimulation der XS52 Zellen mit dem Lipidmediator (0h) beobachtet werden konnte (Abb.3.1.3B).

A



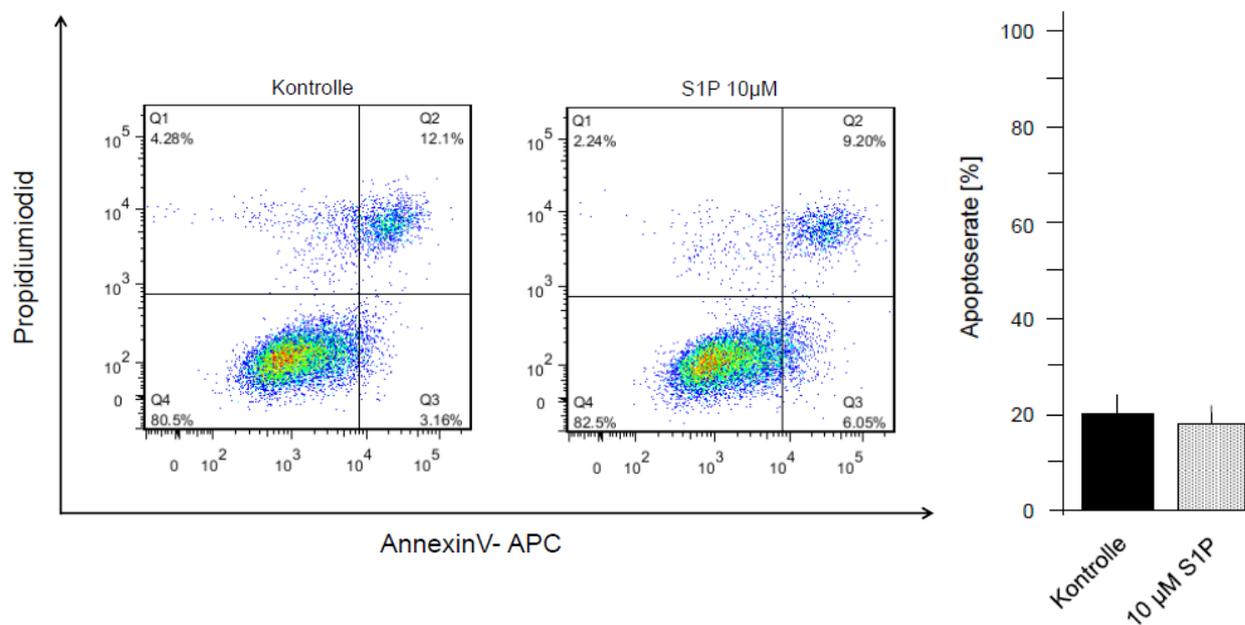
B



**Abb. 3.1.3 FITC-Dextran Endozytose durch XS52 Zellen.** XS52 Zellen wurden in Anwesenheit unterschiedlicher S1P-Konzentrationen (A) bzw. nach der entsprechenden Vorstimulation mit 5 µM S1P in Anwesenheit von 5 µM S1P (B) 15 min lang in einer FITC-Dextran (1 mg/ml) Lösung bei 37 °C inkubiert. Zur Bestimmung der unspezifischen FITC-Dextran Bindung an die XS52 Zellen wurden diese in der entsprechenden FITC-Dextran Lösung bei 4 °C für 15 min inkubiert. Anschließend wurden die XS52 Zellen mittels FACS hinsichtlich der FITC-Fluoreszenzintensität untersucht. Nach dem Abzug der MFI der bei 4 °C behandelten Zellen von dem jeweiligen Ziel-MFI-Wert wurde die relative Endozytoserate kalkuliert. \*p<0,05

### 3.1.3.1 Apoptoseverhalten der XS52 Zellen nach S1P-Stimulation

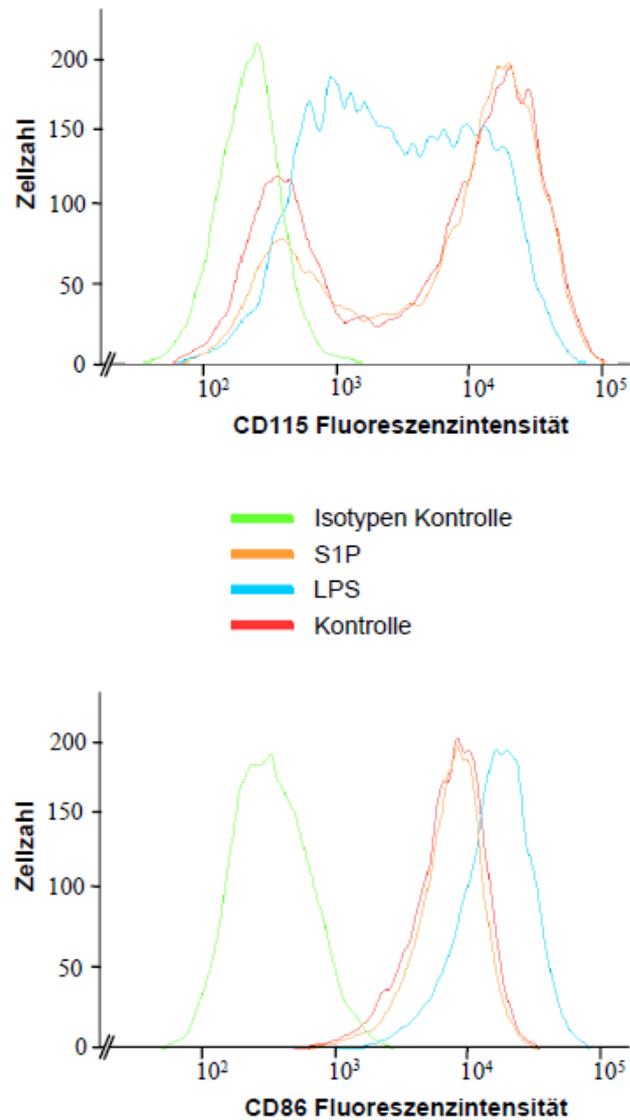
Die Homöostase der DC`s spielt eine entscheidende Rolle in ihrem Endozytoseverhalten. Eine Störung des zellulären Stoffwechsels durch Einleiten der Apoptose, die zum Absterben der Zellen führt, kann die Antigenaufnahme beeinflussen bzw. reduzieren (Nicolo et al., 2001). Die Untersuchung der S1P-Wirkung im Bezug auf den programmierten Zelltod sollte aufzeigen, ob die Sphingolipid-vermittelte verringerte Antigenaufnahme durch die DC`s auf diesen Effekt zurückzuführen ist. Dazu wurden die XS52 Zellen mit 10  $\mu$ M S1P über einen Zeitraum von sechzehn Stunden stimuliert, als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Die durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate schloss eine pro-apoptotische Wirkung von S1P aus. Die Stimulation der Zellen mit dem Sphingolipid zeigte keine signifikante Veränderung der basalen Sterberate der XS52 Zellen gegenüber der Kontrolle. In beiden Fällen konnte ein Anteil an abgestorbenen DC`s von etwa 20 % ermittelt werden. (Abb. 3.1.3.1).



**Abb. 3.1.3.1 Apoptoseverhalten der XS52 Zellen.** XS52 Zellen wurden für 16 Stunden mit 10  $\mu$ M S1P bzw. Kontrollvehikel inkubiert. Nach der Anfärbung der Zellen mit Annexin V-APC und PI erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate. Die Dot Plots eines exemplarischen Experiments zeigen die vitalen (Q4) bzw. die apoptotischen und nekrotischen (Q1-3) Zellen.

### 3.1.3.2 Differenzierungsstatus der XS52 Zellen nach S1P-Stimulation

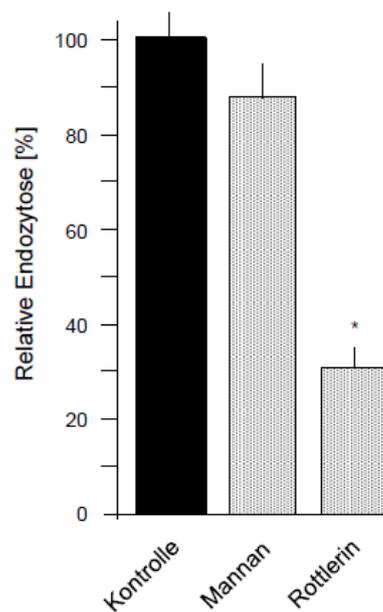
Eine weitere Möglichkeit das Endozytoseverhalten der DC`s zu modulieren, ist die Veränderung ihres Differenzierungsstatus. Während die unreifen DC`s eine hohe Antigenaufnahme-fähigkeit besitzen, nimmt diese während der Differenzierung zur reifen DC`s stark ab. Substanzen, die eine Reifung der DC`s fördern, können somit eine Reduktion der Endozytoserate verursachen (Platt et al., 2010). Für die XS52 Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass die Herunterregulation des CD115-Oberflächenmarkers und die gleichzeitige Erhöhung der Expression des CD86-Markers als Indikator für eine Veränderung des Differenzierungsstatus in Richtung reife DC genutzt werden kann. Dabei sind die beiden Eigenschaften ein typisches Merkmal von reifen XS52 Zellen, wobei der CD86-Marker für die Aktivierung der T-Zellen durch reife DC`s benötigt wird. Die Herunterregulation des CD115-Oberflächenproteins, das einen Rezeptor für den Wachstumsfaktor M-CSF darstellt, führt zu einem anti-proliferativen Effekt bei den XS52 Zellen. Dies kann ebenfalls als ein typisches Charakteristikum der Reifung der DC`s angesehen werden (Kitajima et al., 1996). Die durchflusszytometrische Analyse des Reifestatus der XS52 Zellen nach einer Stimulation mit 10  $\mu$ M S1P über einen Zeitraum von sechzehn Stunden zeigte keine Veränderung dieser Oberflächenmarker gegenüber den unstimulierten Zellen (Negativkontrolle). Als Positivkontrolle diente die Stimulation der XS52 Zellen mit 10 ng/ml LPS, einem bakteriellen Abbauprodukt, das die Reifung der DC`s einleitet. Wie an den Histogrammen eindeutig zu erkennen ist, führte die Anwesenheit des Lipidmediators im Vergleich zu der Negativkontrolle zu keiner Änderung der Fluoreszenzintensität der beiden Oberflächenmarker CD86 und CD115. Die LPS-Anwesenheit zeigte die zu erwartende Zunahme der CD86- und Abnahme der CD115-Oberflächenexpression, was den reifen Differenzierungsstatus der XS52 Zellen beschreibt (Abb.3.1.3.2).



**Abb. 3.1.3.2 Differenzierungsstatus der XS52 Zellen.** XS52 Zellen wurden für 16 Stunden mit  $10 \mu\text{M}$  S1P,  $10 \text{ ng/ml}$  LPS oder Kontrollvehikel inkubiert. Nach der Anfärbung der Zellen mit Anti-CD115-APC-Antikörper und Anti-CD86-PE-Antikörper erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der Expression der entsprechenden Oberflächenmarker. Die Histogramme eines exemplarischen Experiments zeigen Fluoreszenzintensitäten der jeweiligen gebundenen Antikörper der einzelnen Proben.

### 3.1.4 Mechanismus der Endozytose von FITC-Dextran

Die Aufnahme von gelösten Fremdstoffen aus dem Extrazellularraum kann durch die DC's über zwei verschiedene Wege realisiert werden. Dazu gehören die Makropinozytose und die Rezeptor-vermittelte Endozytose. Die bei der Untersuchung der endozytotischen Aktivität eingesetzte Verbindung FITC-Dextran stellt ein lösliches Makromolekül dar. Dieses kann im Rahmen der makropinozytotischen Aufnahme von extrazellulären Flüssigkeiten in die DC's gelangen. Auf der anderen Seite besitzt FITC-Dextran strukturelle Voraussetzungen, welche die Rezeptor-vermittelte Endozytose über die beiden C-Typ-Lektin-Rezeptoren Langerin und den Mannose-Rezeptor erlauben (Valladeau et al., 2000; Gazi et al., 2009). Im nachfolgenden wurde der Hauptaufnahmeweg von FITC-Dextran in den XS52 Zellen analysiert, um die durch S1P inhibierte Endozytoseart zu identifizieren. Dazu wurden die XS52 Zellen mit 1 mg/ml Mannan bzw. 3  $\mu$ M Rottlerin vorinkubiert und anschließend durchflusszytometrisch hinsichtlich der FITC-Dextran-Aufnahme untersucht. Als Positivkontrolle dienten unstimulierte XS52 Zellen. Bei Mannan handelt es sich um einen kompetitiven Antagonisten des Langerins bzw. Mannose-Rezeptors, welcher in der Lage ist, die Rezeptor-vermittelte Endozytose von FITC-Dextran zu hemmen. Für Rottlerin in der Konzentration von 3  $\mu$ M kann hingegen eine spezifische Hemmung der Makropinozytose in den DC's nachgewiesen werden. Die Blockade der Rezeptor-vermittelten FITC-Dextran-Aufnahme mittels Mannan führte zu keiner signifikanten Veränderung der relativen Endozytoserate gegenüber der Positivkontrolle. Die Ausschaltung der Makropinozytose in den XS52 Zellen resultierte hingegen in einer signifikanten 70 % igen Reduktion der FITC-Dextran-Endozytose. Es konnte somit die unspezifische Aufnahme von Flüssigkeiten als die Endozytoseart identifiziert werden, welche durch S1P inhibiert wird (Abb. 3.1.4).

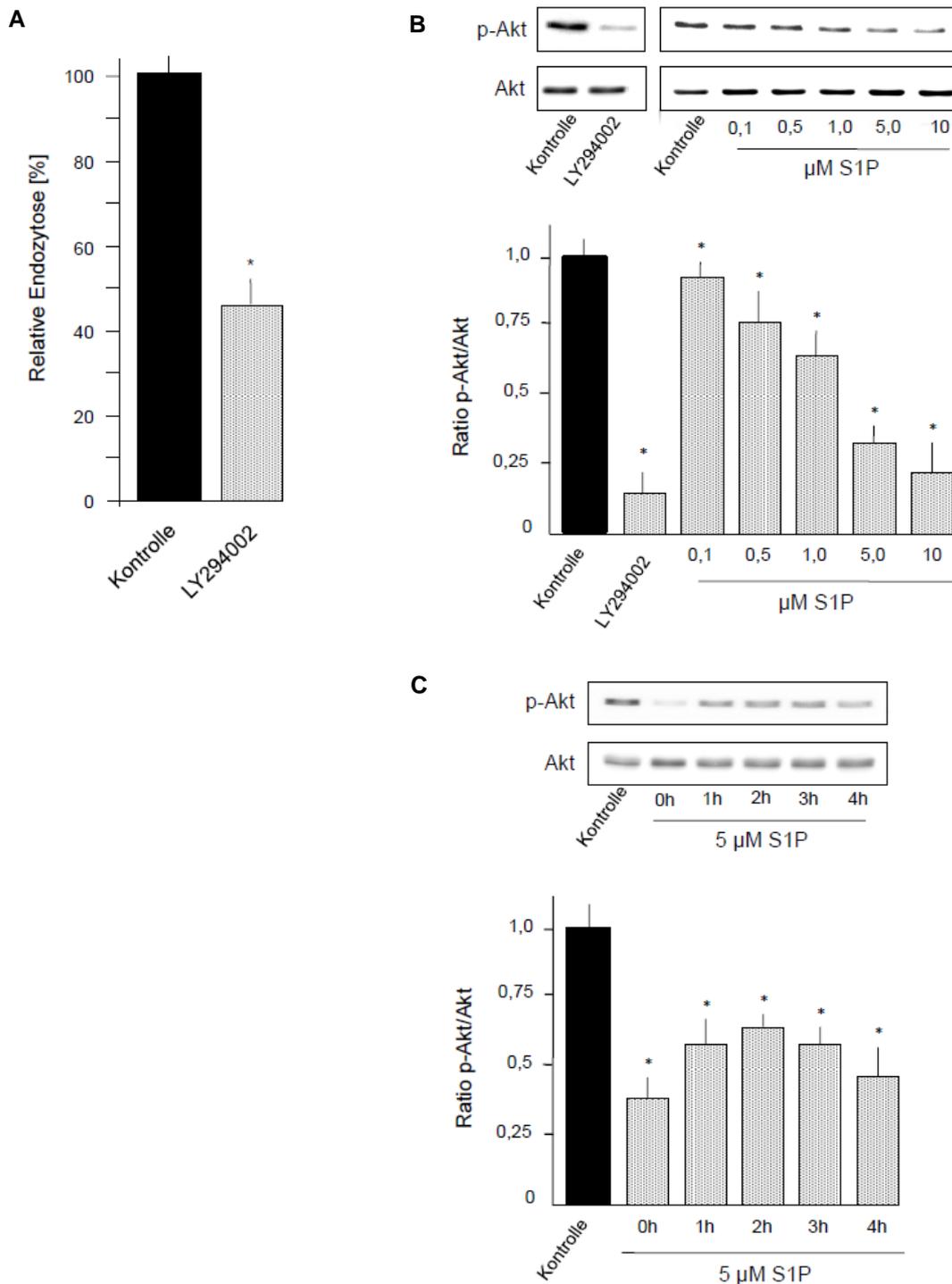


**Abb. 3.1.4** **Endozytosemechanismus von FITC-Dextran in den XS52 Zellen.** XS52 Zellen wurden für 30 min mit 1 mg/ml Mannan, 3  $\mu$ M Rottlerin oder Kontrollvehikel vorstimuliert und danach 15 min lang in einer FITC-Dextran (1 mg/ml) Lösung bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die XS52 Zellen mittels FACS hinsichtlich der FITC-Fluoreszenzintensität untersucht. Nach dem Abzug der entsprechenden MFI der bei 4 °C behandelten Kontrollzellen von dem jeweiligen Ziel-MFI-Wert wurde die relative Endozytoserate kalkuliert. \* $p < 0,05$

### 3.1.5 Einfluss der PI3K-Aktivität auf die Endozytose von FITC-Dextran und ihre Modulation durch S1P

Die Makropinozytose ist eine der wichtigsten Endozytosearten in den DC`s und trägt maßgeblich zu der Antigenaufnahme bei. Des Weiteren ist bekannt, dass dieser Vorgang durch die Aktivität der PI3K reguliert werden kann, wobei ihre Erniedrigung mit einer Reduktion der Makropinozytose einhergeht (Yanagawa et al., 2010). Die bereits gezeigte S1P-induzierte Erniedrigung der FITC-Dextran-Aufnahme durch DC`s konnte auf eine Hemmung der Makropinozytose zurückgeführt werden. Aus diesem Grund wurde eine mögliche Modulation der PI3K-Aktivität durch S1P als Ursache für das veränderte Endozytoseverhalten der DC`s analysiert. Im ersten Schritt wurde die Antigenaufnahmefähigkeit der DC`s nach der pharmakologischen Inhibierung der PI3K untersucht. Dazu wurden die XS52 Zellen vor der FITC-Dextran Zugabe mit dem

PI3K-Hemmstoff LY294002 (10  $\mu\text{M}$ ) vorinkubiert und anschließend durchflusszytometrisch hinsichtlich der endozytotischen Aktivität analysiert. Als Positivkontrolle dienten unbehandelte XS52 Zellen. Die Blockade der PI3K-Enzymaktivität resultierte in einer signifikanten Erniedrigung der Antigenaufnahme durch die XS52 Zellen, was die Abhängigkeit der Makropinozytose von diesem Signalweg bestätigen konnte (Abb. 3.1.5A). Im nächsten Schritt wurde die Modulation der PI3K-Aktivität durch S1P als eine mögliche Ursache für die veränderte Endozytoseaktivität der DC`s überprüft. Das prominenteste, dem PI3K-Signalweg nachgeschaltete, intrazelluläre Protein ist die Kinase Akt, deren Phosphorylierung an Serin 473 als Indikator für die PI3K-Aktivität verwendet werden kann. Eine erhöhte PI3K-Aktivität korreliert dabei mit einer gesteigerten Phosphorylierung der Akt, die mittels spezifischer Antikörper im Western Blot nachgewiesen werden kann. In der Tat führte die Stimulation der XS52 Zellen mit S1P zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der intrazellulären Akt-Phosphorylierung bzw. PI3K-Aktivität. Eine signifikante Erniedrigung der Enzymaktivität konnte bei der Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  S1P, die Maximalhemmung bei 10  $\mu\text{M}$  S1P detektiert werden. Dies korreliert auch mit der konzentrationsabhängigen Inhibierung der FITC-Dextran-Aufnahme, die in Anwesenheit des Lipidmediators mittels FACS gemessen werden konnte (Abb. 3.1.5B). Die Überprüfung der Zeitabhängigkeit der S1P-Wirkung bestätigte ebenfalls die Korrelation zwischen der FITC-Dextran-Aufnahme und der PI3K-Aktivität in den DC`s. Eine der durchflusszytometrischen Untersuchung analoge Vorstimulation der XS52 Zellen mit 5  $\mu\text{M}$  S1P über verschiedene Zeiträume und anschließende Stimulation mit dem Lipidmediator für 15 Minuten führten zu einer signifikanten Hemmung der Akt-Phosphorylierung. Die Vorinkubation der XS52 Zellen mit S1P zeigte jedoch auch eine Abschwächung der maximalen inhibitorischen Wirkung von S1P. Diese konnte nur wie bei der entsprechenden FACS-Analyse ohne Vorstimulation der XS52 Zellen mit S1P (0h) beobachtet werden. Die Anwesenheit des Lipidmediators im XS52 Medium über einen Zeitraum von 15 Minuten entspricht dabei der bei der FACS-Analyse verwendeten FITC-Dextran +/- S1P-Inkubationsdauer (Abb.3.1.5C).

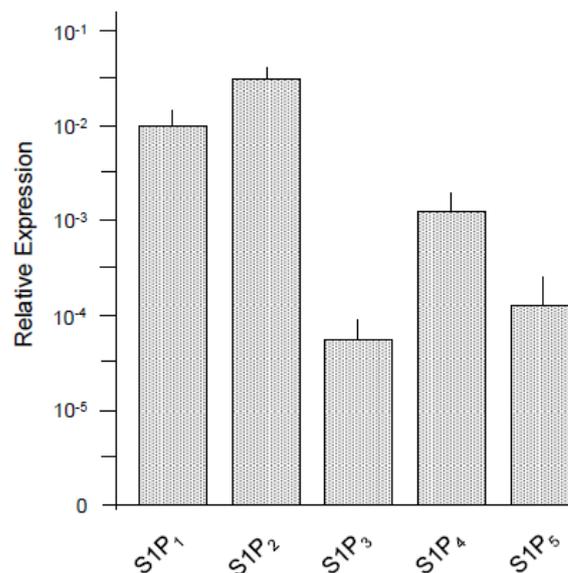


**Abb. 3.1.5 PI3K-Abhängigkeit der Endozytose in den XS52 Zellen.** XS52 Zellen wurden für 30 min mit 10  $\mu$ M LY294002 oder Kontrollvehikel vorstimuliert und danach 15 min lang in einer FITC-Dextran (1 mg/ml) Lösung bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die XS52 Zellen mittels FACS hinsichtlich der FITC-Fluoreszenzintensität untersucht. Nach dem Abzug der entsprechenden MFI der bei 4 °C behandelten Kontrollzellen von dem jeweiligen Ziel-MFI-Wert wurde die relative Endozytoserate kalkuliert (A). XS52 Zellen wurden mit unterschiedlichen S1P-Konzentrationen bzw. 10  $\mu$ M LY294002 für 15 min (B) oder mit 5  $\mu$ M S1P über verschiedene Zeiträume vorinkubiert und anschließend mit 5  $\mu$ M S1P für 15 min (C) behandelt. Im Anschluss erfolgte die Untersuchung der Proben hinsichtlich der Akt-Phosphorylierung mittels Western Blot. Als Proteinladekontrolle diente die Bestimmung der gesamten Akt-Menge. \* $p < 0,05$

### 3.1.6 Charakterisierung der an der S1P-induzierten Endozytosereduktion beteiligten Rezeptoren

#### 3.1.6.1 Expression der S1P-Rezeptoren in den XS52 Zellen

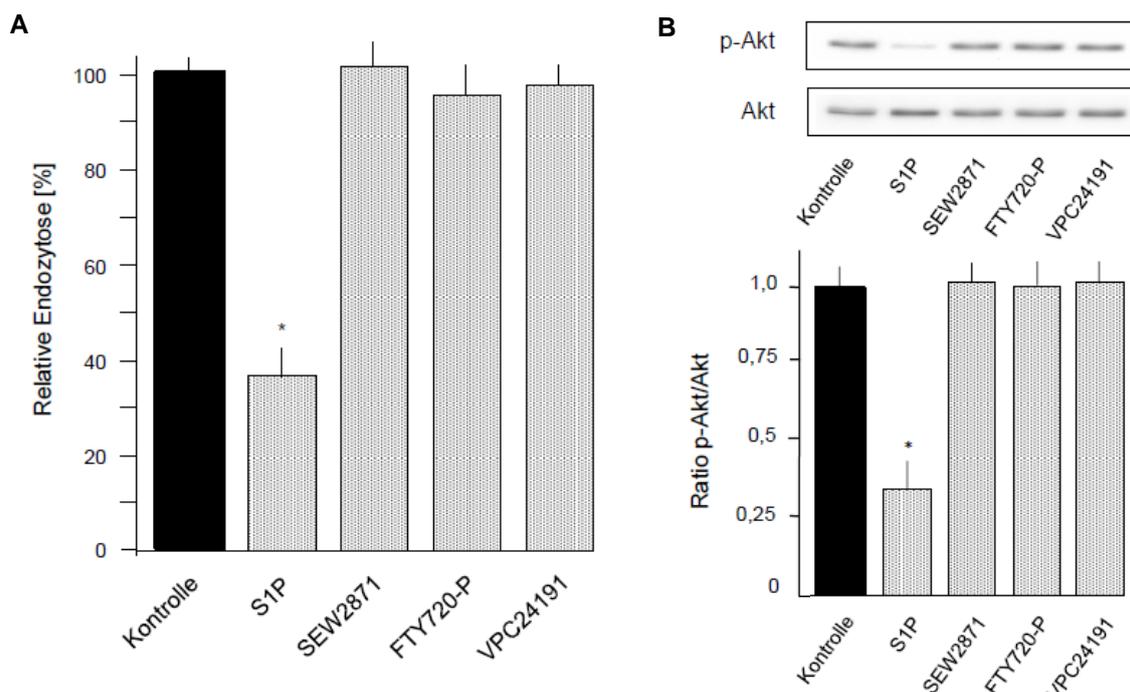
S1P vermittelt einen großen Teil seiner Effekte über GPCR`s, die als S1P<sub>1-5</sub> bezeichnet werden und die abhängig vom Zelltyp unterschiedliche Expressionsmuster zeigen. In murinen unreifen BM-DC`s kann das Vorhandensein aller S1P-Rezeptorsubtypen nachgewiesen werden, wobei der S1P<sub>2</sub>-Rezeptorsubtyp am stärksten exprimiert wird (Rathinasamy et al., 2010). Im Hinblick auf die Vergleichbarkeit der primären DC`s mit der in dieser Arbeit verwendeten XS52 Zelllinie wurde der Gehalt an mRNA-Transkripten der S1P-Rezeptoren in den XS52 DC`s über eine quantitative Real-Time PCR charakterisiert. Die Normalisierung der gewonnenen Daten gegen GAPDH und HPRT1 als Referenzgene zeigte eine den primären DC`s ähnliche S1P-Rezeptor-Expression in den XS52 Zellen. Es konnten alle S1P-Rezeptorsubtypen mit dem am stärksten exprimierten S1P<sub>2</sub>-Rezeptorsubtyp nachgewiesen werden.



**Abb. 3.1.6.1 Expression von S1P-Rezeptoren in den XS52 Zellen.** Die aus drei verschiedenen Kulturansätzen der XS52 Zellen isolierte mRNA wurde jeweils in cDNA umgeschrieben und anschließend mittels Real-Time PCR hinsichtlich der S1P-Rezeptorexpression analysiert. Die Normalisierung erfolgte gegen die beiden Referenzgene GAPDH und HPRT1. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um die jeweiligen Mittelwerte von den drei unabhängigen Versuchen.

### 3.1.6.2 Einfluss von S1P-Rezeptor-Agonisten auf die Endozytose von FITC-Dextran und PI3K-Aktivität

Die meisten physiologischen Effekte von S1P können über die Aktivierung der bereits beschriebenen S1P-Rezeptoren herbeigeführt werden. Durch die Verwendung von spezifischen S1P-Rezeptor-Agonisten wurde zunächst die Beteiligung eines S1P-Rezeptorsubtyps näher charakterisiert, auf dessen Stimulation die PI3K-abhängige Reduktion der Antigenaufnahme zurückgeführt werden kann. Dazu wurden die XS52 Zellen mit verschiedenen S1P-Rezeptor-Agonisten stimuliert und hinsichtlich der Endozytose von FITC-Dextran durchflusszytometrisch vermessen. Parallel dazu wurde die Akt-Phosphorylierung als PI3K-Aktivitätsindikator mittels Western Blot untersucht. Als Kontrolle dienten unstimulierte XS52 Zellen. Wie in der Abbildung 3.1.6.2 dargestellt zeigte der Einsatz von 1  $\mu\text{M}$  FTY720-P, welches an allen S1P-Rezeptorsubtypen außer S1P<sub>2</sub> agonistisch wirkt, keine Beeinflussung der Endozytose bzw. der PI3K-Aktivität. Die Stimulation der XS52 Zellen mit weiteren S1P-Rezeptor-Agonisten, dem S1P<sub>1</sub>/S1P<sub>3</sub>-Agonisten VPC24191 (10  $\mu\text{M}$ ) und dem S1P<sub>1</sub>-Agonisten SEW2871 (1  $\mu\text{M}$ ), war ebenfalls nicht in der Lage die FITC-Dextran-Aufnahme bzw. PI3K-Aktivität in den DC's zu modulieren. So zeigte die durchflusszytometrische Untersuchung der FITC-Dextran-Aufnahme durch die XS52 Zellen keine signifikante Änderung der relativen Endozytose in den Zellen, die mit den genannten S1P-Agonisten behandelt wurden, gegenüber der Kontrolle. Die Analyse der PI3K-Aktivität in Gegenwart der entsprechenden Agonisten mittels Western Blot bestätigte die durchflusszytometrischen Untersuchungen. Die Überprüfung der Akt-Phosphorylierung in den stimulierten XS52 Zellen zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Kontrolle. Wie der Abbildung 3.1.6.2 entnommen werden kann, wurden die XS52 Zellen weiterhin mit S1P als Positivkontrolle behandelt. Diese bestätigte die bereits untersuchte signifikante Reduktion der Antigenaufnahme als Folge einer Erniedrigung der Akt-Phosphorylierung bzw. PI3K-Aktivität.

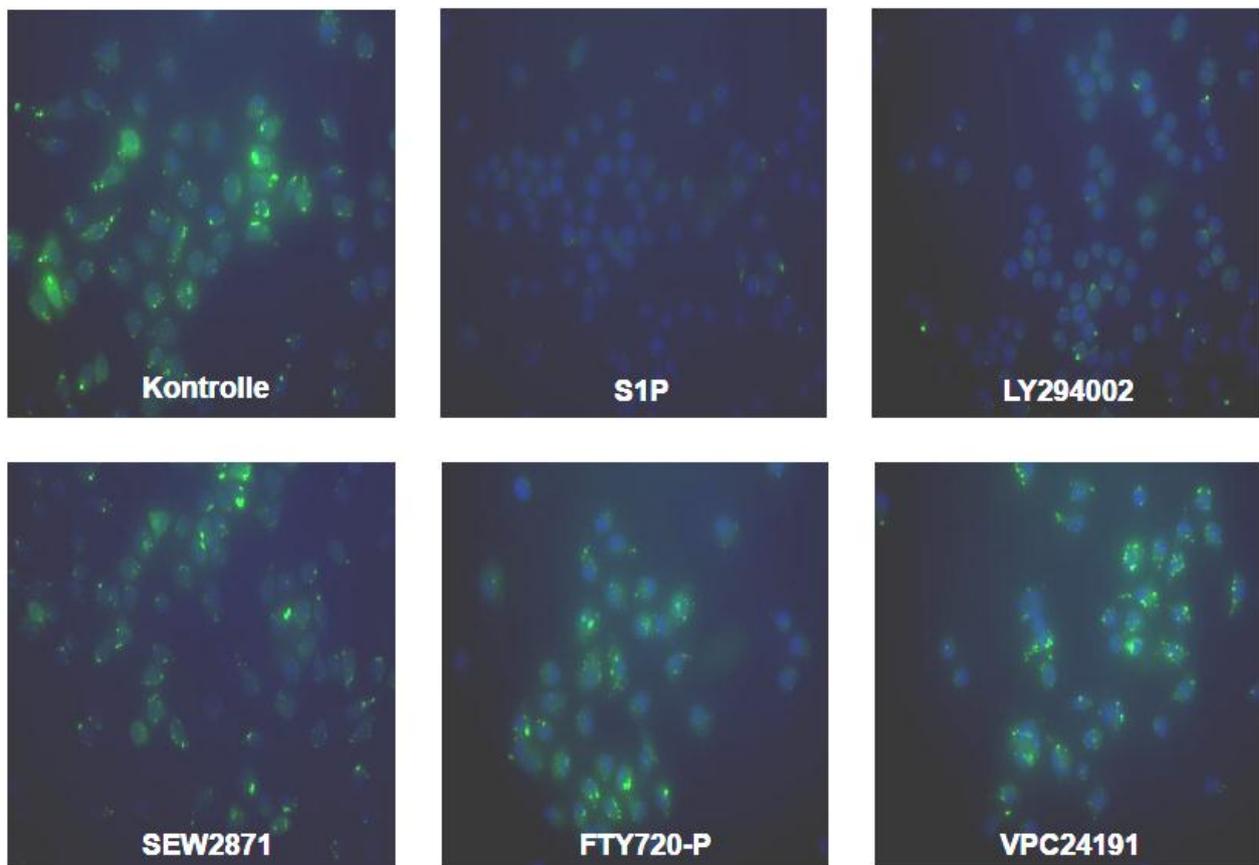


**Abb. 3.1.6.2 S1P-Rezeptorabhängigkeit der Endozytose und PI3K-Aktivität in den XS52 Zellen.** XS52 Zellen wurden in Anwesenheit von 5  $\mu$ M S1P, 1  $\mu$ M FTY720-P, 10  $\mu$ M VPC24191 oder 1  $\mu$ M SEW2871 15 min lang in einer FITC-Dextran (1 mg/ml) Lösung bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die XS52 Zellen mittels FACS hinsichtlich der FITC-Fluoreszenzintensität untersucht. Nach dem Abzug der entsprechenden MFI der bei 4 °C behandelten Kontrollzellen von dem jeweiligen Ziel-MFI-Wert wurde die relative Endozytoserate kalkuliert (A). XS52 Zellen wurden mit S1P oder den entsprechenden S1P-Rezeptor-Agonisten für 15 min behandelt und anschließend hinsichtlich der Akt-Phosphorylierung mittels Western Blot untersucht. Als Proteinladekontrolle diente die Bestimmung der gesamten Akt-Menge (B). \* $p < 0,05$

### 3.1.6.3 Fluoreszenzmikroskopische Analyse der FITC-Dextran Endozytose

Zur weiteren Verifizierung der durchflusszytometrischen Analyse der Endozytose in den XS52 Zellen wurde die FITC-Dextran-Aufnahme in Anwesenheit verschiedener Stimulantien fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dazu wurden die XS52 Zellen mit 5  $\mu$ M S1P, 10  $\mu$ M LY294002 und den drei im Abschnitt 3.1.6.2 beschriebenen S1P-Rezeptor-Agonisten jeweils entsprechend behandelt und nach der Inkubation mit FITC-Dextran für die Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet. Als Kontrolle dienten unstimulierte XS52 Zellen. Die blaue Färbung zeigt die Zellkerne der XS52 Zellen, die grüne Fluoreszenz die aufgenommene Menge des Endozytoseindikators FITC-Dextran. In Übereinstimmung mit den durchflusszytometrischen Untersuchungen

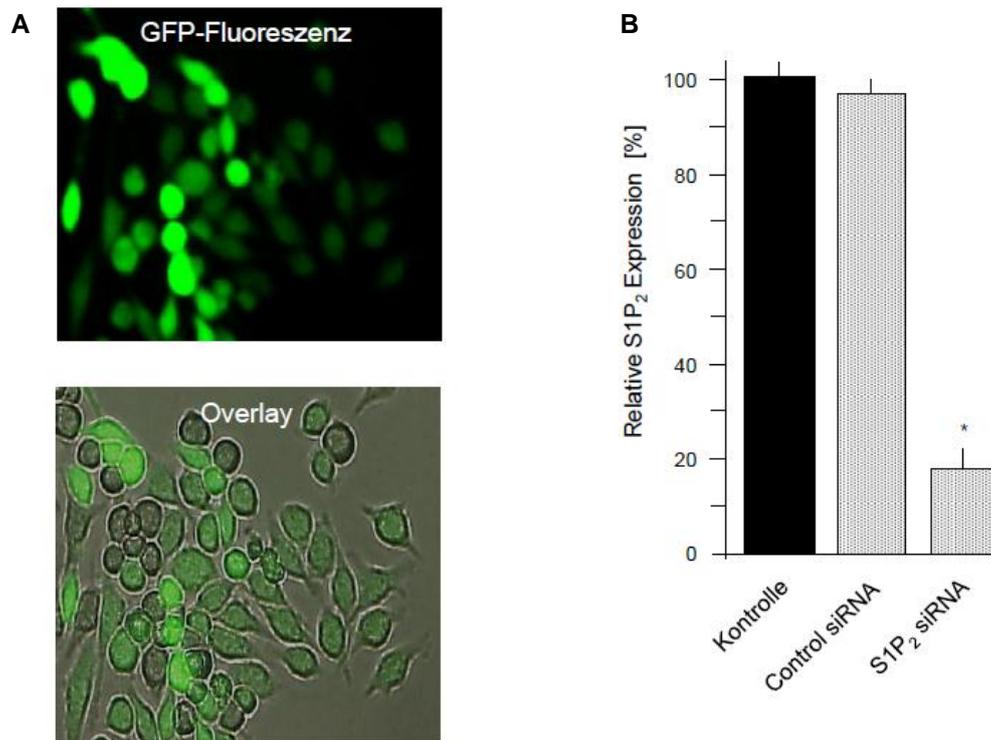
resultierte die Stimulation der S1P-Rezeptoren, mit Ausnahme des S1P<sub>2</sub>-Rezeptors, in einer unveränderten FITC-Dextran-Aufnahme in den XS52 Zellen gegenüber der Kontrolle. Die Anwesenheit des PI3K-Inhibitors LY294002 bzw. des Lipidmediators S1P, für die eine Hemmung der Endozytose eindeutig nachgewiesen werden konnte, führte wie erwartet zu einer stark verringerten Aufnahme des grünen Endozytoseindikators. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse bestätigte somit die im Vorfeld gewonnenen Ergebnisse (Abb. 3.1.6.3).



**Abb. 3.1.6.3 Visualisierung der S1P-Rezeptorabhängigkeit der Endozytose in den XS52 Zellen.** XS52 Zellen wurden in Anwesenheit von 5  $\mu\text{M}$  S1P, 1  $\mu\text{M}$  FTY720-P, 10  $\mu\text{M}$  VPC24191, 1  $\mu\text{M}$  SEW2871 oder nach einer 30-minütigen Vorinkubation mit 10  $\mu\text{M}$  LY294002 15 min lang in einer FITC-Dextran (1 mg/ml) Lösung bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die XS52 Zellen nach der Zellkernfärbung mit DAPI (blaue Fluoreszenz) fluoreszenzmikroskopisch hinsichtlich der FITC-Intensität (grüne Fluoreszenz) untersucht.

### 3.1.6.4 Reduktion der S1P<sub>2</sub>-Rezeptorexpression mittels spezifischer siRNA

Die bisherigen Untersuchungen zu der Rezeptorabhängigkeit der S1P-vermittelten Endozytosehemmung in den DC`s verdeutlichen eine mögliche Beteiligung des S1P<sub>2</sub>-Rezeptors. Die Stimulation der anderen S1P-Rezeptorsubtypen mit dem Sphingolipid zeigte nämlich keinen Effekt bezüglich der Antigenaufnahme bzw. PI3K-Aktivität. Ein gezieltes Unterdrücken der Proteinbiosynthese des S1P<sub>2</sub>-Rezeptors sollte im nachfolgenden dessen mögliche Beteiligung an der Modulation der Endozytose aufzeigen. Dabei stellt die Transfektion der Zellen mit spezifischer siRNA einen Weg dar, die Reduktion von mRNA-Translation zu erreichen, wodurch die entsprechende Proteinbiosynthese unterbunden wird. Im ersten Schritt wurden zunächst die optimalen Elektroporationsparameter des verwendeten Neon-Systems ermittelt, welche eine effiziente Transfektion der XS52 Zellen mit der siRNA erlauben. Dazu wurden die XS52 Zellen bei den vom Hersteller empfohlenen unterschiedlichen Elektroporationsparametern (Spannung, Impulsdauer, Anzahl der Impulse) mit einem kommerziell erhältlichen GFP-Vektor transfiziert. Das erfolgreiche Eindringen des Vektors in die Zelle führt zur Proteinbiosynthese des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) im Zytosol. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der unterschiedlichen Transfektionsansätze hinsichtlich der grünen Fluoreszenzintensität offenbarte folgende Neon-Einstellung als Transfektionsoptimum für die siRNA Versuche: Spannung 1500 mV, Impulsdauer 30 ms, Impulsanzahl 1 (Abb. 3.1.6.4A). Unter diesen Bedingungen konnte die höchste Transfektionsrate der XS52 Zellen erwartet werden. Im nächsten Schritt wurden die XS52 Zellen mit der spezifischen siRNA (100 nM) gegen den S1P<sub>2</sub>-Rezeptor bei den ermittelten Elektroporationsparametern transfiziert. Als Kontrollen dienten unbehandelte bzw. mit control siRNA (100 nM) transfizierte XS52 Zellen. Der Gehalt an mRNA-Transkripten des S1P<sub>2</sub>-Rezeptors wurde über eine quantitative Real-Time PCR-Analyse in den verschiedenen XS52 Ansätzen charakterisiert. Die Normalisierung der gewonnenen Daten gegen GAPDH und HPRT1 als Referenzgene zeigte eine 80 % ige Reduktion der S1P<sub>2</sub>.mRNA-Expression in den XS52 Zellen gegenüber den Kontrollen. Die Transfektion der XS52 Zellen mit control siRNA zeigte ebenfalls keine Änderung der S1P<sub>2</sub>-Rezeptorexpression gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abb. 3.1.6.4B).



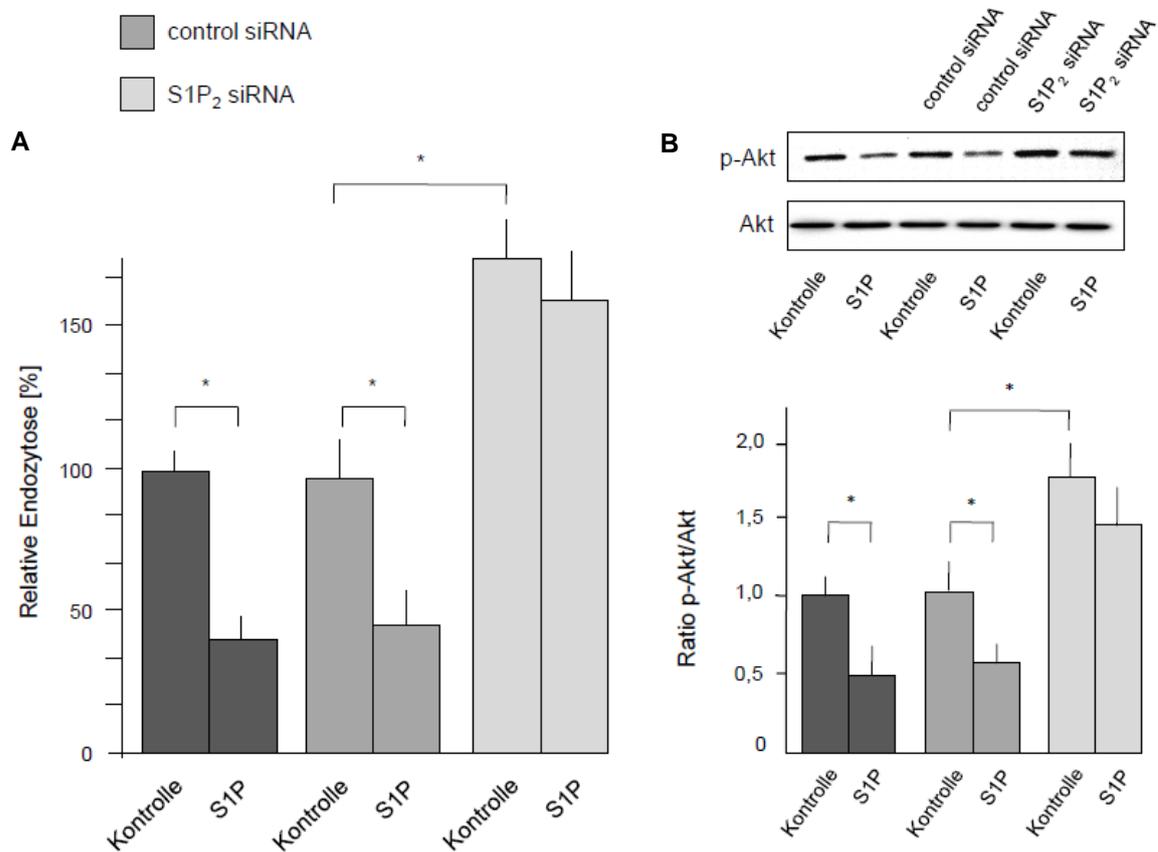
**Abb. 3.1.6.4 Transfektionseffizienz der XS52 Zellen.** XS52 Zellen wurden mittels Neon-System bei 1500 mV (Spannung), 30 ms (Impulsdauer), 1 (Impulsanzahl) mit dem GFP-Vektor, 2  $\mu$ g je Ansatz, transfiziert und nach 24 Stunden fluoreszenzmikroskopisch hinsichtlich grüner Fluoreszenz untersucht (A). XS52 Zellen wurden mit control siRNA (100 nM) oder S1P<sub>2</sub> siRNA (100 nM) bei den beschriebenen Parametern mittels Neon-System transfiziert. Als Kontrolle dienten unbehandelte XS52 Zellen. Die nach 24 Stunden isolierte mRNA wurde jeweils in cDNA umgeschrieben und anschließend mittels Real-Time PCR hinsichtlich der S1P<sub>2</sub>-Rezeptorexpression analysiert. Die Normalisierung erfolgte gegen die beiden Referenzgene GAPDH und HPRT1 (B). \* $p < 0,05$

### 3.1.6.5 Einfluss der verminderten S1P<sub>2</sub>-Rezeptorexpression auf die Endozytose von FITC-Dextran und PI3K-Aktivität

Die Erniedrigung der PI3K-Aktivität durch die Stimulation des S1P<sub>2</sub>-Rezeptors konnte bereits in anderen Zelltypen nachgewiesen werden und wurde im nachfolgenden als Ursache für die S1P-induzierte Reduktion der Endozytose in den DC`s untersucht (Schuppel et al., 2008). Dazu wurden die XS52 Zellen mit der S1P<sub>2</sub> siRNA bzw. control siRNA transfiziert und anschließend durchflusszytometrisch hinsichtlich der FITC-Dextran-Aufnahme in Anwesenheit von 5 µM S1P analysiert. Als zusätzliche Kontrolle dienten untransfizierte XS52 Zellen, um den generellen Einfluss der Transfektion von XS52 Zellen mit siRNA auf die Endozytose bzw. PI3K-Aktivität auszuschließen. Wie in der Abbildung 3.1.6.5A dargestellt konnte die S1P-induzierte Hemmung der Endozytose durch die Herunterregulation des S1P<sub>2</sub>-Rezeptors nahezu vollständig aufgehoben werden. Die Stimulation der untransfizierten bzw. control siRNA-transfizierten XS52 Zellen mit S1P führte zu einer signifikanten Reduktion der Endozytose gegenüber den jeweiligen unbehandelten Kontrollen. Dies konnte in den S1P<sub>2</sub>-defizienten XS52 Zellen nicht beobachtet werden. Besonders interessant war zudem die Erkenntnis, dass die Unterdrückung der S1P<sub>2</sub>-Rezeptorexpression einerseits die S1P-induzierte Endozytosehemmung aufhob. Auf der anderen Seite resultierte diese aber auch in einer erhöhten basalen Endozytoserate der DC`s gegenüber den untransfizierten bzw. mit control siRNA-transfizierten XS52 Zellen (Abb. 3.1.6.5A).

Da bereits die Abhängigkeit der FITC-Dextran-Aufnahme von der PI3K-Aktivität bestätigt werden konnte, wurden die XS52 Zellen analog dem FACS-Versuch behandelt und mittels Western Blot hinsichtlich der Akt-Phosphorylierung untersucht. Das Ergebnis dieser Analyse bestätigte die durchflusszytometrisch gewonnene Erkenntnis der S1P<sub>2</sub>-Rezeptor-Abhängigkeit. Die Stimulation der untransfizierten bzw. control siRNA-transfizierten XS52 Zellen mit S1P führte zu einer signifikanten Reduktion der Akt-Phosphorylierung. Dies konnte in den S1P<sub>2</sub> siRNA-transfizierten XS52 Zellen nicht nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte eine erhöhte basale PI3K-Aktivität in den S1P<sub>2</sub>-defizienten Zellen gegenüber den beiden Kontrollen festgestellt werden. Diese Beobachtung korreliert mit der FACS-Untersuchung, welche

ebenfalls eine erhöhte basale Endozytoserate der S1P<sub>2</sub>-negativen XS52 Zellen demonstrierte (Abb. 3.1.6.5B).

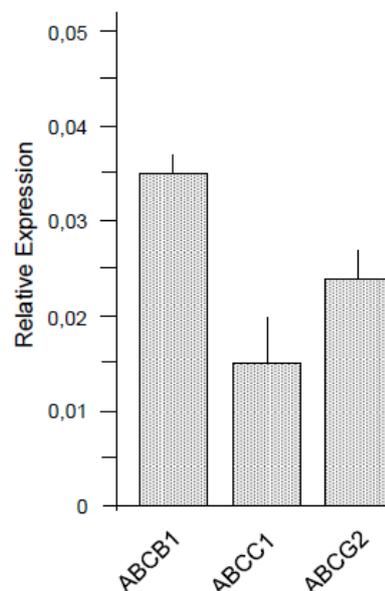


**Abb. 3.1.6.5 S1P<sub>2</sub>-Rezeptorabhängigkeit der Endozytose und PI3K-Aktivität in den XS52 Zellen.** Unbehandelte, mit control siRNA oder mit S1P<sub>2</sub> siRNA transfizierte XS52 Zellen wurden in Anwesenheit von 5  $\mu$ M S1P bzw. des Kontrollvehikels 15 min lang in einer FITC-Dextran (1 mg/ml) Lösung bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die XS52 Zellen mittels FACS hinsichtlich der FITC-Fluoreszenzintensität untersucht. Nach dem Abzug der entsprechenden MFI der bei 4 °C behandelten Kontrollzellen von dem jeweiligen Ziel-MFI-Wert wurde die relative Endozytoserate kalkuliert (A). Die analog der FACS-Untersuchung vorbehandelten XS52 Zellen wurden mit 5  $\mu$ M S1P oder dem Kontrollvehikel für 15 min inkubiert und anschließend hinsichtlich der Akt-Phosphorylierung mittels Western Blot untersucht. Als Proteinladekontrolle diente die Bestimmung der gesamten Akt-Menge (B). \*p<0,05

## 3.2 Bedeutung der ABC-Transporter für die Antigenaufnahme durch dendritische Zellen

### 3.2.1 Expression der ABC-Transporter in den XS52 Zellen

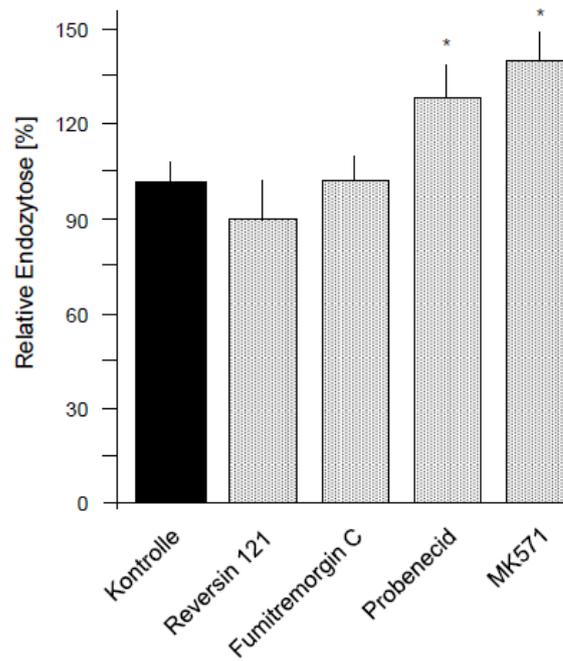
Der intrazellulär gebildete Lipidmediator S1P kann über ABC-Transporter aus dem Zytoplasma sezerniert werden und anschließend extrazellulär über die Aktivierung der S1P-Rezeptoren die Homöostase der Zellen beeinflussen. Zu den prominentesten, für den Export von S1P verantwortlichen ABC-Transportern gehören ABCB1, ABCC1 und ABCG2 (Kim et al., 2009). Im Hinblick auf eine mögliche Beteiligung des endogenen S1P an der Endozytoseregulation in den DC`s wurde die Expression der genannten ABC-Transporter in den XS52 Zellen analysiert. Dazu wurde der Gehalt an mRNA-Transkripten der Transporter ABCB1, ABCC1, ABCG2 über eine quantitative Real-Time PCR Analyse charakterisiert und gegen die beiden Referenzgene GAPDH/HPRT1 normalisiert. Es konnten alle drei ABC-Transporter in den XS52 Zellen identifiziert werden (Abb. 3.2.1).



**Abb. 3.2.1 Expression von ABC-Transportern in den XS52 Zellen.** Die aus drei verschiedenen Kulturansätzen der XS52 Zellen isolierte mRNA wurde jeweils in cDNA umgeschrieben und anschließend mittels Real-Time PCR hinsichtlich der ABC-Transporterexpression analysiert. Die Normalisierung erfolgte gegen die beiden Referenzgene GAPDH und HPRT1. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um die jeweiligen Mittelwerte von den drei unabhängigen Versuchen.

### 3.2.2 Einfluss der ABC-Transporter Hemmung auf die Endozytose von FITC-Dextran

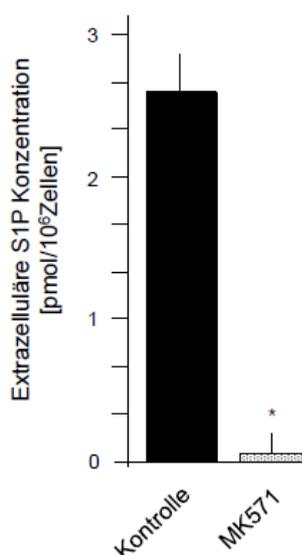
Die im Abschnitt 3.1.6.5 beschriebene basale Endozytoserate, welche nach der Reduktion der S1P<sub>2</sub>-Rezeptorexpression in den XS52 Zellen gesteigert wurde, suggeriert eine autokrine Regulation der Antigenaufnahme durch S1P in den DC`s. Dabei könnte das intrazellulär gebildete S1P über einen ABC-Transporter in den Extrazellularraum kontinuierlich sezerniert werden und über die Aktivierung des S1P<sub>2</sub>-Rezeptors die Endozytoserate der DC`s reduzieren. Eine Erniedrigung der S1P<sub>2</sub>-Rezeptordichte in der Membran würde demzufolge in einer Erhöhung der Antigenaufnahme resultieren, was bereits gezeigt werden konnte. Eine weitere Möglichkeit die Endozytoserate zu steigern, wäre die Hemmung des entsprechenden ABC-Transporters. Die damit verbundene Unterdrückung der S1P-Sekretion würde eine Reduktion der S1P<sub>2</sub>-Rezeptorstimulation und letztendlich die Erhöhung der Endozytoserate zur Folge haben. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die XS52 Zellen mit dem jeweiligen ABC-Transporter-Inhibitor für sechs Stunden inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch hinsichtlich der FITC-Dextran-Aufnahme analysiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Hemmung der Transporter ABCB1 mit 10 µM Reversin 121 und ABCG2 mit 10 µM Fumitremorgin C führte zu keiner signifikanten Erhöhung der Endozytoserate gegenüber den Kontrollzellen. Die Inkubation der XS52 Zellen mit dem unselektiven ABCC-Inhibitor Probenecid (2,5 mM) bzw. dem spezifischen ABCC1-Hemmstoff MK571 (15 µM) zeigte dagegen eine signifikant gesteigerte Endozytoserate in den XS52 Zellen gegenüber der Kontrolle (Abb. 3.2.2). Diese Beobachtung konnte den ersten Beweis erbringen, dass der ABCC1-Transporter an der S1P-Sekretion beteiligt sein könnte und ein Teil des autokrinen S1P-Regulationsmechanismus hinsichtlich der Endozytose in den DC`s darstellt.



**Abb. 3.2.2 ABC-Transporterabhängigkeit der Endozytose in den XS52 Zellen.** XS52 Zellen wurden für 6 Stunden mit 10  $\mu$ M Reversin 121, 10  $\mu$ M Fumitremorgin C, 2,5 mM Probenecid, 15  $\mu$ M MK571 oder Kontrollvehikel vorstimuliert und danach 15 min lang in einer FITC-Dextran (1 mg/ml) Lösung bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die XS52 Zellen mittels FACS hinsichtlich der FITC-Fluoreszenzintensität untersucht. Nach dem Abzug der entsprechenden MFI der bei 4 °C behandelten Kontrollzellen von dem jeweiligen Ziel-MFI-Wert wurde die relative Endozytoserate kalkuliert. \* $p < 0,05$

### 3.2.3 Einfluss des ABCC1-Transporters auf die extrazellulären S1P-Spiegel

Die Erhöhung der Endozytoserate in den XS52 Zellen, welche durch die Anwesenheit von MK571 induziert worden ist, sollte im nächsten Schritt als Folge einer verminderten Sekretion von S1P verifiziert werden. Dazu wurden die Zellüberstände nach der Inhibierung des ABCC1-Transporters in den XS52 Zellen hinsichtlich des S1P-Gehalts analysiert. Die XS52 Zellen wurden analog den durchflusszytometrischen Untersuchungen für sechs Stunden mit 15  $\mu\text{M}$  MK571 inkubiert. Anschließend wurde das jeweilige Inkubationsmedium abgenommen und einer quantitativen S1P-Bestimmung mittels LC-MS/MS unterzogen. Als Kontrolle dienten unstimulierte XS52 Zellen. Die Hemmung des ABCC1-Transporters in den DC's zeigte einen stark verringerten S1P-Gehalt im Kulturmedium gegenüber der unstimulierten Kontrolle. Diese Erkenntnis bestätigte die autokrine Regulation der Endozytoserate durch das endogene S1P in den XS52 Zellen, was bei der Hemmung des ABCC1-Transporters hinsichtlich der FITC-Dextran-Aufnahme bereits beobachtet worden ist (Abb. 3.2.3).



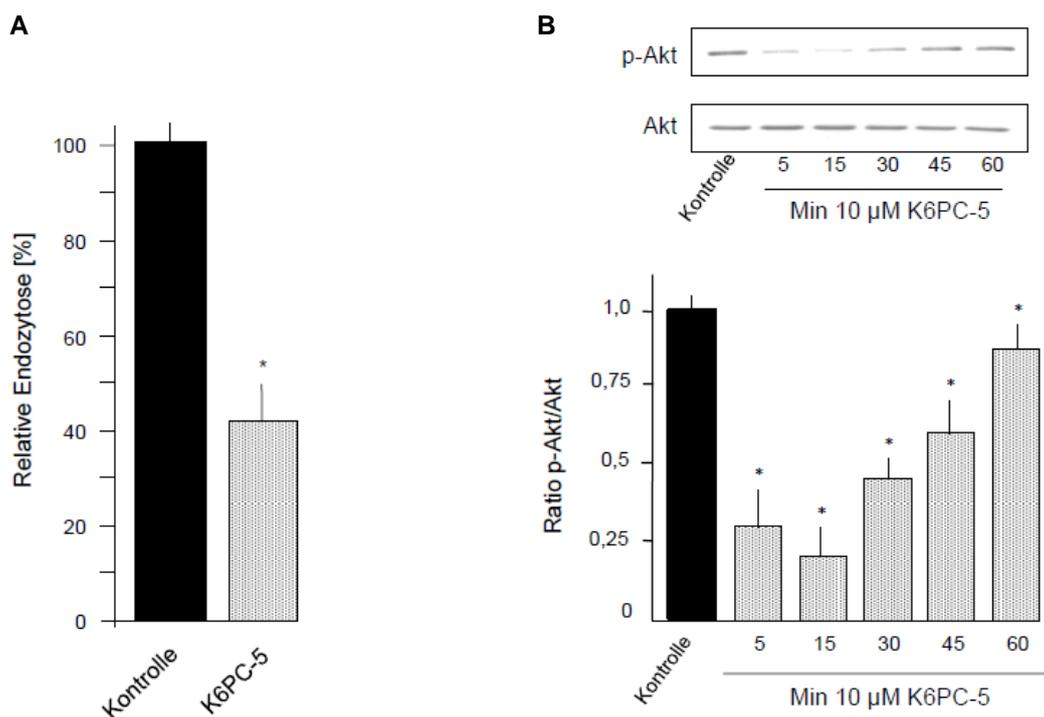
**Abb. 3.2.3 Extrazelluläre S1P-Spiegel in den XS52 Zellen.** XS52 Zellen wurden für 6 Stunden mit 15  $\mu\text{M}$  MK571 oder Kontrollvehikel stimuliert. Im Anschluss wurden die jeweiligen XS52 Kulturmedien abgenommen und mittels LC-MS/MS hinsichtlich des S1P-Gehalts untersucht. \* $p < 0,05$

### **3.3 Bedeutung der SphK1 für die Antigenaufnahme durch dendritische Zellen**

#### **3.3.1 Einfluss der SphK1-Aktivierung auf die Endozytose von FITC-Dextran und PI3K-Aktivität**

Bei den SphK handelt es sich um eine Gruppe von Isoenzymen, SphK1 und SphK2, welche die Biosynthese von S1P katalysieren. Die Aktivierung der SphK1, die im Zytosol bzw. in der Plasmamembran lokalisiert ist, führt zu einer erhöhten Umwandlung von Sphingosin zu dem aktiven Lipidmediator S1P. Dieser kann einerseits als sekundärer Botenstoff an intrazellulären Signaltransduktionen beteiligt sein. Andererseits entfaltet S1P seine Wirkung über die Aktivierung von S1P-Rezeptoren, was extrazellulär nach erfolgreicher Sekretion aus dem Zellinnenraum erfolgen kann (Takabe et al., 2008). Der aktive Transport von S1P über ABCC1 aus dem Zytoplasma und die damit verbundene Regulation der Endozytose über den S1P<sub>2</sub>-Rezeptor konnten bereits in den DC`s nachgewiesen werden. Die Erhöhung der endogenen S1P-Produktion durch den Einsatz eines SphK1-Aktivators wurde im nachfolgenden als weiterer Beweis für die Sphingolipid-vermittelte autokrine Regulation der Antigenaufnahme in den DC`s herangezogen. Dazu wurde der neue SphK1-Modulator K6PC-5 verwendet. Für diese Verbindung konnte ein Effekt bezüglich des Keratinozytenwachstums gezeigt werden, welcher der extrazellulären S1P-Applikation vergleichbar ist. Die dem exogenen S1P analoge Proliferationsmodulation dieser epidermalen Zellen konnte jedoch nicht mehr im Rahmen einer Inhibierung der SphK1 beobachtet werden und führte zur Etablierung von K6PC-5 als SphK1-Aktivator (Hong et al., 2008). Zur Steigerung der S1P-Biosynthese wurden folglich die XS52 Zellen mit 10 µM K6PC-5 stimuliert und hinsichtlich der FITC-Dextran Endozytose durchflusszytometrisch vermessen. Parallel dazu wurde die Akt-Phosphorylierung als PI3K-Aktivitätsindikator in Abhängigkeit von der K6PC-5-Stimulationsdauer mittels Western Blot untersucht. Als Kontrolle dienten unstimulierte XS52 Zellen. Die erhöhte SphK1-Enzymaktivität resultierte in einer signifikanten Erniedrigung der FITC-Dextran-Aufnahme durch K6PC-5 stimulierte XS52 Zellen gegenüber der Kontrolle und bestätigte die Regulation der Endozytose in

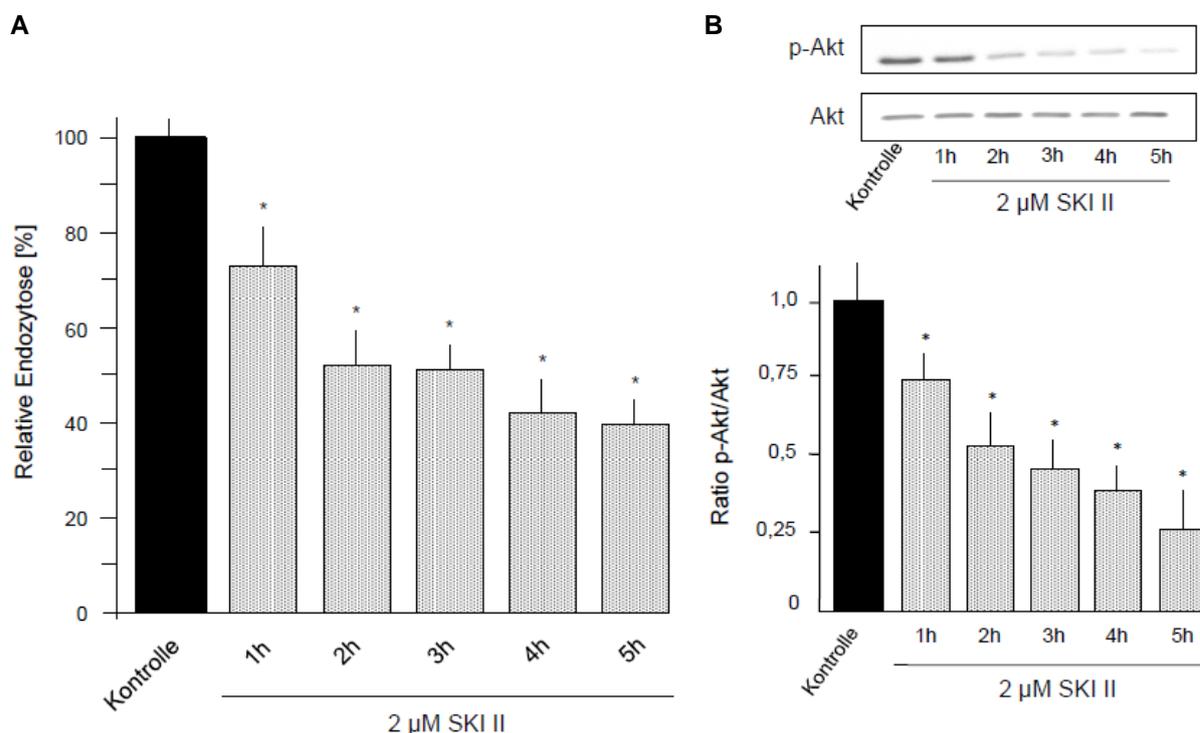
den DC's durch das endogene S1P (Abb. 3.3.1A). Die Analyse der Akt-Phosphorylierung nach der Inkubation der XS52 Zellen mit K6PC-5 zeigte eine Zeitabhängigkeit der PI3K-Aktivität, welche der extrazellulären S1P-Stimulation vergleichbar ist. Die Anwesenheit von K6PC-5 führte zu einer signifikanten Hemmung der Akt-Phosphorylierung. Die maximale inhibitorische Wirkung des SphK1-Aktivators konnte dabei nach 15 Minuten beobachtet werden und erwies sich analog der S1P-Wirkung. Weiterhin wurde auch eine Abschwächung des inhibitorischen Effekts von K6PC-5 mit zunehmender Stimulationsdauer der XS52 Zellen sichtbar, was ebenfalls dem Effekt des extrazellulär zugeführten S1P entspricht (Abb. 3.3.1B). Die Erhöhung der endogenen S1P-Biosynthese resultierte somit in einem biologischen Verhalten der XS52 Zellen, welches der exogenen S1P-Anwesenheit vergleichbar ist.



**Abb. 3.3.1 Endozytose und PI3K-Aktivität in den XS52 Zellen nach SphK1-Aktivierung.** XS52 Zellen wurden in Anwesenheit von 10  $\mu$ M K6PC-5 bzw. des Kontrollvehikels 15 min lang in einer FITC-Dextran (1 mg/ml) Lösung bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die XS52 Zellen mittels FACS hinsichtlich der FITC-Fluoreszenzintensität untersucht. Nach dem Abzug der entsprechenden MFI der bei 4 °C behandelten Kontrollzellen von dem jeweiligen Ziel-MFI-Wert wurde die relative Endozytoserate kalkuliert (A). XS52 Zellen wurden mit 10  $\mu$ M K6PC-5 über verschiedene Zeiträume behandelt und anschließend hinsichtlich der Akt-Phosphorylierung mittels Western Blot untersucht. Als Proteinladekontrolle diente die Bestimmung der gesamten Akt-Menge (B). \* $p < 0,05$

### 3.3.2 Einfluss der SphK1-Hemmung auf die Endozytose von FITC-Dextran und PI3K-Aktivität

Zur Verifizierung der Abhängigkeit der Endozytose in den DC`s von der endogenen S1P-Produktion bzw. SphK1-Aktivität wurde im nächsten Schritt die Antigenaufnahmefähigkeit durch die DC`s in Gegenwart eines SphK1-Inhibitors erforscht. Trotz aller Anstrengungen bei der Untersuchung des Sphingolipid-Signalweges gibt es nur wenige etablierte Inhibitoren der SphK1. Der Einsatz von Sphingosin Analoga, insbesondere von *N,N*-Dimethylsphingosin, kann neben der Hemmung der SphK auch verschiedene Proteinkinasen in ihrer Aktivität modulieren und somit die Analysen verfälschen (Kim et al., 2005). Der vor kurzem entwickelte Inhibitor der SphK SKI II weist eine Selektivität gegenüber dem Isoenzym SphK1 auf. Weiterhin findet bei der effektiven Konzentration von SKI II keine Aktivitätsbeeinflussung von zellulären Proteinkinasen statt, was die Eignung für Zellversuche bestätigt (French et al., 2003). Die Reduktion der intrazellulären S1P-Biosynthese durch den Einsatz von SKI II zeigte in Bezug auf die Antigenaufnahme bzw. PI3K-Aktivität eine unerwartete Modulation der XS52 Zellen durch den SphK1-Hemmstoff. Im Sinne eines autokrinen Regulationsmechanismus der Endozytose durch S1P sollte eine Reduktion der endogenen S1P-Biosynthese eine verringerte Stimulation des S1P<sub>2</sub>-Rezeptorsubtyps und somit eine Steigerung der Antigenaufnahme zur Folge haben. Die Vorinkubation der XS52 Zellen mit 2 µM SKI II über verschiedene Zeiträume führte jedoch bei der durchflusszytometrischen Untersuchung zu einer zeitabhängigen Abnahme der FITC-Dextran-Aufnahme. Mit zunehmender Inkubationsdauer der XS52 Zellen mit SKI II konnte eine steigende Reduktion der Endozytoserate beobachtet werden, wobei eine signifikante Erniedrigung nach bereits einer Stunde sichtbar wurde (Abb. 3.3.2A). Die parallel dazu durchgeführte Western Blot Analyse hinsichtlich der Akt-Phosphorylierung wies ebenfalls eine zeitabhängige Abnahme der PI3K-Aktivität in Anwesenheit des SphK1-Inhibitors auf. In Übereinstimmung mit dem FACS-Versuch konnte eine Erniedrigung der Phosphorylierung von Akt mit zunehmender SKI II-Stimulationsdauer beobachtet werden (Abb. 3.3.2B). In den nachfolgenden Kapiteln wurde die Ursache für die Abnahme der Endozytoserate analysiert, welche unerwartet durch eine Reduktion der intrazellulären S1P-Biosynthese verursacht worden ist.

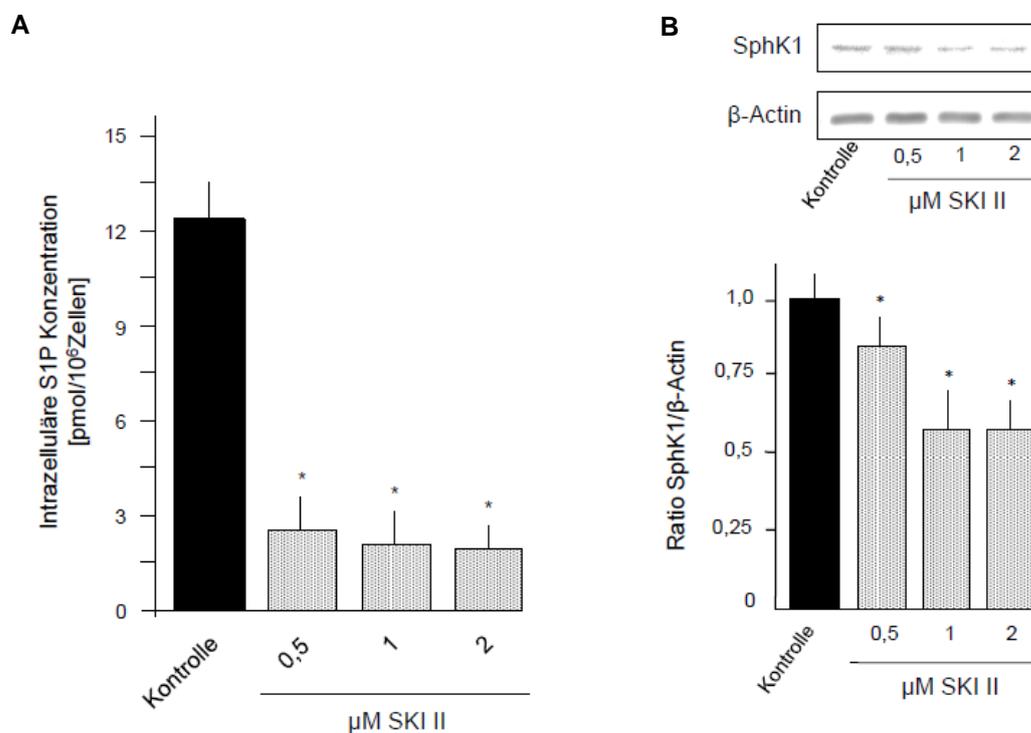


**Abb. 3.3.2 Endozytose und PI3K-Aktivität in den XS52 Zellen nach SphK1-Inhibierung.** XS52 Zellen wurden über verschiedene Zeiträume mit dem SphK1-Hemmstoff SKI II (2 µM) oder Kontrollvehikel vorstimuliert und danach 15 min lang in einer FITC-Dextran (1 mg/ml) Lösung bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die XS52 Zellen mittels FACS hinsichtlich der FITC-Fluoreszenzintensität untersucht. Nach dem Abzug der entsprechenden MFI der bei 4 °C behandelten Kontrollzellen von dem jeweiligen Ziel-MFI-Wert wurde die relative Endozytoserate kalkuliert (A). XS52 Zellen wurden mit 2 µM SKI II über verschiedene Zeiträume behandelt und anschließend hinsichtlich der Akt-Phosphorylierung mittels Western Blot untersucht. Als Proteinladekontrolle diente die Bestimmung der gesamten Akt-Menge (B). \*p<0,05

### 3.3.2.1 Überprüfung der inhibitorischen Wirkung von SKI II

Die Wirkung von SKI II beruht auf der Hemmung der SphK1, wobei gezeigt werden konnte, dass die Reduktion der S1P-Biosynthese in Anwesenheit des Inhibitors durch einen lysosomalen Abbau des Enzyms erreicht werden kann (Ren et al., 2010). Die Überprüfung der intrazellulären S1P-Spiegel sowie der SphK1-Proteinexpression nach der Stimulation der DC's mit SKI II wurde somit als ein Kriterium für die korrekte Wirkungsweise des Hemmstoffs herangezogen. Dazu wurden die XS52 Zellen mit verschiedenen SKI II-Konzentrationen zwanzig Stunden lang inkubiert. Als Kontrolle dienten unstimulierte XS52 Zellen. Anschließend wurden die Zellen gewaschen,

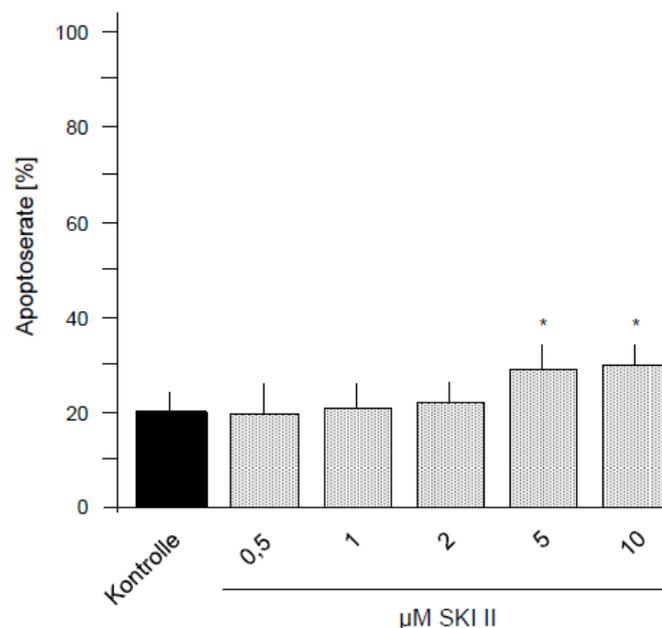
gezählt und einer quantitativen Bestimmung des intrazellulären S1P-Gehalts mittels LC-MS/MS unterzogen. Die Hemmung der SphK1 zeigte bereits bei einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  SKI II einen signifikant verringerten intrazellulären S1P-Gehalt gegenüber der Kontrolle und bestätigte die inhibitorische Wirkung von SKI II bezüglich der S1P-Biosynthese (Abb. 3.3.2.1A). Auch die analoge Untersuchung der SphK1-Expression mittels Western Blot wies eine Reduktion der Enzymexpression in Anwesenheit von SKI II auf, welche auf den lysosomalen Abbau des Proteins zurückgeführt werden kann (Abb. 3.3.2.1B). Die beiden durchgeführten Funktionsprüfungen konnten die richtige Wirkungsweise des Inhibitors hinsichtlich der SphK1-Hemmung in den XS52 Zellen einwandfrei bestätigen.



**Abb. 3.3.2.1 Intrazelluläre S1P-Spiegel und SphK1-Expression in den XS52 Zellen.** XS52 Zellen wurden für 20 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen an SKI II oder Kontrollvehikel stimuliert. Im Anschluss wurden die jeweiligen XS52 Zellansätze geerntet und mittels LC-MS/MS hinsichtlich des S1P-Gehalts untersucht (A) bzw. hinsichtlich der SphK1-Proteinexpression mittels Western Blot analysiert. Als Proteinladekontrolle diente die Bestimmung der  $\beta$ -Actin-Menge (B). \* $p < 0,05$

### 3.3.2.2 Apoptoseverhalten der XS52 Zellen nach SKI II-Stimulation

Eine Möglichkeit die Endozytoserate der DC`s durch die Anwesenheit von SKI II zu erniedrigen, besteht in der Störung des zellulären Stoffwechsels durch das Einleiten der Apoptose. Diese führt zum Absterben der Zellen und kann dadurch die Antigenaufnahme erheblich reduzieren (Nicolo et al., 2001). Die Untersuchung der SKI II-Wirkung im Bezug auf den programmierten Zelltod sollte aufzeigen, ob die erniedrigte Antigenaufnahme durch die DC`s auf diesen Effekt zurückzuführen ist. Dazu wurden die XS52 Zellen mit verschiedenen SKI II-Konzentrationen über einen Zeitraum von sechzehn Stunden stimuliert, als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Die durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate schloss eine proapoptotische Wirkung des SphK1-Inhibitors bei Konzentrationen bis 2  $\mu\text{M}$  aus. Die Stimulation der Zellen mit SKI II zeigte erst ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate der behandelten XS52 Zellen gegenüber der Kontrolle (Abb. 3.3.2.2).



**Abb. 3.3.2.2 Apoptoseverhalten der XS52 Zellen.** XS52 Zellen wurden für 16 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an SKI II bzw. Kontrollvehikel inkubiert. Nach der Anfärbung der Zellen mit AnnexinV-APC und PI erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate. \* $p < 0,05$

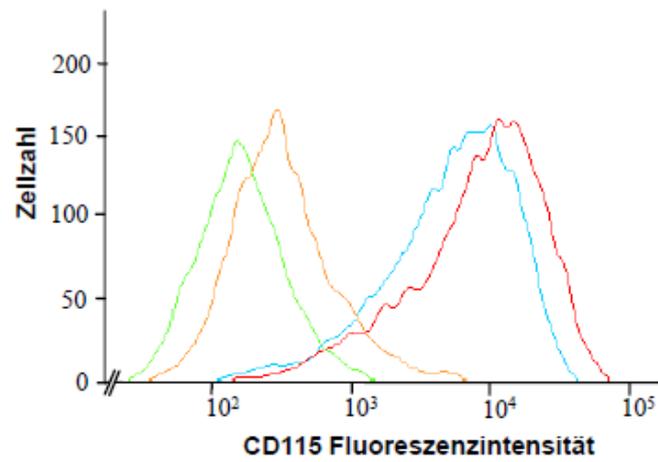
### 3.3.2.3 Differenzierungsstatus der XS52 Zellen nach SKI II-Stimulation

Das Endozytoseverhalten der DC`s ist stark von ihrem Differenzierungsstatus abhängig. Während die unreifen DC`s eine hohe Endozytoserate aufweisen, nimmt diese im Laufe der Differenzierung zu reifen DC`s ab (Platt et al., 2010). Im Abschnitt 3.1.3.2 konnte bereits keine Beeinflussung der DC`s im Hinblick auf ihren Reifegrad durch extrazellulär zugeführtes S1P gezeigt werden. Analog dazu wurde im nachfolgenden die Expressionsänderung der Oberflächenmarker CD115 und CD86 nach der Stimulation der XS52 Zellen mit dem SphK1-Inhibitor SKI II überprüft. Dazu wurden die XS52 Zellen mit 2  $\mu$ M SKI II zunächst über einen Zeitraum von sechzehn Stunden behandelt. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte, als Positivkontrolle LPS-stimulierte XS52 Zellen. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Zellen hinsichtlich der Expression des CD115- und des CD86-Oberflächenmarkers. Wie an den Histogrammen eindeutig zu erkennen ist, führte die Anwesenheit des SphK1-Inhibitors zu einer Zunahme der CD86- und Abnahme der CD115-Fluoreszenzintensität. Die LPS-Anwesenheit als Positivkontrolle zeigte ebenfalls eine der SKI II-Stimulation ähnliche Modulation der Expression der beiden Reifemarker. Diese Beobachtung bestätigte die Ausreifung der XS52 Zellen, welche im Rahmen der SphK1-Hemmung über einen Zeitraum von sechzehn induziert worden ist (Abb. 3.3.2.3A).

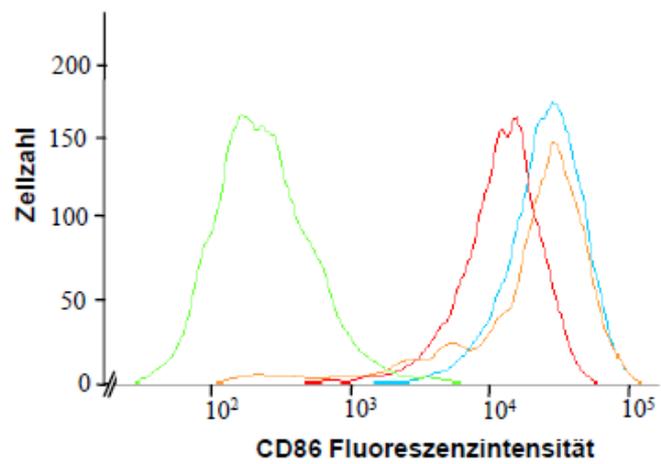
Eine signifikante Reduktion der FITC-Dextran-Aufnahme durch die XS52 Zellen gegenüber der unbehandelten Kontrolle konnte bereits nach einer Stunde Stimulation mit SKI II beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt die Kinetik der SKI II-induzierten Ausreifung der DC`s analysiert, um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsstatus und der Endozytoserate darstellen zu können. Dazu wurden die XS52 Zellen mit 2  $\mu$ M SKI II über verschiedene Zeiträume behandelt und anschließend durchflusszytometrisch hinsichtlich der Expression der beschriebenen Oberflächenmarker untersucht. Die Stimulation der DC`s mit dem SphK1-Inhibitor zeigte eine kontinuierliche Zunahme des CD86- und Abnahme des CD115-Markers auf den XS52 Zellen. Damit konnte die Korrelation zwischen dem zunehmenden Reifegrad und der abnehmenden Endozytoserate der DC`s eindeutig bestätigt werden (Abb. 3.3.2.3B).

Darüber hinaus wurde der Einfluss von extrazellulär substituierten S1P auf den Differenzierungsstatus der XS52 Zellen während der SphK1-Hemmung analysiert. S1P ist einerseits dazu in der Lage, nach der Sekretion aus dem Zellinneren über die Aktivierung von S1P-Rezeptoren seine Wirkung zu entfalten. Auf der anderen Seite kann das Sphingolipid auch als sekundärer Botenstoff an intrazellulären Signalkaskaden beteiligt sein. Extrazellulär zugeführtes S1P während der SphK1-Hemmung erlaubt somit eine Aussage über den Signalweg, welcher für die Aufrechterhaltung des unreifen Differenzierungsstatus verantwortlich ist. Dazu wurden die XS52 Zellen mit 2  $\mu\text{M}$  SKI II über einen Zeitraum von fünf Stunden in Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  S1P inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch hinsichtlich der Expression der beiden Differenzierungsmarker untersucht. Als Kontrolle diente die Stimulation der DC`s mit 2  $\mu\text{M}$  SKI II, 10  $\mu\text{M}$  S1P oder dem Vehikel. Die Stimulation der DC`s mit dem SphK1-Inhibitor zeigte eine Zunahme des CD86- und Abnahme des CD115-Markers auf der XS52 Zelloberfläche. Diese Veränderung des Differenzierungsstatus konnte jedoch nicht in Anwesenheit von S1P verhindert bzw. moduliert werden. Dies deutet auf eine Regulation des Reifezustands der DC`s nicht durch extrazellulär, sondern durch intrazellulär agierendes S1P hin (Abb. 3.3.2.3C).

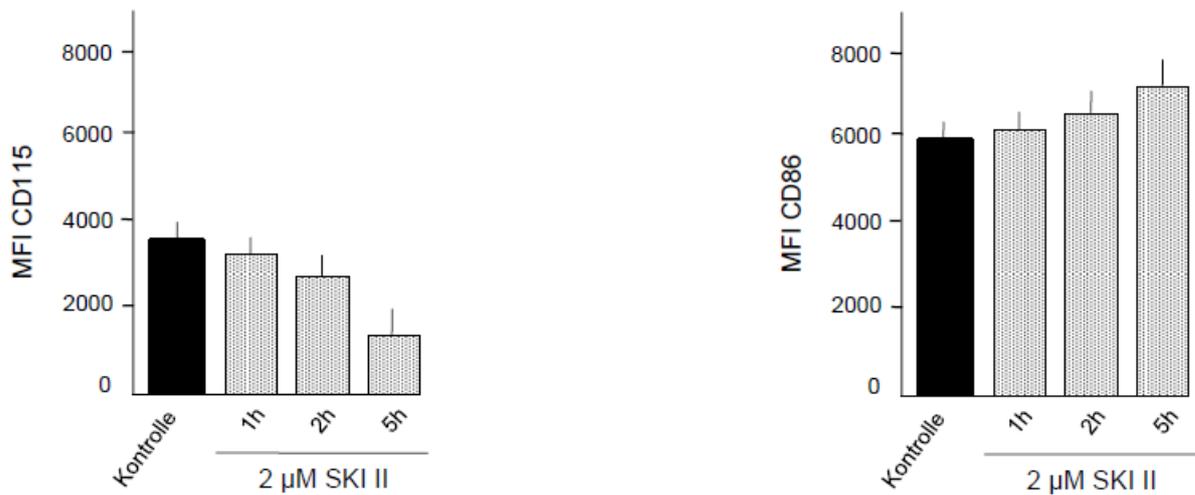
A



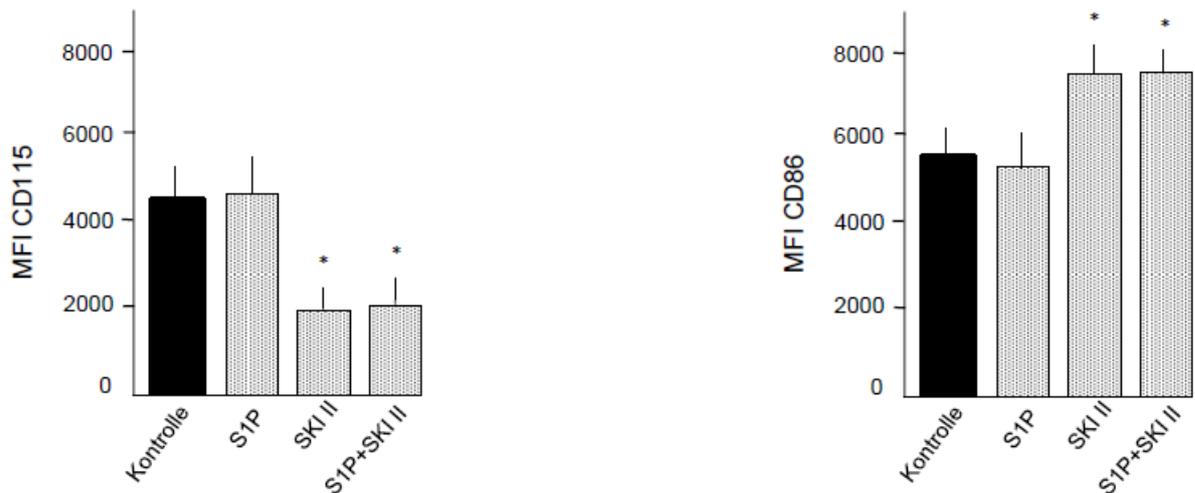
- Isotypen Kontrolle
- SKI II
- LPS
- Kontrolle



B



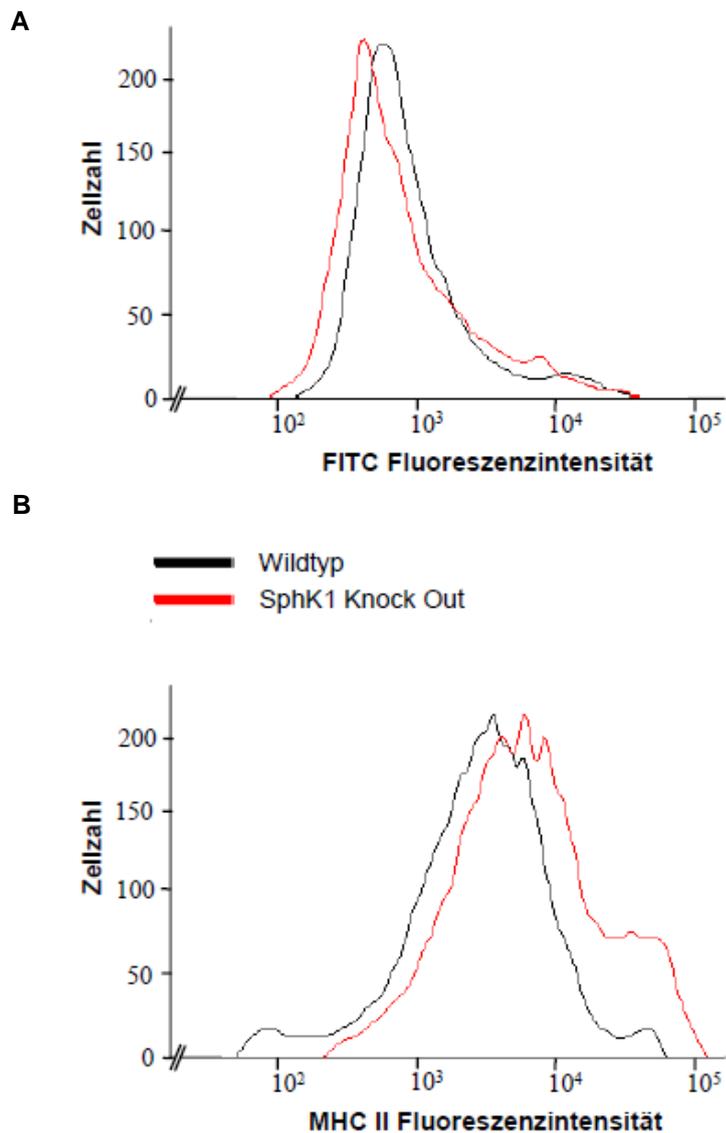
C



**Abb. 3.3.2.3 Differenzierungsstatus der XS52 Zellen.** XS52 Zellen wurden für 16 Stunden mit 2 µM SKI II, 10 ng/ml LPS oder Kontrollvehikel inkubiert. Nach der Anfärbung der Zellen mit Anti-CD115-APC-Antikörper und Anti-CD86-PE-Antikörper erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der Expression der entsprechenden Oberflächenmarker. Die Histogramme eines exemplarischen Experiments zeigen Fluoreszenzintensitäten der jeweiligen gebundenen Antikörper der einzelnen Proben (A). XS52 Zellen wurden mit 2 µM SKI II oder Kontrollvehikel über verschiedene Zeiträume inkubiert. Nach der durchflusszytometrischen Untersuchung der entsprechend angefärbten Zellen wurde die Expression der CD86/CD115-Oberflächenmarker über die MFI bestimmt (B). XS52 Zellen wurden mit 2 µM SKI II, 10 µM S1P, den beiden Substanzen zusammen oder dem Kontrollvehikel über einen Zeitraum von 5 Stunden inkubiert. Nach der durchflusszytometrischen Untersuchung der entsprechend angefärbten Zellen wurde die Expression der CD86/CD115-Oberflächenmarker über die MFI bestimmt (C).

### 3.3.2.4 Endozytose von FITC-Dextran und Differenzierungsstatus in SphK1-Knock-out-BM-DC`s

Die Anwesenheit des SphK1-Inhibitors SKI II zeigte eine unerwartete Reduktion der Antigenaufnahme in den XS52 Zellen, die auf eine Verschiebung des Reifegrades zurückgeführt werden konnte. Um zu zeigen, dass dieser Effekt nicht substanzspezifisch, sondern mit der entsprechenden Hemmung der SphK1 bzw. der intrazellulären S1P-Signaltransduktion zu begründen ist, wurden die Endozytoserate und der Differenzierungsstatus in Abhängigkeit von der SphK1-Expression untersucht. Dazu wurden Wildtyp- bzw. SphK1-Knock-out-BM-DC`s aus der entsprechenden Knochenmarkzellen unter identischen Bedingungen generiert und anschließend durchflusszytometrisch hinsichtlich der FITC-Dextran-Aufnahme analysiert. Parallel dazu wurde die Expression des Markers MHC II auf der Zelloberfläche der BM-DC`s überprüft. Bei dem MHC II-Protein handelt es sich um einen Indikator für den Reifestatus, dessen Expression in der Plasmamembran mit dem Reifegrad der DC`s korreliert. Im Fall der BM-DC`s wurde die Analyse der MHC II-Expression an Stelle der beiden in den XS52 Zellen untersuchten Marker CD86/CD115 vorgenommen, da diese ebenfalls eine Aussage zum Reifestatus der Zellen erlaubt. Darüber hinaus schränkte die experimentelle Anordnung des Versuches die Analyse der beiden anderen Oberflächenmarker ein. In Übereinstimmung mit der SKI II-induzierten Endozytosemodulation zeigte die Abwesenheit der SphK1 in den BM-DC`s eine verringerte Aufnahmefähigkeit von Antigenen gegenüber den Wildtyp-BM-DC`s. Es konnte ebenfalls ein reiferer Differenzierungsstatus der SphK1-defizienten BM-DC`s als Ursache für dieses Endozytoseverhalten beobachtet werden. Wie an den Histogrammen eindeutig zu erkennen ist, führte die Abwesenheit der SphK1 im Vergleich zum Wildtyp zu einer Abnahme der FITC-Fluoreszenzintensität, welche ein Maß für die Dextran-Aufnahme bzw. Endozytose durch die Zellen darstellt (Abb. 3.3.2.4A). Eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität des MHC II-Oberflächenmarkers in den SphK1-defizienten BM-DC`s gegenüber dem Wildtyp bestätigte ihren reiferen Differenzierungsstatus, was als Ursache für die Reduktion der Endozytoserate angesehen werden kann (Abb. 3.3.2.4B).



**Abb. 3.3.2.4 Endozytose und Differenzierungsstatus der Wildtyp- bzw. SphK1-Knock-out-BM-DC's.** Die am 10. Tag der DC-Generierung aus murinem Wildtyp- bzw. SphK1-Knock-out-Knochenmark gewonnene Zellen wurden 15 min lang in einer FITC-Dextran (1 mg/ml) Lösung bei 37 °C inkubiert. Nach der Immunfärbung der Zellen mit CD11c- / MHC II- Antikörpern, zwecks Identifizierung der BM-DC-Population, wurde diese mittels FACS-Analyse hinsichtlich der FITC-Fluoreszenzintensität untersucht (A). Weiterhin wurde die jeweilige BM-DC-Population hinsichtlich der MHC II-Expression über die Bestimmung der APC-Fluoreszenzintensität analysiert (B). Die Histogramme eines exemplarischen Experiments zeigen die FITC- bzw. APC-Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Proben.

## **4. Diskussion**

---

## 4.1 Bedeutung des exogenen S1P für die endozytotische Aktivität der DC`s

Die endozytotische Aktivität der unreifen DC`s spielt eine Schlüsselrolle in der Initiierung von Immunantworten. So führt die Aufnahme von Antigenen durch diese APC`s zur Einleitung einer Signalkaskade, die in einer effizienten, von Lymphozyten vermittelten Abwehr mündet. Diese hat unter physiologischen Bedingungen die Aufgabe den Körper vor Fremdeinflüssen wie zum Beispiel Mikroorganismen zu schützen. In Hinblick auf immunologische Dysregulation führt diese jedoch auch zur Entstehung von Krankheitsbildern wie der Atopischen Dermatitis. Bei dieser immunologischen Hauterkrankung handelt es sich um eine T-Lymphozyten-vermittelte Überempfindlichkeitsreaktion auf einen wiederholten Kontakt mit einem Allergen bzw. Hapten. Dabei nehmen die unreifen DC`s der Haut eine Schlüsselposition im ersten Schritt der Krankheitsprogression, der Sensibilisierungsphase, ein (Enk et al., 1992; Freudenberg et al., 2009). Während dieses Prozesses kommt es zunächst zu einer Penetration des Allergens bzw. Haptens durch die Hornhautbarriere hindurch und der anschließenden Entstehung eines vollständigen Antigens, was durch die Reaktion des eingedrungenen Haptens mit körpereigenen Molekülen vollzogen wird. Die Internalisierung der entstandenen Antigene durch die unreifen, endozytotisch aktiven DC`s und damit verbundene Präsentation des prozessierten Antigens über MHC II auf der Zelloberfläche, bildet die Aktivierungsgrundlage der T-Lymphozyten und leitet die immunologische Dysregulation ein (Basketter et al., 1995). So führt die klonale Expansion der Allergen- bzw. Hapten-spezifischen T-Lymphozyten bei einem erneuten Allergenkontakt zu einer entzündlichen Hautreaktion, die mit Rötung, Pusteln und Schuppung der Haut einhergeht (Kimber et al., 2002). Die experimentelle Kontakthypersensibilität (CHS) stellt im Hinblick auf diese Hauterkrankung eins der am intensivsten untersuchten Tiermodelle zur Analyse der zugrunde liegenden, immunologischen Mechanismen dar. In diesem Modell findet zunächst eine Sensibilisierung der Tiere mit einem Hapten (Sensibilisierungsphase) statt. Eine wiederholte Verabreichung des Haptens (Auslösephase) resultiert in einer T-Zell-vermittelten Immunantwort und löst eine Entzündungsreaktion auf der Hapten-exponierten Haut aus. So kann mit Hilfe dieses Tiermodells die Rolle von Immunmodulatoren wie die von S1P bei dieser Erkrankung sowohl in der

Sensibilisierungs- als auch in der Auslösephase evaluiert werden (Christensen et al., 2012; Rose et al., 2012).

Bei dem Sphingolipid S1P handelt es sich um eine potente bioaktive Verbindung, die eine Vielzahl an zellulären Prozessen regelt, wobei die immunologische Homöostase von dieser Regulation besonders stark betroffen ist (Spiegel et al., 2011). Die Untersuchung der Wirkung von topisch appliziertem S1P im CHS-Modell bestätigt dabei die immunmodulatorische Wirkung des Lipidmediators. So kann gezeigt werden, dass die Anwesenheit von S1P oder von FTY720 in der Haut zu einer starken Abschwächung der entzündlichen Hautreaktion sowohl in der Sensibilisierungsphase als auch bei einer wiederholten Allergengabe (Auslösephase) führt. S1P reduziert nicht nur das Gewicht der angrenzenden Lymphknoten, sondern verringerte auch die Anzahl der aus der Haut ausgewanderten DC`s gegenüber der Vehikelbehandlung. Als Ursache für diese anti-inflammatorischen Effekte des topisch applizierten Sphingolipids wird eine Hemmung der Migration der DC`s aus der Haut in die sekundären lymphatischen Organe postuliert (Reines et al., 2009). Tatsächlich kann durch *in vitro* Zellassays gezeigt werden, dass sich die Stimulation der beiden Rezeptoren S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3</sub> in einer chemotaktischen Wirkung auf die DC`s auswirkt und so an der Auswanderung der DC`s aus der Peripherie in die lymphatischen Organe beteiligt ist (Radeke et al., 2005). Dies bestätigt auch ein CD69-Knock-out-Tiermodell, bei dem eine erhöhte S1P<sub>1</sub>-Rezeptorexpression auf den DC`s nachgewiesen werden kann. Diese Tiere zeichnen sich im Rahmen eines CHS-Modells durch eine verstärkte DC-Migration in die sekundären lymphatischen Organe aus (Lamana et al., 2011). Eine lokale Erhöhung der S1P-Konzentration in der Haut kann folglich den migrationsfördernden S1P-Konzentrationsgradienten zerstören. Andererseits können hohe S1P-Spiegeln durch S1P<sub>1</sub>-Rezeptorinternalisierung eine Unempfindlichkeit der DC`s gegenüber dem chemotaktischen Sphingolipid auslösen und so die Entzündungsreaktion im Rahmen des CHS-Modells verhindern (Reines et al., 2009).

Darüber hinaus zeigt die Analyse der Hautbiopsien von gesunden und atopischen Hunden hinsichtlich der S1P-Spiegeln eine Korrelation zwischen der lokalen Konzentration des Sphingolipids und den pathologischen Veränderungen der Haut. So können signifikant reduzierte dermale S1P-Spiegel in den atopischen Läsionen gegenüber dem gesunden Gewebe nachgewiesen werden. Als Ursache für diese Störung der S1P-Homöostase kann eine Dysregulation des Sphingolipid-

Metabolismus angesehen werden. Genetische Untersuchungen der S1P-Lyase-Expression in der atopischen Haut zeigen eine signifikant erhöhte Transkription des entsprechenden Gens nicht nur bei Hunden, sondern auch bei Menschen. Folglich führt die daraus resultierende Erhöhung der S1P-Lyase-Aktivität zu einem verstärkten, irreversiblen Abbau von S1P zu Hexadecenal und Phosphoethanolamin und der damit verbundenen verminderten S1P-Wirkung (Seo et al., 2006; Kumar et al., 2009; Wood et al., 2009; Baumer et al., 2011).

Der anti-inflammatorische Effekt des Sphingolipids im Bezug auf Allergen-induzierte Erkrankungen scheint nicht hautspezifisch zu sein, was Untersuchungen zur Rolle von S1P bei Asthma belegen. Dabei nehmen die DC`s bei der Initiierung und Aufrechterhaltung des allergischen Asthmas eine Schlüsselposition ein und stellen einen idealen, medikamentösen Angriffspunkt gegen diese Erkrankung dar. Die selektive Entfernung der DC`s aus den Atemwegen im Rahmen eines Tiermodells resultiert in einer Aufhebung aller Allergen-induzierten, asthmatischen Ereignisse und liefert damit den Beweis für die außerordentliche Stellung dieser APC`s bei allergischen Atemwegserkrankungen (Lambrecht et al., 2003). Diese essentielle Rolle der DC`s ist dabei wie schon bei der Atopischen Dermatitis in der Lymphozyten-Aktivierung zu sehen, welche durch die MHC-Allergen-Komplexe induziert wird. In diesem Zusammenhang kann in einem Mausmodell gezeigt werden, dass die lokale Applikation von S1P oder auch von FTY720 im Vorfeld der Allergengabe bzw. der damit provozierten Sensibilisierung die Entzündungsreaktionen des allergischen Asthmas stark reduziert (Idzko et al., 2006; Karmouty-Quintana et al., 2012). Auf die sowohl im CHS- als auch im Asthma-Modell beschriebene anti-inflammatorische Wirkung von FTY720 soll im Abschnitt 4.1.4 näher eingegangen werden.

Die Beeinflussung der DC-Funktion durch das Sphingolipid S1P, die mit der beschriebenen immunsuppressiven bzw. antientzündlichen Wirkung verbunden ist, kann ebenfalls für eine Vielzahl an etablierten Immunmodulatoren wie Tacrolimus, Rapamycin und Cilomilast beobachtet werden (Baumer et al., 2005). Es fällt dabei auf, dass die S1P-vermittelten Effekte, ähnlich wie bei Rapamycin, nicht nur auf eine Hemmung der Migration der DC`s zurückgeführt werden können. Es findet ebenfalls eine Inhibierung der Antigenaufnahme durch diese APC`s statt, was im Rahmen der vorliegenden Arbeit eindeutig demonstriert werden kann (Hackstein et al., 2002). Dies zeigt, dass S1P in der Lage ist, die Immunantwort auf mehreren Ebenen zu modulieren, wobei die Beeinflussung bereits in einer sehr frühen Phase, der

Endozytose, auftritt. Damit ist allerdings nicht nur die gewünschte Unterdrückung der Allergen-induzierten Entzündungsreaktionen, sondern auch eine Störung der mikrobiellen Immunantworten oder der Toleranzinduktion durch hohe S1P-Spiegel denkbar.

### **4.1.1 S1P-vermittelte Hemmung der Endozytose in unreifen DC`s**

Die endozytotische Kapazität der DC`s ist stark von dem Differenzierungsstatus dieser APC`s abhängig. Während die in der Peripherie angesiedelten unreifen DC`s eine besonders ausgeprägte Endozytose betreiben können, wird die endozytotische Kapazität im Laufe der Differenzierung zu reifen DC`s herunterreguliert. Die inhibitorische Wirkung von S1P hinsichtlich der Antigenaufnahme beschränkt sich dabei nur auf die unreifen DC`s. Untersuchungen der Endozytoserate von reifen DC`s in Anwesenheit des Sphingolipids resultieren sogar in einem gegenteiligen Effekt. So zeigt die Stimulation der reifen DC`s eine S1P<sub>3</sub>-Rezeptorsubtyp-vermittelte Steigerung der Antigenaufnahme (Maeda et al., 2007; Ocana-Morgner et al., 2011). Im Hinblick auf die Regulation der Immunantworten spielt dies nur eine untergeordnete Rolle, da es nicht ausreichend stark ausgeprägt und notwendigerweise nicht mit der Präsentation der Antigene auf der Zelloberfläche verbunden ist (Ruedl et al., 2001). Im Gegensatz dazu ist die konzentrationsabhängige Hemmung der Antigenaufnahme durch S1P, welche nicht nur bei den unreifen LC`s, sondern auch bei den unreifen BM-DC`s im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtet wird, immunologisch relevant.

Die LC`s, welche in dieser Arbeit durch die epidermalen DC`s sowie die XS52 Zellen repräsentiert werden, bilden den ersten, in der Epidermis angesiedelten, immunregulatorischen Zelltyp der Haut. Dieser Faktor macht diese Subpopulation der DC`s zu einem der am intensivsten studierten Objekte in der Dermatologie. Aufgrund ihrer herausragenden Rolle bei der Initiierung von Immunantworten ist es nicht verwunderlich, dass die zentrale Rolle der LC`s an der Entwicklung der Atopischen Kontaktdermatitis propagiert wird. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch auch, dass die Aufgabe der LC`s noch nicht vollständig geklärt ist und einer kontroversen Betrachtung unterzogen werden sollte (Romani et al., 2012).

Untersuchungen an einem Mausmodell bestätigen, dass nur durch die Injektion von *in vitro* sensibilisierten LC`s oder epidermaler Zellen, nicht jedoch von epidermaler Zellsuspension, bei der im Vorfeld die LC`s entfernt worden sind, eine Atopische Dermatitis im Rahmen eines CHS-Modells provoziert werden kann (Sullivan et al., 1986). Des Weiteren bestätigt die Analyse des CHS-Modells in einem Knock-in-Tiermodell die essentielle Stellung der LC`s in der Pathophysiologie dieser Hauterkrankung. Bei diesem Modell wird in den Langerinlocus ein Diphtherietoxin-Rezeptor inseriert, wodurch Langerin-positive Zellen selektiv aus der Haut depletiert werden können. So zeigt die Entfernung dieser Zellpopulation, der auch LC`s angehören, einerseits eine verminderte CHS-Antwort, was die bereits gewonnenen Erkenntnisse bestätigt (Bennett et al., 2005; Bennett et al., 2007). Auf der anderen Seite liefert das Diphtherie-Modell ein weiteres, widersprüchliches Ergebnis, bei dem die Abwesenheit der Langerin-positiven Zellen keinen Einfluss auf die CHS-Progression besitzt (Kissenpfennig et al., 2005). Des Weiteren zeigt die CHS-Antwort an einem weiteren Diphtherie-Knock-in-Mausmodell ein gegensätzliches Resultat. Bei dieser Untersuchung führt die selektive Entfernung nicht aller Langerin-positiven Zellen, sondern nur die der LC`s zu einer verstärkten Entzündungsreaktion bei den genetisch modifizierten Tieren gegenüber der Kontrolle. Dies deutet auf eine Beteiligung der LC`s bei der Regulation der Immuntoleranz hin (Kaplan et al., 2005). Darüber hinaus kann diese Erkenntnis in einem weiteren Versuch an diesem Mausmodell bestätigt werden. Dieses liefert zusätzlich den Beweis, dass im Rahmen des Tiermodells nur die epidermalen, Langerin-positiven Zellen, nicht jedoch die in der Dermis oder in den Haut-assoziierten Lymphknoten angesiedelten DC`s entfernt werden (Igyarto et al., 2009). Die neuste Untersuchung zu der Rolle der LC`s in der Hautimmunologie bedient sich eines neuen genetischen Ansatzes und bestätigt die kontroverse Stellung der LC`s bei der CHS. Dabei wird die Erkenntnis ausgenutzt, dass TGF $\beta$ 1 ein essentieller Faktor für die LC-Homöostase ist. So sind die TGF $\beta$ 1-Knock-out Mäuse mitunter durch die Abwesenheit von LC`s in der Haut gekennzeichnet (Borkowski et al., 1996). Im Rahmen des neuen Tiermodells wird die selektive Entfernung der LC`s durch einen TGF $\beta$ R1-Rezeptor-Knock-out erreicht, bei dem die Langerin-positive DC-Population unbeeinflusst bleibt. Die Auslösung der Atopischen Dermatitis bei diesen veränderten Mäusen liefert einen weiteren Beweis, dass die LC`s bei der Initiierung der Entzündungsreaktion maßgeblich beteiligt sind.

So führt das Fehlen der LC`s zu einer starken Abschwächung der immunologischen CHS-Reaktion bei diesen Tieren (Zahner et al., 2011).

Die inhibitorische Wirkung von S1P auf die Antigenaufnahme und damit verbundene Reduktion der entzündlichen Hauterkrankungen kann nicht nur in den LC`s, sondern auch in den unreifen BM-DC`s, die als Repräsentanten der dermalen DC`s betrachtet werden können, nachgewiesen werden. Phänotypisch gesehen unterscheiden sich zwar die dermalen DC`s von den LC`s, sie sind jedoch auch in der Lage T-Zellantworten einzuleiten (Shklovskaya et al., 2008). So kann die Beteiligung dieser APC`s bei der Atopischen Dermatitis im Rahmen des CHS-Modells ebenfalls bestätigt werden. Es wird dabei angenommen, dass im Falle einer Abwesenheit der LC`s die dermalen DC`s die Aufgabe des Immunvermittlers übernehmen können (Bennett et al., 2005; Bursch et al., 2007). Die Modulation der Immunantworten im Rahmen einer lokalen S1P-Therapie kann somit auf eine Hemmung der Antigenaufnahme nicht nur in den LC`s, sondern auch in dermalen DC`s zurückgeführt werden.

### **4.1.2 Identifizierung der Makropinozytose als durch S1P moduliertes Endozytosemechanismus**

Die Endozytose von FITC-Dextran kann sowohl bei den LC`s als auch bei den BM-DC`s über Rezeptor-vermittelte und makropinozytische Mechanismen der Prozessierung bzw. der Antigenpräsentation herbeigeführt werden (Norbury, 2006). Die inhibitorische Wirkung von S1P beschränkt sich dabei nur auf die mit der unspezifischen Antigenaufnahme verbundene Makropinozytose. Eine weitere Möglichkeit der indirekten Modulation der endozytotischen Kapazität unreifer DC`s schlägt sich in der Wirkung von LPS nieder, welches ebenfalls die Fähigkeit der Antigenaufnahme durch die DC`s reduziert. So führt die Anwesenheit dieses Pyrogens zur Einleitung der Apoptose und der Induktion der Ausdifferenzierung von Zellen zu reifen DC`s (De Trez et al., 2005). Wie die Untersuchungen der XS52 Zellen hinsichtlich des programmierten Zelltodes oder der Maturation in diesem Zusammenhang zeigen, können die Phänomene als Ursache der verminderten Endozytose von FITC-Dextran in Anwesenheit des Sphingolipids ausgeschlossen werden.

Die Untersuchung des für die FITC-Dextran-Aufnahme verantwortlichen Mechanismus, welche an den XS52 LC`s durchgeföhrt worden ist, definiert zunächst die Makropinozytose als den Hauptaufnahmeweg des Endozytosetracers. So zeigt die Anwesenheit des Mannans, eines kompetitiven Inhibitors der Rezeptor-vermittelten Antigeninternalisierung, keinen Einfluss auf die FITC-Dextran-Aufnahme durch die XS52 Zellen. Die spezifische Hemmung der Makropinozytose durch Rottlerin hingegen, unterbindet die Endozytose des Dextrans vollständig. Dies steht im Widerspruch zu den allgemein gültigen Erkenntnissen, dass die LC`s den Zuckerrest Dextran neben der Makropinozytose ebenfalls über den C-Typ Lektin-Rezeptor Langerin aufnehmen können und dadurch eine Reaktion gegenüber Mannan zeigen sollten. Untersuchungen der murinen Langerin-Rezeptorexpression in LC`s belegen jedoch, dass dieser Endozytoseweg in Abhängigkeit von dem Alter der Maus erst ab dem 4. Lebenstag nachgewiesen werden kann, was mit der Homöostase der XS52 Zelllinie korreliert (Bellette et al., 2003). So handelt es sich bei den XS52 Zellen um LC`s, die aus der Epidermis von neugeborenen Mäusen isoliert worden sind und vermutlich aus diesem Grund nicht über die Expression des entsprechenden Langerin-Rezeptors verfügen (Xu, Ariizumi, Caceres-Dittmar, et al., 1995). Im Hinblick auf den Endozytosetracer, FITC-Dextran, stellt diese Zelllinie somit ein hervorragendes Modell dar, um die Physiologie der Makropinozytose näher zu charakterisieren.

Die Untersuchungen der FITC-Dextran-Aufnahme durch die BM-DC`s in Anwesenheit von S1P zeigt im Gegensatz zu den XS52 Zellen eine schwächere inhibitorische Wirkung des Sphingolipids. Diese Erkenntnis lässt sich mit der Expression des C-Typ Lektin- bzw. Mannose-Rezeptors auf der Zelloberfläche der BM-DC`s begründen (Gazi et al., 2009). Die Mannose-Rezeptor-vermittelte Internalisierung von FITC-Dextran unterstützt dabei die Makropinozytose bei der Aufnahme des entsprechenden Antigens und bleibt vermutlich in der Anwesenheit von S1P aufrechterhalten. Dies führt dazu, dass eine signifikante Hemmung der Endozytose von FITC-Dextran bei den BM-DC`s erst ab einer S1P-Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  sichtbar wird, während bei den XS52 Zellen die entsprechende Reaktion bereits bei einer S1P-Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  auftritt.

In Bezug auf die bereits erörterte S1P-vermittelte Hemmung der entzündlichen Hautreaktion im CHS-Tiermodell, kann die selektive Inhibierung der Makropinozytose in den unreifen DC`s als eine der Hauptursachen für die anti-inflammatorische S1P-

Wirkung angesehen werden. So zeigt eine Untersuchung an Aquaporin-7-defizienten Mäusen eine direkte Korrelation zwischen der Makropinozytose und der Entzündungsreaktion im Rahmen einer CHS-Analyse. Bei den Aquaporinen handelt es sich um integrale Membranproteine, die in der Lage sind, Ionen bzw. Wasser zu transportieren. Aquaporin-7 ist dabei direkt für den Wassertransport in den murinen DC`s der Haut und somit für die Regulation des Zellvolumens während der Makropinozytose verantwortlich. Eine Hemmung des Regulationsmechanismus im Rahmen eines genetischen Aquaporin-7-Knock-out-Modells führt zu einer stark verringerten Makropinozytoserate und folglich zu einer Reduktion der Allergen-provozierten Dermatitis (de Baey et al., 2000; Hara-Chikuma et al., 2012).

Darüber hinaus können für die selektive Hemmung der Makropinozytose in den DC`s weitere immunologische Konsequenzen beobachtet werden. Im Zusammenhang mit der Krebsforschung wird die erfolgreiche Aufnahme von rekombinanten RNA-Impfstoffen in die DC`s über den Weg der Makropinozytose vermittelt. Bei diesem therapeutischen Ansatz wird eine genetische Information in die APC`s eingeschleust, die für ein Antigen kodiert, das von den DC`s den T-Lymphozyten präsentiert werden kann. Dieses Antigen und die im Zuge dessen Präsentation resultierende Immunabwehr richtet sich gegen das entartete Gewebe und steht indirekt unter dem Einfluss der S1P-Homöostase (Diken et al., 2011). Des Weiteren zeigt die selektive Aufnahme eines Antigens über eine Rezeptorinternalisierung und nicht über die Makropinozytose eine bevorzugte Aktivierung der CD8-positiven T-Lymphozyten statt der CD4-positiven Zellen (Moeller et al., 2012). Neue Untersuchungen belegen ebenfalls die Beteiligung der Makropinozytose an der B-Zellaktivierung und der damit verbundenen Antikörperproduktion. So können die Antigene, welche durch unreife DC`s im Rahmen der Makropinozytose aufgenommen werden, in den Extrazellularraum wieder freigesetzt werden und so zu der Aktivierung der humoralen Abwehr beitragen (Le Roux et al., 2012).

### 4.1.3 Regulation der Makropinozytose über den PI3K-Signalweg

Die Analyse der DC-Homöostase zeigt eine starke Abhängigkeit vieler essentieller Funktionen dieser APC`s von der PI3K-Signaltransduktion. So sichert im Laufe der LPS-induzierten Differenzierung die initiale Erhöhung der PI3K-Aktivität in den unreifen DC`s das Überleben dieser Zellen. Eine pharmakologische Hemmung der PI3K während der DC-Differenzierung aus den entsprechenden hämatopoetischen Vorläuferzellen resultiert demzufolge in einer erhöhten Sterberate der auf diesem Wege generierten DC`s (Ardeshna et al., 2000; Xie et al., 2005). Im Bezug auf die Regulation der Zytokinfreisetzung in den DC`s kann die Beteiligung der PI3K ebenfalls postuliert werden. Dabei scheint sie eine essentielle Feedback-Rolle in der TLR-Signaltransduktion einzunehmen und schützt den Organismus durch die Begrenzung der Zytokinproduktion vor einer pro-inflammatorischen Hyperreaktion. In diesem Zusammenhang zeigt die pharmakologische bzw. genetische Hemmung der PI3K-Enzymaktivität eine übermäßige IL12-Sekretion in murinen Milz-DC`s. Ein murines Sepsis-Modell dagegen liefert den Beweis, dass die PI3K-Inhibierung zu einer erhöhten Mortalität führt, die mit einer verstärkten Produktion von IL1 $\beta$ , IL6, IL12 und TNF $\alpha$  begründet werden kann (Fukao et al., 2002; Fukao et al., 2003; Williams et al., 2004; Caparros et al., 2006). Des Weiteren führt die Generierung von DC`s aus dem murinen Knochenmark in Gegenwart eines PI3K-Inhibitors zur Entstehung einer immunsuppressiven DC-Zellpopulation, die unter anderem durch eine verminderte Expression der ko-stimulatorischen Moleküle wie zum Beispiel CD86 gekennzeichnet ist (Di Caro et al., 2011). Zusammenfassend kann man festhalten, dass die Apoptose, die Zytokinproduktion und der Differenzierungsstatus in den DC`s durch die PI3K moduliert werden können.

Ein weiterer, unter der PI3K-Kontrolle stehender Mechanismus im Repertoire der unreifen DC`s, ist die Antigenaufnahme über die Makropinozytose. So führt die Stimulation der unreifen DC`s mit Noradrenalin zu einer  $\alpha_2$ -Rezeptor-vermittelten Steigerung der PI3K-Aktivität bzw. Akt-Phosphorylierung. Dies wird vor allem von einer erhöhten endozytotischen Aktivität der DC`s begleitet und lässt sich in Gegenwart eines PI3K-Inhibitors verhindern (Tamura et al., 2009; Yanagawa et al., 2010). Einen weiteren Beweis für die Abhängigkeit der Makropinozytose von der PI3K-Aktivität

liefert eine Analyse von DC`s aus dem Blut von Menschen unterschiedlichen Alters. Diese resultiert in der Erkenntnis, dass mit zunehmendem Alter der Spender die Reduktion der konstitutiven Makropinzytoserate von einer Erniedrigung der PI3K-Aktivität bzw. der Akt-Phosphorylierung begleitet wird und als Ursache für das entsprechende Endozytosenverhalten angesehen werden kann (Agrawal et al., 2007). Die Untersuchung der FITC-Dextran-Aufnahme durch die XS52 DC`s bestätigt ebenfalls eine PI3K-Abhängigkeit der Makropinozytose in dieser Zelllinie. Die pharmakologische Hemmung des Enzyms mit Hilfe von LY294002 resultiert nicht nur in der entsprechenden Hemmung der Akt-Phosphorylierung, sondern wird von einer stark erniedrigten Endozytose des Dextrans durch die DC`s begleitet. Darüber hinaus handelt es sich bei diesem Signalweg um den molekularen Angriffspunkt von S1P hinsichtlich der Modulation der Makropinozytose. So zeigt das Sphingolipid eine Hemmung der PI3K-Aktivität bzw. der damit verbundenen Akt-Phosphorylierung, was als einer der Hauptmechanismen der anti-inflammatorischen Wirkung von S1P angesehen werden kann.

Bezüglich der bereits etablierten, anfänglich beschriebenen Effekte der PI3K-Hemmung in den DC`s zeigt S1P jedoch keine Übereinstimmung. So führt die Anwesenheit des Sphingolipids zu keiner Regulation der ko-stimulatorischen Oberflächenmoleküle bzw. der apoptotischen Prozesse in den XS52 Zellen. Hinsichtlich der Zytokinsekretion sind in der Literatur sogar gegensätzliche Effekte beschrieben worden. Dazu gehört die hemmende Wirkung von S1P bezüglich der IL12p70-Sekretion in LPS-aktivierten DC`s, wobei die Produktion anderer Zytokine unbeeinflusst bleibt (Schroder et al., 2011). Diese unerwartete Modulation der entsprechenden DC-Funktionen durch S1P kann einerseits in einer nicht dauerhaften Hemmung der PI3K-Aktivität angesehen werden. So zeigt die Anwesenheit von S1P eine nur zu Beginn starke Hemmung der Enzymaktivität, die mit zunehmender Stimulationsdauer der XS52 Zellen abnimmt. Andererseits kann es auch in der Vielfältigkeit der PI3K-vermittelten Signale begründet sein. Im Hinblick auf die drei in der Literatur beschriebenen PI3K-Klassen, scheint die durch S1P regulierte PI3K-Klasse einen intrazellulären Signalweg zu bedienen, der nicht für die Regulation der etablierten Effekte in den DC`s verantwortlich ist. In der Tat kann für die Zytokinproduktion essentielle TLR-Signaltransduktion eine Beteiligung der PI3K-Klasse I-Untereinheiten p110 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  nachgewiesen werden, während die Untereinheit p110 $\gamma$  in Verbindung mit GPCR`s gebracht werden kann (Rommel et al., 2007). Des

Weiteren beinhaltet die S1P-Signaltransduktion die Beteiligung mehrerer S1P-Rezeptorsubtypen, für die eine vielfältige und gegensätzliche Modulation der PI3K-Aktivität beschrieben worden ist (Takabe et al., 2008).

### **4.1.4 Charakterisierung des Makropinozytose modulierenden S1P-Rezeptorsubtyps**

Die Untersuchung der Dosis-Wirkung-Beziehung von S1P hinsichtlich der endozytotischen Aktivität in den XS52 Zellen zeigt eine Zunahme des inhibitorischen Effekts mit steigenden Konzentrationen des Sphingolipids, die bereits ab einer Konzentration von 100 nM sichtbar wird. Dies deutet auf eine Beteiligung der S1P-Rezeptoren an der Modulation der Makropinozytose hin, da eine intrazelluläre Signaltransduktion durch exogen zugeführtes S1P bei dieser geringen Wirkkonzentration äußerst unwahrscheinlich erscheint. Eine Real-Time PCR Analyse der mRNA in den XS52 Zellen bestätigt die Expression aller S1P-Rezeptoren mit dem am stärksten vertretenen S1P<sub>2</sub>-Rezeptorsubtyp. Dieser Trend in dem Expressionsmuster kann ebenfalls in unreifen BM-DC`s beobachtet werden, die durch ein sehr starkes S1P<sub>2</sub>-Rezeptorvorkommen gekennzeichnet sind. Darüber hinaus kann die bereits beschriebene Steigerung der Endozytose durch die S1P-S1P<sub>3</sub>-Stimulation in reifen DC`s eventuell in der Änderung des S1P-Rezeptor-Expressionsmusters während der DC-Differenzierung begründet sein. So führt die Anwesenheit von LPS oder TNF $\alpha$  zu einer Erhöhung der S1P<sub>1</sub>- und S1P<sub>3</sub>-Rezeptor mRNA-Transkripten, während die des S1P<sub>2</sub>-Rezeptorsubtyps herunterreguliert werden (Rathinasamy et al., 2010). Im unreifen Differenzierungsstatus kann jedoch diese Einbindung nicht nur des S1P<sub>3</sub>-Rezeptorsubtyps, sondern aller S1P-Rezeptoren bis auf S1P<sub>2</sub> in die Regulation der Makropinozytose bzw. PI3K-Aktivität in den XS52 Zellen ausgeschlossen werden. So führt die Stimulation der unreifen DC`s mit den S1P-Rezeptor-Agonisten FTY720-P, VPC 24191 und SEW2871 zu keiner signifikanten Änderung der Endozytoserate bzw. Akt-Phosphorylierung. Dies deutet auf eine Beteiligung des S1P<sub>2</sub>-Rezeptorsubtyps hin, was im Rahmen der siRNA-Versuche bestätigt werden kann. Die Erniedrigung der S1P<sub>2</sub>-Rezeptorexpression hebt folglich die S1P-vermittelte Hemmung der Makropinozytose und Akt-Dephosphorylierung auf und identifiziert

damit den am stärksten exprimierten S1P-Rezeptorsubtyp als einen molekularen Modulator der Antigenaufnahme in unreifen DC`s.

Die demonstrierte S1P<sub>2</sub>-Rezeptor abhängige Reduktion der PI3K-Aktivität kann bereits bei anderen Zelltypen nachgewiesen werden. So resultiert die S1P<sub>2</sub>-Rezeptor Überexpression in einem Lungentumor oder einem Melanom in einer Erniedrigung der Proliferationsrate des entarteten Gewebes und in einer erniedrigten Vaskularisierung, was unter anderem durch die Reduktion der PI3K-Aktivität induziert wird (Du et al., 2010). Im Bezug auf die Zellteilung kann für die Keratinozyten ebenfalls eine antiproliferative, S1P<sub>2</sub>-Rezeptor-vermittelte Wirkung nachgewiesen werden. Die Stimulation dieser Hautzellen mit dem Wachstumsfaktor Insulin in Gegenwart des Sphingolipids verhindert nämlich die Hormon-induzierte, essentielle PI3K-Aktivierung und damit verbundene Zellteilung (Schuppel et al., 2008). Im Zusammenhang mit der Analyse der S1P<sub>2</sub>-Rezeptor-Funktionalität in den Immunzellen kann neben der bereits beschriebenen Regulation der Mastzelldegranulation auch die Modulation der B-Zellen und der Makrophagen angenommen werden. Die Differenzierung von naiven B-Zellen zu den entsprechenden Gedächtnis- bzw. Plasmazellen geschieht in dem Keimzentrum der sekundären lymphatischen Organe und führt zur Einleitung der für die Immunabwehr essentiellen, humoralen Antwort. Vor diesem Hintergrund belegt eine Untersuchung im Mausmodell, dass das Überleben sowie die Positionierung der Zellen im Keimzentrum stark von der S1P<sub>2</sub>-Rezeptor-vermittelten Reduktion der PI3K-Aktivität abhängt (Green et al., 2011). Darüber hinaus zeigt die Stimulation des S1P<sub>2</sub>-Rezeptors in den Makrophagen nicht nur eine damit assoziierte Reduktion der Akt-Phosphorylierung, sondern eine dem Effekt in unreifen DC`s analoge anti-inflammatorische Wirkung. So führt die entsprechende Signaltransduktion zu einer Hemmung der Migration und der damit verbundenen Einwanderung dieser Fresszellen in das Entzündungsgebiet, was mit Hilfe eines S1P<sub>2</sub>-Knock-out-Modells eindeutig belegt werden kann (Michaud et al., 2010).

Im Bezug auf die anfangs beschriebene Modulation der S1P-Homöostase sowohl im CHS- als auch im allergischen Asthma-Modell kann die anti-inflammatorische Wirkung nicht nur für S1P, sondern auch für FTY720 eindeutig nachgewiesen werden. Diese Wirkung lässt sich jedoch nicht über die Modulation der Makropinozytose bzw. der Antigenaufnahme erklären, da FTY720 den S1P<sub>2</sub>-Rezeptor nicht zu stimulieren vermag. Diese Erkenntnis demonstriert zweifelsfrei die Komplexität der entzündungshemmenden S1P-Wirkung. Darüber hinaus zeigt es, dass die Reduktion

der endozytotischen Kapazität der unreifen DC`s nicht als alleinige Ursache für die Verbesserung der entsprechenden Krankheitsbilder im Rahmen einer lokalen S1P-Therapie angesehen werden kann. So sollten Effekte wie die bereits beschriebene Modulation des migratorischen Verhaltens der DC`s aber auch systemische Wirkung bezüglich der protektiven FTY720-Therapie in Betracht gezogen werden. Dazu gehört vor allem die in diesem Rahmen beobachtete, FTY720-induzierte Lymphopenie, die sich nur über eine systemische Distribution des S1P-Modulators erklären lässt (Reines et al., 2009; Liu, Jiang, et al., 2012).

### **4.2 Bedeutung des endogenen S1P für die endozytotische Aktivität der DC`s**

Die Untersuchung der exogenen S1P-Wirkung bezüglich der Reduktion der endozytotischen Kapazität der unreifen DC`s demonstriert eindeutig die Beteiligung des S1P<sub>2</sub>-Rezeptorsubtyps an der daraus resultierenden verminderten Antigenaufnahme dieser APC`s. Weiterhin zeigt die Herunterregulation der S1P<sub>2</sub>-Rezeptorexpression mittels spezifischer siRNA eine Zunahme der basalen Endozytoserate in den XS52 Zellen gegenüber den genetisch unmodifizierten DC`s. Dies deutet auf eine endogene Regulation der Antigenaufnahme in den XS52 Zellen hin, wobei intrazellulär gebildetes S1P in einem autokrinen Mechanismus über den S1P<sub>2</sub>-Rezeptorsubtyp das immunologische Gleichgewicht der Antigenzufuhr zu steuern vermag. Folglich führt die verminderte membranständige Präsenz des S1P<sub>2</sub>-Rezeptors zu einer Reduktion des S1P-vermittelten, Endozytose-modulierenden Hemmeffekts.

Die DC`s sind ein Paradebeispiel für einen Zelltyp, dessen Homöostase im Rahmen einer vielfältigen, autokrinen Regulation aufrechterhalten wird. So löst die Exposition der unreifen DC`s mit mikrobiellen Bestandteilen wie LPS eine Sekretion nicht nur sondern auch anti-inflammatorischer Zytokine wie IL1 oder IL10 aus. Diese sind in der Lage, die entsprechende immunologische Wirkung in ihrer unmittelbaren Nachbarschaft zu entfalten, wozu auch die Selbstregulation der eigenen Zellfunktion gehört (Blanco et al., 2008). Wie am Beispiel des Zytokins TNF $\alpha$  gezeigt werden kann, findet diese autologe Regulation nicht nur während einer Aktivierung der Zellen statt, sondern kann ebenfalls im unreifen `Steady state`-DC-Stadium beobachtet werden.

Dabei führen die Sekretion des entsprechenden Mediators und die anschließende autokrine Stimulation der DC`s zu einer fein abgestimmten Regulation des Überlebens der Zelle (Slobodin et al., 2009; Lehner et al., 2012). In diesem Zusammenhang kann ebenfalls nachgewiesen werden, dass eine Störung dieser empfindlichen Gleichgewichtsreaktionen bei einer Reihe von Autoimmunerkrankungen wie Psoriasis bzw. weiteren entzündlichen Hauterkrankungen vorliegt. Dabei sollte beachtet werden, dass die bereits beschriebene Störung der S1P-Homöostase, die von einem erhöhten S1P-Abbau begleitet wird, ebenfalls durch eine Anomalie der Haut bzw. Atopische Dermatitis gekennzeichnet ist (Baumer et al., 2011). Neben der autokrinen Regulation der DC-Funktion durch die klassischen Zytokine kann eine Reihe weiterer endogener Substanzen identifiziert werden, die in die Beeinflussung der DC-Physiologie involviert sind. Dazu gehört beispielsweise das ATP mit den purinergen Rezeptoren, welche das migratorische Verhalten der DC`s modulieren können oder das Acetylcholin, das an der Regulation der Oberflächenexpression ko-stimulatorischer Moleküle beteiligt ist (Junger, 2011; Salamone et al., 2011). Darüber hinaus kann eine Einbindung des autokrin sezernierten `TGF $\beta$  induced` Proteins in die Regulation der Makropinozytose in unreifen DC`s postuliert werden. So hat die hohe Expression bzw. Sekretion des entsprechenden Proteins durch die unreifen DC`s eine Erhöhung der endozytotischen Kapazität zur Folge und kann durch den Einsatz eines neutralisierenden `TGF $\beta$  induced` Protein-Antikörpers in ihrer Wirkung aufgehoben werden. Im Bezug auf den Differenzierungsstatus der DC`s zeigt eine Verschiebung der DC-Physiologie Richtung reife Zelle den Verlust dieser autokrinen, regulatorischen Einheit der Endozytose (Cao et al., 2006). Im Hinblick auf die S1P-Homöostase kann eine ähnliche Regulation während der Differenzierung der unreifen zu reifen DC`s festgestellt werden. Im Zuge dieser Statusänderung der Zelle kann eine Herunterregulation der SphK1-Expression nachgewiesen werden. So wird die damit assoziierte Minderung der S1P-Produktion ebenfalls von einer Abschwächung der endogenen Wirkung des Sphingolipids im Bezug auf die Modulation der Endozytose in den DC`s begleitet (Eigenbrod et al., 2006).

Untersuchungen der S1P-Wirkung in den DC`s deuten bereits darauf hin, dass einige essentielle Funktionen dieser APC`s im Rahmen einer autokrinen S1P-vermittelten Regulation gesteuert werden können. Vor dem Hintergrund, dass eine gesteigerte SphK1-Aktivität zu einer Favorisierung der Th2- sowie der Th17-Immunantwort führt, kann eine autokrine Regulation der IL12p70-Expression durch S1P nachgewiesen

werden. Bei diesem Zytokin handelt es sich um ein Signal, das unter anderem im Zuge einer LPS-Stimulation gebildet wird und zur Einleitung einer Th1-Immunantwort führt. So zeigt die Analyse der IL12p70-Produktion in SphK1-Knock-out-DC's eine LPS-induzierte, erhöhte Ausschüttung dieses Zytokins gegenüber den Wildtyp-DC's. Der Grund für diese in der Abwesenheit der SphK1 bevorzugte Einleitung der Th1-Immunantwort liegt in der fehlenden Stimulation des S1P<sub>1</sub>-Rezeptorsubtyps durch das endogen gebildete und sezernierte S1P. Demzufolge hat die etablierte Steigerung der SphK1-Aktivität im Zuge einer LPS-Stimulation zur Aufgabe, die Minderung der IL12p70-vermittelten Th1-Zellprägung zu sichern, was im Rahmen eines negativen Feedbackmechanismus über die S1P<sub>1</sub>-S1P-Achse erbracht wird (Schroder et al., 2011).

Darüber hinaus demonstrieren biochemische Untersuchungen in weiteren Zelltypen, dass das Sphingolipid S1P als ein autokriner Regulator in die Zellphysiologie involviert sein kann. Bezüglich der Makrophagen zeigt die Stimulation des S1P<sub>2</sub>-Rezeptorsubtyps durch das endogen gebildete S1P eine positive Modulation der Fc-Rezeptorexpression. Diese ist essentiell für die erfolgreiche Phagozytose der Mikroorganismen, welche im Vorfeld mit Antikörpern opsoniert worden sind und liefert einen weiteren Beweis für eine S1P<sub>2</sub>-Rezeptor-vermittelte, autokrine Regulation der Endozytose in Immunzellen (McQuiston et al., 2011). Die Analyse der neuronalen, entzündlichen Immunprozesse offenbart eine weitere Regulationseinheit durch das endogene S1P, die in den beiden Gliazelltypen, den Astrozyten und den Mikrogliazellen, beobachtet werden kann. So kann in den Mikrogliazellen, den Phagozyten im zentralen Nervensystem, eine Regulation der LPS-induzierten Expression der Zytokine TNF $\alpha$  und IL1 $\beta$  sowie von iNOS nachgewiesen werden. Dabei führt die im Rahmen dieser TLR-Stimulation stattfindende Erhöhung der SphK1-Aktivität bzw. der S1P-Sekretion und die damit verbundene S1P-Rezeptorstimulation zu einer entzündungsfördernden Steigerung der beschriebenen Zytokinausschüttung (Nayak et al., 2010). Eine gegensätzliche, anti-inflammatorische Wirkung des endogenen S1P zeigt sich in der Homöostase der Astrozyten. Dabei zeigt die Stimulation dieser Zellen mit LPS eine SphK1-S1P<sub>3</sub>-Rezeptorsubtyp-induzierte Neuroprotektion. Diese äußert sich in der S1P-vermittelten Erhöhung des antientzündlich agierenden Chemokins CXCL1 (Fischer et al., 2011). Die autokrine Regulation der Zellfunktion ist jedoch nicht spezifisch für die immunologischen Prozesse. Die Untersuchungen im entarteten Gewebe, beispielsweise in den HeLa

und Mel-7 Zelllinien, identifizieren das im Rahmen der SphK1-Aktivität produzierte S1P als ein wichtiges Überlebenssignal. So beobachtet man eine Hemmung der Fas-Liganden-induzierten Apoptose in den entsprechenden Zelllinien, die auf eine S1P<sub>2</sub>-Rezeptor-vermittelte NFκB-Aktivierung zurückgeführt werden kann (Blom et al., 2010). Des Weiteren demonstriert eine Analyse der TGFβ<sub>1</sub>-vermittelten Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Myofibroblasten, welche als eine Simulation der Entstehung einer Leberfibrose angesehen werden kann, die Einbindung der autokrinen S1P-Homöostase. Dabei lässt sich die entsprechende Differenzierung der Zellen in der Stimulation des S1P<sub>1</sub>- und S1P<sub>3</sub>-Rezeptorsubtyps begründen, wobei das dafür notwendige, endogene S1P durch die intrazelluläre SphK1-Aktivität geliefert wird (Yang, Chang, et al., 2012). Letztendlich verfügen auch Fibroblasten, welche wie die LC`s bzw. DC`s stark in die Physiologie der Hautfunktion eingebunden sind, über einen autokrinen S1P-Regulationsmechanismus. So zeigen diese Zellen eine S1P<sub>1</sub>-Rezeptor-abhängige Internalisierung des adrenergen α<sub>1b</sub>-Rezeptors, die im Rahmen einer Wachstumsfaktor-induzierten SphK1-Aktivierung beobachtet werden kann (Castillo-Badillo et al., 2012).

### **4.2.1 Identifizierung des für die S1P-Sekretion verantwortlichen ABCC1-Transporters**

Bezugnehmend auf die S1P-Homöostase sind die autokrinen regulatorischen Mechanismen in den unreifen DC`s stets von einer erfolgreichen Sekretion des intrazellulär gebildeten Lipidmediators abhängig. In diesem Zusammenhang kann bereits die Beteiligung mehrerer ABC-Transporter an der Freisetzung des Sphingolipids in den Extrazellularraum durch verschiedene Zelltypen demonstriert werden und kann ebenfalls in der XS52 Zelllinie beobachtet werden. Eine Real-Time PCR-Analyse der mRNA-Transkripte in den XS52 Zellen bestätigt die Expression der drei wichtigsten, für die S1P-Translokation verantwortlichen ABC-Transporter. Dazu gehören ABCB1-, ABCC1- und ABCG2-Transporter. Die Expression dieser aktiven Transporter kann nicht nur in primären DC`s bzw. LC`s ebenfalls nachgewiesen werden, sondern ist auch für deren Homöostase von essentieller Bedeutung. So führt die pharmakologische Inhibierung sowohl des ABCB1- als auch des ABCC1-Transporters zu einer Reduktion der DC-Migration aus der Haut in die sekundären

lymphatischen Organe. Im Falle von ABCB1 ist unklar, bei welchen endogenen Substanzen es sich dabei handelt, deren Sekretionshemmung zu der entsprechenden Beeinflussung der DC-Funktion führt. Bei ABCC1 wird die verminderte Freisetzung von Leukotriencystinyl 4 als Ursache für die verminderte DC-Wanderung angenommen, was im Rahmen eines ABCC1-Knock-out-Mausmodells nachvollzogen werden kann (van de Ven et al., 2009). Darüber hinaus zeigt sich die außerordentlich wichtige Bedeutung der Transporter ABCC1 und ABCG2 bei der Ontogenese der DC`s aus den entsprechenden Vorläuferzellen. Dabei führt der Einsatz des potenten ABCC1-Hemmstoffs MK571 während der Differenzierung der DC`s aus den Monozyten oder aus der CD34-Zellen-haltigen MUTZ3-Zelllinie zu einer stark abgeschwächten Generierung von DC`s bzw. LC`s (Skazik et al., 2008). Die erhöhte Expression des ABCG2-Transporters auf den entsprechenden Vorläuferzellen hingegen scheint eine bevorzugte Entstehung von DC`s mit LC-Eigenschaften zu induzieren (van de Ven et al., 2012).

Im Zusammenhang mit der S1P-Signaltransduktion in den DC`s kann ebenfalls eindeutig eine Modulation des Migrationsverhaltens und der Ontogenese demonstriert werden, was einen Hinweis auf eine mögliche Einbindung eines der ABC-Transporter in die S1P-Homöostase dieser APC`s aufzeigt. So kann einerseits die S1P<sub>1</sub>/S1P<sub>3</sub>-rezeptorabhängige Migration der DC`s eindeutig belegt werden. Auf der anderen Seite zeigt aber auch die Hemmung der SphK1 und der damit verbundenen, endogenen S1P-Synthese eine signifikante Reduktion der Wanderung der unreifen DC`s (Radeke et al., 2005; Eigenbrod et al., 2006). Bezüglich der Ontogenese demonstriert die klassische Generierung der DC`s aus Monozyten in Anwesenheit von S1P einige phänotypische Anomalien der entstehenden unreifen DC`s. Dazu gehören die fehlende Expression des Oberflächenmarkers CD1a sowie einige Eigenschaften von reifen DC`s trotz der Abwesenheit eines Reifeaktivators. Die Stimulation der unter diesen Bedingungen generierten DC`s mit LPS führt hingegen zu einem IL12-negativen Zytokinexpressionsmuster (Martino et al., 2007).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Einbindung eines der drei ABC-Transporter in die autokrine Regulation der Endozytose in den XS52 Zellen liefert hingegen einen eindeutigen Beweis für die Beteiligung des ABCC1 an der S1P-Homöostase in unreifen DC`s. Folglich zeigt die Untersuchung der Endozytoserate von FITC-Dextran in Anwesenheit der Hemmstoffe für ABCB1 oder ABCG2 keine Beeinflussung der Antigenaufnahme in den XS52 Zellen. Die Hemmung der ABCC-Transporterfamilie mit

Probenecid bzw. des ABCC1-Transporters mit MK571 resultiert hingegen in einer signifikanten Erhöhung der FITC-Dextran-Aufnahme. Diese kann auf eine reduzierte Sekretion des intrazellulären S1P aus dem Zytoplasma und die damit verbundene, erniedrigte Stimulation des S1P<sub>2</sub>-Rezeptorsubtyps zurückgeführt werden. Einen zusätzlichen Beweis dafür liefert die Analyse der S1P-Konzentration im Extrazellularraum. So führt die Inhibierung des ABCC1-Transporters zu einer nahezu vollständigen Aufhebung der S1P-Sekretion durch die XS52 Zellen. Die unbehandelten Zellen hingegen setzen das endogen produzierte S1P frei und erbringen damit einen zusätzlichen Beweis für einen autokrinen Regulationsmechanismus des Sphingolipids in den unreifen DC`s.

Diese Erkenntnis bestätigt die bereits in anderen Zelltypen gewonnenen Daten, die den ABCC1-Transporter in die S1P-Homöostase integrieren. Dazu gehört beispielsweise der Einfluss von ABCC1 auf die Migration von Mastzellen. Dabei kann gezeigt werden, dass die Hemmung der physiologischen Funktion des entsprechenden Transporters mittels MK571 bzw. spezifischer siRNA mit einer stark reduzierten S1P-Sekretion verbunden ist. Diese hat eine Minderung der gezielten Mastzellwanderung zur Folge (Mitra et al., 2006). Weiterhin bestätigt die Wirkung des Glukokortikoids Dexamethason eine Beteiligung von ABCC1 und S1P an dessen zytoprotektiven Eigenschaften in Fibroblasten. So führt die Dexamethason-vermittelte Induktion von ABCC1 zu einer verstärkten S1P-Translokation aus der Zelle und sich anschließender vor Apoptose schützender Stimulation des S1P<sub>3</sub>-Rezeptorsubtyps (Nieuwenhuis et al., 2010).

### **4.2.2 Bedeutung der SphK1-Aktivierung bei der Modulation der Endozytose**

Die Sekretion des Sphingolipids über den ABCC1-Transporter, welche im Rahmen der autokrinen Endozytoseregulation stattfindet und die damit verbundene Hemmung der Antigenaufnahme in unreifen DC`s kann quantitativ über die SphK1-Aktivität moduliert werden. Die SphK1 gehört neben der SphK2 zu einer Gruppe der Lipidkinasen, die über eine Phosphorylierung des Sphingosins die S1P-Biosynthese vervollständigen. Während sich die SphK2-Expression vorwiegend auf den Zellkern beschränkt, kann für die SphK1 eine zytosolische bzw. eine plasmamembranständige Lokalisation

nachgewiesen werden, was dieses Isoenzym hauptverantwortlich für die endogene S1P-Produktion macht. Dabei kann die SphK1-Aktivität nicht nur im Zuge der physiologischen Gegebenheiten wie der Anwesenheit von Wachstumsfaktoren moduliert werden, sondern lässt sich auch im Rahmen einer pharmakologischen Stimulation beeinflussen (Siow et al., 2011). So zeigt die Anwesenheit des SphK1-Aktivators K6PC-5 auf der Haut einen der topischen S1P-Applikation vergleichbaren Effekt. Dieser äußert sich vor allem in der Beeinflussung der Keratinozyten-Homöostase, wobei eine antiproliferative Wirkung von dem SphK1-Aktivator ausgeht. Diese dem exogenen S1P vergleichbare Wachstumsmodulation der Keratinozyten kann jedoch nicht mehr im Rahmen einer pharmakologischen bzw. genetischen Inhibierung der SphK1 beobachtet werden. Diese Demonstration liefert den eindeutigen Beweis für die Eignung von K6PC-5 als SphK1-Aktivator, der seine Effekte über eine Steigerung der S1P-Biosynthese entfaltet (Hong et al., 2008; Schuppel et al., 2008; Youm et al., 2008). Tatsächlich führt auch die Stimulation der XS52 Zellen mit dem SphK1-Aktivator K6PC-5 zu einer der exogenen S1P-Zufuhr analogen Wirkung. So zeigt die Anwesenheit des SphK1-Modulators eine signifikante Reduktion der FITC-Dextran-Aufnahme durch die XS52 Zellen, welche auf eine Erhöhung der intrazellulären S1P-Produktion zurückgeführt werden kann. Diese bewirkt einen zusätzlichen Stimulus des S1P<sub>2</sub>-Rezeptorsubtyps, der bei der Untersuchung der PI3K-Aktivität mittels Western Blot bestätigt werden kann. Dabei lässt sich die nicht transiente, zeitliche Erniedrigung der Akt-Phosphorylierung durch K6PC-5 in den XS52 Zellen mit dem durch exogenes S1P provozierten Verlauf vergleichen. In beiden Fällen ist nämlich ein Wiederanstieg der PI3K-Aktivität nach einer Stunde zu verzeichnen. Dies liefert einen weiteren Beweis dafür, dass die von K6PC-5 ausgehende Wirkung auf das endogene S1P im Rahmen einer autokrinen Regulation zurückzuführen ist.

### 4.2.3 Bedeutung der SphK1-Inhibierung bei der Modulation der Endozytose

Zur Verifizierung der mittels K6PC-5 gewonnenen Ergebnisse kann die Anwesenheit des spezifischen SphK1-Inhibitors SKI II bei der Analyse der endozytotischen Kapazität der unreifen DC`s herangezogen werden. Dabei sollte die Reduktion der S1P-Biosynthese, welche im Rahmen der SphK1-Hemmung mittels SKI II provoziert wird, eine Steigerung der Endozytoserate zur Folge haben. Als Ursache dafür kann das Ausbleiben des autokrinen, inhibitorischen S1P<sub>2</sub>-Rezeptorstimulus aufgrund des erniedrigten, endogenen S1P-Spiegels angenommen werden. Überraschenderweise zeigt die Untersuchung der FITC-Dextran-Aufnahme durch die XS52 Zellen, welche zuvor mit dem SphK1-Hemmstoff behandelt wurden, eine unerwartete Reduktion der Endozytoserate, die mit zunehmender SKI II-Inkubationsdauer stetig ansteigt. Dieses Verhalten der DC`s in Gegenwart von SKI II kann seine Ursache in der Modulation der Makropinozytose haben, da die erniedrigte Endozytoserate konsequenterweise von einer abnehmenden PI3K-Aktivität begleitet wird.

So konnte bereits bei anderen Zelltypen die Korrelation zwischen der SphK1- und PI3K-Aktivität gezeigt werden, was im Falle der in den XS52 Zellen mittels SKI II demonstrierten Ergebnisse zutreffen könnte. Eine Analyse der SphK1-Aktivität und der daraus resultierenden PI3K-Aktivität bzw. Akt-Phosphorylierung im Glioblastom liefert den entsprechenden biochemischen Beweis dafür. Dabei führt die Hemmung der SphK1 zu einer PI3K-vermittelten Erniedrigung der Akt-Phosphorylierung, die mit einer Erniedrigung der Expression von anti-apoptotisch wirkenden Proteinen in Verbindung gebracht wird und folglich zur Apoptose des Tumorgewebes führt (Guan et al., 2011). Darüber hinaus konnte eine ähnliche SphK1-vermittelte, anti-apoptotische Wirkung im Lungenkarzinom beobachtet werden. Dabei wird die erhöhte SphK1-Aktivität von einer erhöhten PI3K-Aktivität bzw. Akt-Phosphorylierung begleitet und ist wiederum in die Expression der anti-apoptotischen Proteine involviert (Song et al., 2011). Die Steigerung der SphK1-Aktivität in den XS52 Zellen mittels K6PC-5 wird jedoch nicht von einer erhöhten PI3K-Aktivität begleitet. Somit kann diese im Tumorgewebe beobachtete Korrelation zwischen den beiden Enzymen nicht als Ursache für die demonstrierte Modulation der Makropinozytose mittels SKI II angenommen werden.

Die im nächsten Schritt durchgeführte Überprüfung der Funktionalität des SphK1-Hemmstoffs SKI II bestätigt seine Eignung hinsichtlich seiner inhibitorischen Wirkung und kann somit als Störkomponente, die zu der unerwarteten Hemmung der Endozytose führt, ausgeschlossen werden. Die Interaktion von SKI II mit der SphK1 führt nicht nur zu einem kompetitiven Antagonismus mit dem natürlichen Substrat Sphingosin, sondern induziert auch den lysosomalen Abbau der Lipidkinase ohne ihre mRNA-Expression zu beeinflussen. So führt die Inkubation der XS52 Zellen mit SKI II ebenfalls zu einer Erniedrigung der SphK1-Proteinexpression in der Zelle, was von stark reduzierten, intrazellulären S1P-Spiegeln begleitet wird und die Tauglichkeit des Hemmstoffs demonstriert. Darüber hinaus kann die direkte Regulation der PI3K durch 2  $\mu\text{M}$  SKI II ausgeschlossen werden, da eine entsprechende Modulation des Enzyms erst ab einer Konzentration von 60  $\mu\text{M}$  SKI II postuliert wird (French et al., 2003; Ren et al., 2010). Ferner zeigen mehrere Untersuchungen im Tumorgewebe einen pro-apoptotischen Effekt der SphK1-Hemmung bzw. des SKI II-Pharmakons, was im Fall der DC`s eine Reduktion der endozytotischen Kapazität zur Folge hätte (French et al., 2006; Yang, Ji, et al., 2012). Die Untersuchung der Apoptoserate der XS52 Zellen in Gegenwart verschiedener SKI II-Konzentrationen bestätigt die entsprechende Induktion des programmierten Zelltodes durch die SphK1-Inhibierung. Allerdings kann die pro-apoptotische Wirkung von SKI II erst ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  beobachtet werden und schließt folglich die Modulation der zellulären Vitalität durch SKI II als Ursache für die erniedrigte endozytotische Kapazität aus.

Im Hinblick auf die Antigenaufnahme-fähigkeit ist die hohe Endozytoseaktivität ein markantes Charakteristikum von unreifen DC`s, zu der die Makropinozytose maßgeblich beiträgt. Im Rahmen der Differenzierung zur reifen DC`s verlieren diese APC`s jedoch die Fähigkeit, die Flüssigkeit und darin gelöste Stoffe, wozu auch FITC-Dextran gehört, aus ihrer unmittelbaren Umgebung aufzunehmen. So kann die entsprechende Einleitung der DC-Reifung eine Modulation der Makropinozytose zur Folge haben und somit eine indirekte Hemmung der Antigenaufnahme bewirken (Platt et al., 2010). Die Untersuchung der beiden Oberflächenmarker CD86 und CD115 auf den XS52 Zellen nach der Inkubation mit SKI II liefert einen eindeutigen Beweis für eine differenzierungsfördernde Wirkung des SphK1-Hemmstoffes. So führt die Anwesenheit von SKI II zu einer Zunahme des CD86- und Abnahme des CD115-Proteins auf der Oberfläche der XS52 Zellen, was bereits nach einer Stunde sichtbar wird und mit der zeitabhängigen Reduktion der Endozytoserate korreliert (Kitajima et

al., 1996). Darüber hinaus zeigt die Analyse der FITC-Dextran-Endozytose durch SphK1-Knock-out-DC`s eine Reduktion der Antigenaufnahme-fähigkeit gegenüber Wildtyp-DC`s, was von einem veränderten Differenzierungsstatus begleitet wird. So zeigen die Knock-out-DC`s eine gegenüber dem Wildtyp erhöhte Oberflächenexpression des Reifemarkers MHC II und bestätigen damit die in den XS52 gewonnenen Erkenntnisse.

Die SKI II-vermittelte Reduktion der Endozytoserate scheint somit in der Einleitung der DC-Differenzierung ihre Ursache zu haben, welche wahrscheinlich auf die fehlende intrazelluläre S1P-Wirkung zurückgeführt werden kann. Die exogene S1P-Zufuhr während der SKI II-Stimulation zeigt nämlich keinen Einfluss auf diese Veränderung des Reifegrades der DC`s. Die S1P-Signaltransduktion betrachtend übt dieses Sphingolipid seine Effekte nicht nur extrazellulär über die GPCR`s aus, sondern kann auch intrazellulär eine wichtige Vermittlerfunktion haben. Frühere Studien hinsichtlich der Rolle von intrazellulärem S1P in der Calcium-Homöostase demonstrieren, dass das Sphingolipid in der Lage ist, die Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum zu induzieren (Ghosh et al., 1990; Ghosh et al., 1994; Mattie et al., 1994). Obwohl kein eindeutiges Zielprotein für diese S1P-vermittelte, intrazelluläre Wirkung identifiziert werden kann, bringen neueste Untersuchungen mehrere intrazelluläre Proteine hervor, die von S1P angesteuert werden können. So ist die Anwesenheit von S1P für die Funktionalität des mitochondrialen Proteins Prohibitin2 essentiell. Dieses ist in seiner aktiven Form an der Atmungskette beteiligt und trägt maßgeblich zu der Aufrechterhaltung der Funktionalität der zellulären Energiekraftwerke bei (Strub et al., 2011). Im Zusammenhang mit neuronalen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer übernimmt S1P eine regulatorische Funktion des  $\beta$ -Amyloid-Peptid generierenden Enzyms BACE1. Eine kürzlich durchgeführte Studie zeigt eine Korrelation zwischen der intrazellulären S1P-Produktion und der BACE1-Aktivität, die *in vitro* über S1P-Bindung gesteuert werden kann. Dabei führt das Ausschalten der beiden Lipidkinasen SphK1 und SphK2 bzw. eine Überexpression der S1P-Lyase zu einer Reduktion der  $\beta$ -Amyloid-Peptid-Bildung, da eine erniedrigte S1P-sensitive BACE1-Aktivität aufgrund der Abwesenheit des Sphingolipids festgestellt werden kann (Takasugi et al., 2011). Weiterhin zeigt die Untersuchung des molekularen Mechanismus der Endotoxin-induzierten Sepsis eine PKC $\delta$ -vermittelte Aktivierung von NF- $\kappa$ B, wobei eine Beteiligung von intrazellulärem S1P diskutiert wird. Obwohl keine direkte Bindung von S1P an PKC $\delta$  bestimmt werden kann, zeigt die

Inkubation des entsprechenden Enzyms mit Sphingosin, ATP und SphK1 eine Erhöhung der katalytischen PKC $\delta$ -Aktivität, was auf die Interaktion mit dem gebildeten S1P zurückgeführt werden kann (Puneet et al., 2010). Ein Zusammenhang zwischen S1P und dieser Kinase kann eindeutig in Keratinozyten beschrieben werden. Dabei führt die Stimulation der Zellen mit dem Sphingolipid zu einer Steigerung der Expression des PKC $\delta$ -kodierenden Gens und damit zu einer erhöhten PKC $\delta$  Enzymaktivität in den Keratinozyten (Schuppel et al., 2008). Letztendlich demonstriert auch die Analyse des TNF $\alpha$  Signalweges eine Einbindung des intrazellulären S1P in die NF- $\kappa$ B-Aktivierung. So handelt es sich bei dem Sphingolipid um einen Kofaktor für TRAF2, ein Adapterprotein, dessen Ligaseaktivität für die entsprechende NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion essentiell ist (Alvarez et al., 2010). Diese intrazellulären S1P-Targets lassen eine vielseitige Regulation der zellulären Homöostase durch die Sphingolipid-SphK1-Achse vermuten. So könnte eine biochemische Störung dieses Gleichgewichts die beobachtete Einleitung der DC-Differenzierung zur Folge haben. Darüber hinaus bestätigt die Analyse der systemischen Wirkung von SKI II in einem allergischen Asthma-Mausmodell das anti-inflammatorische Potential, welches von der SphK1-Hemmung in den DC`s ausgeht. So führt die systemische Gabe von SKI II im Vorfeld einer Antigen-induzierten Sensibilisierung der Tiere zu einer Verbesserung der asthmatischen Krankheitssymptome wie der Hyperreagibilität der glatten Bronchialmuskulatur. Diese pathologischen Veränderungen, welche bei wiederholter Antigenexposition in der unbehandelten Kontrollgruppe beobachtet werden, treten in der SKI II-behandelten Gruppe stark abgeschwächt auf (Chiba et al., 2010). Der Grund dafür könnte die reduzierte endozytotische Aktivität der DC`s sein, welche durch die SphK1-Hemmung ausgelöst wird und in einer verminderten Antigenpräsentation resultiert.

## **5. Zusammenfassung**

---

### 5.1 Zusammenfassung

Die aufgrund ihrer ungewöhnlichen Morphologie im Jahre 1864 bereits zum ersten Mal durch den Medizinstudenten Paul Langerhans beschriebenen und nach ihm benannten Zellen wurden erst ein Jahrhundert später durch Ralph Steinman als APC`s der Haut, die als LC`s zu den wichtigsten Vertretern der DC`s gehören, identifiziert. Dank intensiver Forschung der letzten Jahre ist mittlerweile bekannt, dass sie als das bedeutungsvollste Bindeglied zwischen der angeborenen und erworbenen Immunabwehr fungieren, wobei die Präsentation der aufgenommenen Antigene auf der Zelloberfläche eine zentrale Rolle bei diesem physiologischen Prozess einnimmt. Dabei verfügen die DC`s im Gegensatz zu den anderen APC`s über die besondere Fähigkeit, ein breites Spektrum an Antigenen bereits im nanomolaren Bereich zu erkennen und entsprechend für die Lymphozytenpräsentation vorzubereiten. So führt die Wechselwirkung der DC`s als potenteste Initiatoren der spezifischen Immunantwort mit den naiven T-Lymphozyten zu deren Aktivierung und leitet damit die spezifische immunologische Signalkaskade ein, die sich gegen das präsentierte Antigen richtet. Einen essentiellen Schritt in der Ausübung dieser DC-Funktion stellt die Endozytose der Antigene dar, weil erst durch die Präsentation des entsprechenden Fremdmoleküls auf der Zelloberfläche der DC`s gegenüber den T-Zellen eine immunologische Antwort induziert werden kann.

S1P stellt einen neuen biologischen Mediator dar, für den eine multilaterale Modulation vieler immunologischer Mechanismen bereits nachgewiesen werden konnte. Für die biochemische Entfaltung des größten Teils dieses Effekts stehen dem Sphingolipid fünf GPCR`s, S1P<sub>1</sub> – S1P<sub>5</sub> zur Verfügung. Die Signaltransduktion über den S1P<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelt dabei eine zentrale Aufgabe des Lipidmediators in der Immunologie. So steuert S1P über diesen Rezeptor die Zirkulation der T-Lymphozyten zwischen den lymphatischen Organen, der Lymphe und dem Blut. Darüber hinaus besitzt S1P eine essentielle Bedeutung für die Migration der DC`s. In diesem Zusammenhang führt die topische Applikation von S1P in einem CHS-Tiermodell zu einer abgeschwächten Hautentzündungsreaktion im Rahmen einer Atopischen Dermatitis. Dieser Effekt lässt sich auf ein gestörtes Sphingolipid-induziertes Migrationsverhalten der DC`s zurückführen. Im Rahmen dieser Arbeit kann zum ersten Mal auch eine zusätzliche Modulation der DC`s durch S1P nachgewiesen werden, die

bei einer topischen Behandlung zu einer anti-inflammatorischen Wirkung beiträgt. Diese beruht auf einer Beeinflussung der essentiellen Phase der immunologischen DC-Aktivierung, die durch die Endozytose von Antigenen geprägt ist. Tatsächlich kann eine konzentrationsabhängige Reduktion der endozytotischen Kapazität in unreifen DC's durch S1P ermittelt werden. Die Modulation dieses initialen Schritts wird nicht nur in den LC-ähnlichen XS52 Zellen gemessen, sondern kann auch in BM-DC's verifiziert werden. Folglich scheint die S1P-Wirkung nicht spezifisch für die LC's zu sein, denen eine zentrale Rolle bei der Initiierung der pathophysiologischen Hautänderung im Rahmen der Atopischen Dermatitis zugesprochen wird. Vielmehr kann von einer entsprechenden Hemmung der Antigenaufnahme durch S1P in allen unreifen DC's der Haut ausgegangen werden, da dieser Effekt auch in BM-DC's, den Vertretern der dermalen DC's, nachgewiesen werden kann. Im Einklang mit den Zellkulturversuchen zeigt die topische Applikation des Sphingolipids an einem *ex vivo* Modell eine stark verminderte Fähigkeit der epidermalen DC's, die zu den Vertretern der LC's gehören, Antigene aufzunehmen. Diese Erkenntnis bestätigt folglich die Beteiligung der Endozytosemodulation durch S1P an der etablierten, anti-inflammatorischen Wirkung des Sphingolipids im CHS-Modell. In der vorliegenden Arbeit war es zudem von großem Interesse die molekularen Mechanismen aufzuklären, die zu der entsprechenden Reduktion der Endozytose durch S1P führen.

Für die Aufnahme von Antigenen durch die unreifen DC's aus ihrer unmittelbaren Umgebung stehen mehrere Endozytosemechanismen zur Verfügung, die in Makropinozytose, Phagozytose und Rezeptor-vermittelte Endozytose unterteilt werden können. Tatsächlich kann für S1P die Reduktion der unspezifischen Flüssigkeitsaufnahme und der darin gelösten Antigene bzw. der Makropinozytose nachgewiesen werden. Dies steht im Einklang mit einem Aquaporin-7-Knock-out-Tiermodell, in dem gezeigt werden kann, dass die Makropinozytose der Haut-DC's maßgeblich zu der Progression der im CHS-Modell provozierten Atopischen Dermatitis beiträgt. Eine Hemmung des entsprechenden Aufnahmeweges durch S1P führt folglich zu einem antientzündlichen Effekt. Die Untersuchung des dafür verantwortlichen Signalwegs zeigt die bereits etablierte Regulation der PI3K-Aktivität als Ursache für das veränderte Endozytoseverhalten der unreifen DC's. Die mit steigender S1P-Konzentration abnehmende Aktivität des in die Actinpolymerisation bzw. Makropinozytose involvierten Enzyms wird dabei durch die Stimulation des

S1P<sub>2</sub>-Rezeptorsubtyps bewerkstelligt. Dabei steht die demonstrierte S1P<sub>2</sub>-abhängige Reduktion der PI3K-Aktivität in den unreifen DC`s in Kongruenz mit Signalwegen, die durch S1P in anderen Zelltypen, wie zum Beispiel Keratinozyten beobachtet werden können. Darüber hinaus liefert die Erniedrigung der S1P<sub>2</sub>-Rezeptorexpression einen Hinweis auf eine endogene Regulation der Endozytose durch S1P in unreifen DC`s. Diese induziert nämlich eine Steigerung der Antigenaufnahme ohne jeglichen Stimulus von außen.

Die kürzlich veröffentlichte Analyse der LPS-induzierten Zytokinproduktion durch die DC`s offenbart tatsächlich eine Regulation der IL12p70-Sekretion durch das endogen gebildete und über den S1P<sub>1</sub>-Rezeptorsubtyp agierende S1P. Im Fall der endogenen Modulation der Endozytose in den unreifen DC`s kann im Zuge dieser Arbeit ebenfalls ein autokriner Mechanismus unter Beteiligung des Lipidmediators postuliert werden. Dabei zeigt die Steigerung der endogenen S1P-Synthese mittels pharmakologischer SphK1-Aktivierung die erwartete Reduktion der endozytotischen Kapazität. Diese wird von einer verringerten PI3K-Aktivität in den unreifen DC`s begleitet, die auf eine verstärkte Stimulation des S1P<sub>2</sub>-Rezeptorsubtyps zurückgeführt werden kann. Die Analyse des für die transmembranäre Translokation von S1P verantwortlichen Mechanismus kann ebenfalls näher identifiziert werden. Im Einklang mit der Literatur scheint hierfür ein ABC-Transporter verantwortlich zu sein. Der Einsatz verschiedener, spezifischer Hemmstoffe bestätigt die Einbindung des auch in den Mastzellen in die S1P-Homöostase involvierten ABCC1-Transporters. Folglich führt die pharmakologische Inhibierung von ABCC1 zu einer Steigerung der Endozytose. Diese wird von einem stark erniedrigten extrazellulären S1P-Spiegel begleitet, was eine Abschwächung der S1P<sub>2</sub>-Rezeptorstimulation zur Folge hat, so dass die inhibierende Wirkung des Rezeptors bezüglich der Endozytose aufgehoben ist. In dem Zusammenhang zeigen Untersuchungen in Kooperation mit der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, dass die S1P-Homöostase in atopischen Hunden aufgehoben ist. Folglich wird die entsprechende Erkrankung der Haut von einem erniedrigten S1P-Spiegel und damit verbundener Dysregulation des autokrinen S1P-Mechanismus begleitet. So führt dieses auf einem erhöhten S1P-Abbau basierende Phänomen möglicherweise unter anderem zu einer verstärkten Antigenaufnahme bzw. zu einer vermehrten Einleitung der T-Zell-vermittelten spezifischen Immunantworten. Der Grund dafür könnte das Ausbleiben der S1P<sub>2</sub>-vermittelten Reduktion der

endozytotischen Kapazität in den unreifen DC`s sein, was in einer verstärkten Aktivierung dieser APC`s resultiert.

Darüber hinaus kann im Rahmen dieser Arbeit eine indirekte Modulation der Endozytose durch die Beeinflussung der S1P-bildenden Enzyme verifiziert werden, die nicht über GPCR`s verläuft. So führt nicht nur die pharmakologische, sondern auch die genetische Hemmung der SphK1-Aktivität zu einer stark reduzierten Antigenaufnahme in den DC`s, die auf das Einleiten der DC-Differenzierung in den reifen Status zurückgeführt werden kann. Diese unerwartete Modulation der DC-Homöostase kann vermutlich im Ausbleiben der intrazellulären S1P-Signaltransduktion und damit verbundener Effekte bezüglich der DC-Ontogenese begründet sein und bedarf weiterer Nachforschungen.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen eine essentielle Rolle von S1P bei der Endozytose der unreifen DC`s. Da die Antigenaufnahme den Initialschritt in der Immunkaskade darstellt, kann die Aufklärung der damit verbundenen Signalwege zur Etablierung neuer Therapien entzündlicher Erkrankungen wie der Atopischen Dermatitis maßgeblich beitragen.

## 5.2 Abstract

LC`s have originally been described in 1864 by the medical student Paul Langerhans due to their notable morphology. However, the immunological function as the most important subset of antigen presenting cells in the skin has only been clarified a century later by Ralph Steinman. In return for an intensive research on the physiology of DC`s in recent years it has now been established that these APC`s act as an interface between the innate and acquired immune system due to their pronounced endocytotic capacity. In contrast to the other APC subsets DC`s possess the ability to recognize and capture a broad spectrum of antigens. Furthermore, even nanomolar concentrations of several impurities are sufficient to induce endocytosis by DC`s and consequently lead to the presentation of antigens on the DC surface. The following interaction of these activated DC`s with naïve T-lymphocytes initiates the specific immunological signalling cascade, which is targeted to the presented antigen. An essential step in this advanced mechanism of the APC function belongs to the efficient antigen uptake as only the presentation of foreign molecules on the DC surface can provoke an immunological response.

The lipid mediator S1P has been identified as a new biological molecule that is involved in the modulation of multilateral immunological processes. The complexity of S1P mediated actions can be explained by the fact that its functions are not limited to the inside of the cell but it also acts as a ligand of five GPCR`s, namely S1P<sub>1</sub> – S1P<sub>5</sub>, when it is secreted into the extracellular environment. It is well established, that the immunologically necessary circulation of T-lymphocytes between lymphoid organs, lymph and blood is mediated by S1P<sub>1</sub>-receptor signalling. S1P is also involved in the regulation of DC migration. In this context, topically administrated S1P inhibits the inflammatory reaction in an animal model of CHS due to a sphingolipid mediated dysfunction of DC migration. Furthermore, for the first time the present work supplies clear evidence that an additional modulation of DC function contributes to the observed anti-inflammatory effect of local S1P application. The presence of S1P influences the essential step of DC activation, which is characterized by endocytosis of antigens. Stimulation of immature DC`s with S1P demonstrates a dose-dependant reduction of antigen capture by these APC`s. The modulation of this initial step by S1P can be clearly seen in the LC-like XS52 cell-line. Moreover, diminished endocytosis in

response to S1P can also be verified in BM-DC`s, the representatives for dermal DC`s. The modulation of endocytotic capacity by S1P seems not to be restricted to LC`s, which play a crucial role in the initiation of atopic dermatitis. It can be assumed that S1P rather affects the endocytotic capacity of all immature skin DC-subtypes. The present *in vitro* cell culture results are consistent with a performed *ex vivo* animal model, indicating that topical treatment with S1P leads to an inhibition of antigen capture by epidermal DC`s, which belong to LC`s. These findings confirm the involvement of S1P in endocytosis modulation and contribute to the established anti-inflammatory effect of this sphingolipid in an animal model of CHS. In the present work, it was of great interest to specify the molecular mechanisms that lead to the S1P-induced reduction of endocytosis in immature skin DC`s.

In an immature stage, DC`s are able to take up antigens via several different mechanisms that include macropinocytosis, phagocytosis and receptor-mediated endocytosis. An examination of a mechanism affected by S1P indicated that this sphingolipid inhibits the screening of large volumes of fluid for antigens during macropinocytosis in DC`s. These data are consistent with an aquaporine-7-knock-out-animal-model, which clearly demonstrates the central role of macropinocytosis in the development of CHS. Inhibition of the corresponding endocytosis pathway by S1P consequently leads to an anti-inflammatory effect that has been well established in an animal model of CHS. The present study shows that macropinocytosis is mediated by modulation of the PI3K activity, allowing a fine-tuned regulation of antigen capture. Furthermore, the present work indicates that S1P is able to reduce PI3K activity via the S1P<sub>2</sub> receptor subtype, and consequently diminishes actin dependent fluid uptake. In fact, it has already been shown in further cell types like keratinocytes, that the S1P<sub>2</sub> receptor subtype influences PI3K activity. Most interestingly, down regulation of S1P<sub>2</sub> receptor subtype not only prevents the inhibitory effect of S1P on antigen uptake but also increases the basal level of macropinocytotic capacity. These results provide evidence that S1P could be involved in the endogenous regulation of endocytosis in immature DC`s.

Recently presented analysis of LPS-induced cytokine production by DC`s revealed the regulation of IL12p70 secretion by intracellularly formed S1P. In this process, the endogenous sphingolipid acts in an autocrine manner via the S1P<sub>1</sub> receptor. The present work confirms an endogenous modulation of DC function by S1P that can be extended by adding the regulation of endocytosis. This hypothesis has been

substantiated by enhancing the endogenous biosynthesis of S1P using a direct inducer of SphK1 activity. As expected, observed reduction of endocytosis by DC`s in the presence of the SphK1 activator is accompanied by diminished PI3K activity as a consequence of enhanced S1P<sub>2</sub> receptor stimulation. Additionally, it was of great interest how the intracellularly generated S1P is released from DC`s, to reach the extracellular S1P<sub>2</sub> receptor. In agreement with previous studies the present work provides evidence, that an ABC transporter is involved in the secretion of the sphingolipid. The usage of various specific inhibitors of ABC transporters confirms the participation of ABCC1 in S1P release that is also implicated in the homeostasis of mast cells. In fact, the pharmacological inhibition of ABCC1 results in an increase of endocytosis as a consequence of diminished S1P secretion by DC`s leading to a decline in the stimulation of S1P<sub>2</sub> receptor. In cooperation with the University of Veterinary Medicine Hannover evidence has been provided, that in comparison of healthy and atopic dogs, the mean concentration of S1P in lesional skin is significantly lower compared to control. The observed extended degradation of S1P in atopic skin probably contributes to an enhanced antigen uptake and respectively enhanced T-cell response, as the S1P<sub>2</sub> induced reduction of endocytosis is abolished in immature DC`s.

The present work gives an additional proof, that intracellularly acting S1P also indirectly modulates the endocytosis of DC`s. Thus, both pharmacological and genetic inhibition of SphK1 activity result in drastically reduced endocytotic capacity in DC`s accompanied by almost complete abolition of intracellular S1P production. This effect can be explained by the fact that diminished intracellular S1P levels go along with a changed DC homeostasis resulting in a shift towards the mature differentiation stage. Nevertheless, this unexpected modulation of DC physiology is probably the effect of disturbed intracellular S1P signal transduction and requires further investigations.

In summary, the present study demonstrates an essential role of S1P in antigen capture by immature DC`s. Endocytosis is the initial step of the adaptive immune response. Thus, elucidation of related signalling pathways could significantly contribute to the establishment of new treatments for inflammatory diseases such as atopic dermatitis.

## **6. Abkürzungsverzeichnis**

---

ABC	ATP Binding Cassette
AICD	Activation Induced Cell Death
APC	Antigen präsentierende Zelle (antigen presenting cell)
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
BACE1	$\beta$ -site of APP Cleaving Enzyme 1
Bcl-xl	B-Cell Lymphoma 2-like 1
Bim	B-Cell Lymphoma 2 interacting mediator of cell death
BM-DC	Bone Marrow derived Dendritic Cell
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	copy DNA
CHS	Contact Hypersensitivity
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
CXCL1	CXC-Motiv-Chemokin 1
DAPI	Diamidinphenylindol
DC	Dendritische Zelle (dendritic cell)
DEPC	Diethyldicarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDG	Endothelial Differentiation Gene
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting (Durchflusszytometrie)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	Forward Scatter
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Green Fluorescent Protein
GM	Growth Medium
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor
GTP	Guanosintriphosphat

GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
h	Stunde
HEPES	Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
Ig	Immunglobulin
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
INF	Interferon
iNOS	induzierbare NO Synthase
LC	Langerhanszelle (langerhans cell)
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
M-CSF	Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Major Histocompatibility Complex
Min	Minute
M-MuLV RT	Moloney Murine Leukemia Reverse Transkriptase
mRNA	messenger RNA
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositidkinase
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRR	Pattern Recognition Receptor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure

ROS	Reactive Oxygen Species
S	Sekunde
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
siRNA	small interfering RNA
SphK	Sphingosinkinase
SPP	S1P Phosphatase
SSC	Side Scatter
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
TLR	Toll Like Rezeptor
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
TRAF2	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor 2
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

## **7. Literaturverzeichnis**

---

- Aarathi, J. J., M. A. Darendeliler and P. N. Pushparaj (2011). "Dissecting the role of the S1P/S1PR axis in health and disease." *J Dent Res* **90**(7): 841-854.
- Aderem, A. and D. M. Underhill (1999). "Mechanisms of phagocytosis in macrophages." *Annu Rev Immunol* **17**: 593-623.
- Agrawal, A., S. Agrawal, J. N. Cao, H. Su, K. Osann and S. Gupta (2007). "Altered innate immune functioning of dendritic cells in elderly humans: a role of phosphoinositide 3-kinase-signaling pathway." *J Immunol* **178**(11): 6912-6922.
- Aiba, S. and H. Tagami (1998). "Dendritic cell activation induced by various stimuli, e.g. exposure to microorganisms, their products, cytokines, and simple chemicals as well as adhesion to extracellular matrix." *J Dermatol Sci* **20**(1): 1-13.
- Allende, M. L., M. Bektas, B. G. Lee, E. Bonifacino, J. Kang, G. Tuymetova, W. Chen, J. D. Saba and R. L. Proia (2011). "Sphingosine-1-phosphate lyase deficiency produces a pro-inflammatory response while impairing neutrophil trafficking." *J Biol Chem* **286**(9): 7348-7358.
- Alvarez, S. E., K. B. Harikumar, N. C. Hait, J. Allegood, G. M. Strub, E. Y. Kim, M. Maceyka, H. Jiang, C. Luo, T. Kordula, S. Milstien and S. Spiegel (2010). "Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2." *Nature* **465**(7301): 1084-1088.
- An, S., E. J. Goetzl and H. Lee (1998). "Signaling mechanisms and molecular characteristics of G protein-coupled receptors for lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate." *J Cell Biochem Suppl* **30-31**: 147-157.
- Ancellin, N., C. Colmont, J. Su, Q. Li, N. Mittereder, S. S. Chae, S. Stefansson, G. Liao and T. Hla (2002). "Extracellular export of sphingosine kinase-1 enzyme. Sphingosine 1-phosphate generation and the induction of angiogenic vascular maturation." *J Biol Chem* **277**(8): 6667-6675.
- Anjuere, F., P. Martin, I. Ferrero, M. L. Fraga, G. M. del Hoyo, N. Wright and C. Ardavin (1999). "Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, Peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse." *Blood* **93**(2): 590-598.
- Araki, N., T. Hatae, A. Furukawa and J. A. Swanson (2003). "Phosphoinositide-3-kinase-independent contractile activities associated with Fcγ-receptor-mediated phagocytosis and macropinocytosis in macrophages." *J Cell Sci* **116**(Pt 2): 247-257.
- Araki, N., M. T. Johnson and J. A. Swanson (1996). "A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages." *J Cell Biol* **135**(5): 1249-1260.
- Ardeshtna, K. M., A. R. Pizzey, S. Devereux and A. Khwaja (2000). "The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-κB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells." *Blood* **96**(3): 1039-1046.
- Awasthi, A. and V. K. Kuchroo (2009). "Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection." *Int Immunol* **21**(5): 489-498.
- Bagdanoff, J. T., M. S. Donoviel, A. Nouraldeen, M. Carlsen, T. C. Jessop, J. Tarver, S. Aleem, L. Dong, H. Zhang, L. Boteju, J. Hazelwood, J. Yan, M. Bednarz, S. Layek, I. B. Owusu, S. Gopinathan, L. Moran, Z. Lai, J. Kramer, S. D. Kimball, P. Yalamanchili, W. E. Heydorn, K. S. Frazier, B. Brooks, P. Brown, A. Wilson, W. K. Sonnenburg, A. Main, K. G. Carson, T. Oravec and D. J. Augeri (2010). "Inhibition of sphingosine 1-phosphate lyase for the treatment of rheumatoid arthritis: discovery of (E)-1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)-1H-imidazol-2-yl)ethanone oxime (LX2931) and (1R,2S,3R)-1-(2-(isoxazol-3-yl)-

- 1H-imidazol-4-yl)butane-1,2,3,4-tetraol (LX2932)." J Med Chem **53**(24): 8650-8662.
- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran and K. Palucka (2000). "Immunobiology of dendritic cells." Annu Rev Immunol **18**: 767-811.
- Banchereau, J., S. Paczesny, P. Blanco, L. Bennett, V. Pascual, J. Fay and A. K. Palucka (2003). "Dendritic cells: controllers of the immune system and a new promise for immunotherapy." Ann N Y Acad Sci **987**: 180-187.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-252.
- Banki, Z., L. Kacani, B. Mullauer, D. Wilflingseder, G. Obermoser, H. Niederegger, H. Schennach, G. M. Sprinzl, N. Sepp, A. Erdei, M. P. Dierich and H. Stoiber (2003). "Cross-linking of CD32 induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells via NF-kappa B signaling pathway." J Immunol **170**(8): 3963-3970.
- Bar-Sagi, D. and J. R. Feramisco (1986). "Induction of membrane ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescent fibroblasts by ras proteins." Science **233**(4768): 1061-1068.
- Basketter, D., A. Dooms-Goossens, A. T. Karlberg and J. P. Lepoittevin (1995). "The chemistry of contact allergy: why is a molecule allergenic?" Contact Dermatitis **32**(2): 65-73.
- Batoulis, H., M. S. Recks, K. Addicks and S. Kuerten (2011). "Experimental autoimmune encephalomyelitis--achievements and prospective advances." APMIS **119**(12): 819-830.
- Baumer, W., K. Rossbach, R. Mischke, I. Reines, I. Langbein-Detsch, A. Luth and B. Kleuser (2011). "Decreased concentration and enhanced metabolism of sphingosine-1-phosphate in lesional skin of dogs with atopic dermatitis: disturbed sphingosine-1-phosphate homeostasis in atopic dermatitis." J Invest Dermatol **131**(1): 266-268.
- Baumer, W., B. Sulzle, H. Weigt, V. C. De Vries, M. Hecht, T. Tschernig and M. Kietzmann (2005). "Cilomilast, tacrolimus and rapamycin modulate dendritic cell function in the elicitation phase of allergic contact dermatitis." Br J Dermatol **153**(1): 136-144.
- Baumer, W., T. Tschernig, B. Sulzle, U. Seegers, A. Luhrmann and M. Kietzmann (2003). "Effects of cilomilast on dendritic cell function in contact sensitivity and dendritic cell migration through skin." Eur J Pharmacol **481**(2-3): 271-279.
- Bellette, B. M., G. M. Woods, T. Wozniak, K. V. Doherty and H. K. Muller (2003). "DEC-205lo Langerinlo neonatal Langerhans' cells preferentially utilize a wortmannin-sensitive, fluid-phase pathway to internalize exogenous antigen." Immunology **110**(4): 466-473.
- Belz, G. T. and S. L. Nutt (2012). "Transcriptional programming of the dendritic cell network." Nat Rev Immunol **12**(2): 101-113.
- Benko, S., Z. Magyarics, A. Szabo and E. Rajnavolgyi (2008). "Dendritic cell subtypes as primary targets of vaccines: the emerging role and cross-talk of pattern recognition receptors." Biol Chem **389**(5): 469-485.
- Bennett, C. L., M. Noordegraaf, C. A. Martina and B. E. Clausen (2007). "Langerhans cells are required for efficient presentation of topically applied hapten to T cells." J Immunol **179**(10): 6830-6835.
- Bennett, C. L., E. van Rijn, S. Jung, K. Inaba, R. M. Steinman, M. L. Kapsenberg and B. E. Clausen (2005). "Inducible ablation of mouse Langerhans cells

- diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity." J Cell Biol **169**(4): 569-576.
- Bevan, M. J. (2007). "Immunology. The cutting edge of T cell selection." Science **316**(5829): 1291-1292.
- Biemans-Oldehinkel, E., M. K. Doeven and B. Poolman (2006). "ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains." FEBS Lett **580**(4): 1023-1035.
- Bijsterbosch, M. K., W. Donker, H. van de Bilt, S. van Weely, T. J. van Berkel and J. M. Aerts (1996). "Quantitative analysis of the targeting of mannose-terminal glucocerebrosidase. Predominant uptake by liver endothelial cells." Eur J Biochem **237**(2): 344-349.
- Blanco, P., A. K. Palucka, V. Pascual and J. Banchereau (2008). "Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases." Cytokine Growth Factor Rev **19**(1): 41-52.
- Blom, T., N. Bergelin, A. Meinander, C. Lof, J. P. Slotte, J. E. Eriksson and K. Tornquist (2010). "An autocrine sphingosine-1-phosphate signaling loop enhances NF-kappaB-activation and survival." BMC Cell Biol **11**: 45.
- Boks, M. A., J. R. Kager-Groenland, M. S. Haasjes, J. J. Zwaginga, S. M. van Ham and A. ten Brinke (2012). "IL-10-generated tolerogenic dendritic cells are optimal for functional regulatory T cell induction--a comparative study of human clinical-applicable DC." Clin Immunol **142**(3): 332-342.
- Bonifaz, L., D. Bonnyay, K. Mahnke, M. Rivera, M. C. Nussenzweig and R. M. Steinman (2002). "Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance." J Exp Med **196**(12): 1627-1638.
- Borkowski, T. A., J. J. Letterio, A. G. Farr and M. C. Udey (1996). "A role for endogenous transforming growth factor beta 1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming growth factor beta 1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells." J Exp Med **184**(6): 2417-2422.
- Boyle, D., L. F. Tien, N. G. Cooper, V. Shepherd and B. J. McLaughlin (1991). "A mannose receptor is involved in retinal phagocytosis." Invest Ophthalmol Vis Sci **32**(5): 1464-1470.
- Boyman, O. and J. Sprent (2012). "The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system." Nat Rev Immunol **12**(3): 180-190.
- Brinkmann, V., M. D. Davis, C. E. Heise, R. Albert, S. Cottens, R. Hof, C. Bruns, E. Prieschl, T. Baumruker, P. Hiestand, C. A. Foster, M. Zollinger and K. R. Lynch (2002). "The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors." J Biol Chem **277**(24): 21453-21457.
- Burgdorf, S. and C. Kurts (2008). "Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation." Curr Opin Immunol **20**(1): 89-95.
- Burridge, K. and K. Wennerberg (2004). "Rho and Rac take center stage." Cell **116**(2): 167-179.
- Bursch, L. S., L. Wang, B. Igyarto, A. Kissenpfennig, B. Malissen, D. H. Kaplan and K. A. Hogquist (2007). "Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells." J Exp Med **204**(13): 3147-3156.
- Caligan, T. B., K. Peters, J. Ou, E. Wang, J. Saba and A. H. Merrill, Jr. (2000). "A high-performance liquid chromatographic method to measure sphingosine 1-phosphate and related compounds from sphingosine kinase assays and other biological samples." Anal Biochem **281**(1): 36-44.

- Cantley, L. C. (2002). "The phosphoinositide 3-kinase pathway." Science **296**(5573): 1655-1657.
- Cao, W., P. Tan, C. H. Lee, H. Zhang and J. Lu (2006). "A transforming growth factor-beta-induced protein stimulates endocytosis and is up-regulated in immature dendritic cells." Blood **107**(7): 2777-2785.
- Caparros, E., P. Munoz, E. Sierra-Filardi, D. Serrano-Gomez, A. Puig-Kroger, J. L. Rodriguez-Fernandez, M. Mellado, J. Sancho, M. Zubiaur and A. L. Corbi (2006). "DC-SIGN ligation on dendritic cells results in ERK and PI3K activation and modulates cytokine production." Blood **107**(10): 3950-3958.
- Castillo-Badillo, J. A., T. Molina-Munoz, M. T. Romero-Avila, A. Vazquez-Macias, R. Rivera, J. Chun and J. A. Garcia-Sainz (2012). "Sphingosine 1-phosphate-mediated alpha1B-adrenoceptor desensitization and phosphorylation. Direct and paracrine/autocrine actions." Biochim Biophys Acta **1823**(2): 245-254.
- Caux, C., S. Ait-Yahia, K. Chemin, O. de Bouteiller, M. C. Dieu-Nosjean, B. Homey, C. Massacrier, B. Vanbervliet, A. Zlotnik and A. Vicari (2000). "Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines." Springer Semin Immunopathol **22**(4): 345-369.
- Caux, C., C. Massacrier, B. Dubois, J. Valladeau, C. Dezutter-Dambuyant, I. Durand, D. Schmitt and S. Saeland (1999). "Respective involvement of TGF-beta and IL-4 in the development of Langerhans cells and non-Langerhans dendritic cells from CD34+ progenitors." J Leukoc Biol **66**(5): 781-791.
- Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, C. Van Kooten, I. Durand and J. Banchereau (1994). "Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking." J Exp Med **180**(4): 1263-1272.
- Cella, M., A. Engering, V. Pinet, J. Pieters and A. Lanzavecchia (1997). "Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells." Nature **388**(6644): 782-787.
- Cella, M., D. Scheidegger, K. Palmer-Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia and G. Alber (1996). "Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation." J Exp Med **184**(2): 747-752.
- Chappert, P. and R. H. Schwartz (2010). "Induction of T cell anergy: integration of environmental cues and infectious tolerance." Curr Opin Immunol **22**(5): 552-559.
- Chiba, Y., H. Takeuchi, H. Sakai and M. Misawa (2010). "SKI-II, an inhibitor of sphingosine kinase, ameliorates antigen-induced bronchial smooth muscle hyperresponsiveness, but not airway inflammation, in mice." J Pharmacol Sci **114**(3): 304-310.
- Christensen, A. D. and C. Haase (2012). "Immunological mechanisms of contact hypersensitivity in mice." APMIS **120**(1): 1-27.
- Chun, J. and V. Brinkmann (2011). "A mechanistically novel, first oral therapy for multiple sclerosis: the development of fingolimod (FTY720, Gilenya)." Discov Med **12**(64): 213-228.
- Currie, R. A., K. S. Walker, A. Gray, M. Deak, A. Casamayor, C. P. Downes, P. Cohen, D. R. Alessi and J. Lucocq (1999). "Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in regulating the activity and localization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1." Biochem J **337** ( Pt 3): 575-583.
- de Baey, A. and A. Lanzavecchia (2000). "The role of aquaporins in dendritic cell macropinocytosis." J Exp Med **191**(4): 743-748.
- de Jong, E. C., H. H. Smits and M. L. Kapsenberg (2005). "Dendritic cell-mediated T cell polarization." Springer Semin Immunopathol **26**(3): 289-307.

- De Trez, C., B. Pajak, M. Brait, N. Glaichenhaus, J. Urbain, M. Moser, G. Lauvau and E. Muraille (2005). "TLR4 and Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter-inducing IFN-beta, but not MyD88, regulate Escherichia coli-induced dendritic cell maturation and apoptosis in vivo." J Immunol **175**(2): 839-846.
- Dean, M. and R. Allikmets (2001). "Complete characterization of the human ABC gene family." J Bioenerg Biomembr **33**(6): 475-479.
- Delon, C., M. Manifava, E. Wood, D. Thompson, S. Krugmann, S. Pyne and N. T. Ktistakis (2004). "Sphingosine kinase 1 is an intracellular effector of phosphatidic acid." J Biol Chem **279**(43): 44763-44774.
- Di Caro, V., A. D'Anneo, B. Phillips, C. Engman, J. Harnaha, M. Trucco and N. Giannoukakis (2011). "Phosphatidylinositol-3-kinase activity during in vitro dendritic cell generation determines suppressive or stimulatory capacity." Immunol Res **50**(2-3): 130-152.
- Diken, M., S. Kreiter, A. Selmi, C. M. Britten, C. Huber, O. Tureci and U. Sahin (2011). "Selective uptake of naked vaccine RNA by dendritic cells is driven by macropinocytosis and abrogated upon DC maturation." Gene Ther **18**(7): 702-708.
- Dituri, F., A. Mazzocca, G. Giannelli and S. Antonaci (2011). "PI3K functions in cancer progression, anticancer immunity and immune evasion by tumors." Clin Dev Immunol **2011**: 947858.
- Doherty, G. J. and H. T. McMahon (2009). "Mechanisms of endocytosis." Annu Rev Biochem **78**: 857-902.
- Du, W., N. Takuwa, K. Yoshioka, Y. Okamoto, K. Gonda, K. Sugihara, A. Fukamizu, M. Asano and Y. Takuwa (2010). "S1P(2), the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, negatively regulates tumor angiogenesis and tumor growth in vivo in mice." Cancer Res **70**(2): 772-781.
- Duan, H. F., C. T. Wu, Y. Lu, H. Wang, H. J. Liu, Q. W. Zhang, X. X. Jia, Z. Z. Lu and L. S. Wang (2004). "Sphingosine kinase activation regulates hepatocyte growth factor induced migration of endothelial cells." Exp Cell Res **298**(2): 593-601.
- Dubois, B., C. Massacrier, B. Vanbervliet, J. Fayette, F. Briere, J. Banchereau and C. Caux (1998). "Critical role of IL-12 in dendritic cell-induced differentiation of naive B lymphocytes." J Immunol **161**(5): 2223-2231.
- Eigenbrod, S., R. Derwand, V. Jakl, S. Endres and A. Eigler (2006). "Sphingosine kinase and sphingosine-1-phosphate regulate migration, endocytosis and apoptosis of dendritic cells." Immunol Invest **35**(2): 149-165.
- Enk, A. H. and S. I. Katz (1992). "Early events in the induction phase of contact sensitivity." J Invest Dermatol **99**(5): 39S-41S.
- Fanger, N. A., D. Voigtlaender, C. Liu, S. Swink, K. Wardwell, J. Fisher, R. F. Graziano, L. C. Pfefferkorn and P. M. Guyre (1997). "Characterization of expression, cytokine regulation, and effector function of the high affinity IgG receptor Fc gamma RI (CD64) expressed on human blood dendritic cells." J Immunol **158**(7): 3090-3098.
- Fanger, N. A., K. Wardwell, L. Shen, T. F. Tedder and P. M. Guyre (1996). "Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells." J Immunol **157**(2): 541-548.
- Fayard, E., L. A. Tintignac, A. Baudry and B. A. Hemmings (2005). "Protein kinase B/Akt at a glance." J Cell Sci **118**(Pt 24): 5675-5678.
- Fischer, I., C. Alliod, N. Martinier, J. Newcombe, C. Brana and S. Pouly (2011). "Sphingosine kinase 1 and sphingosine 1-phosphate receptor 3 are

- functionally upregulated on astrocytes under pro-inflammatory conditions." PLoS One **6**(8): e23905.
- Forster, R., A. C. Davalos-Misslitz and A. Rot (2008). "CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance." Nat Rev Immunol **8**(5): 362-371.
- French, K. J., R. S. Schrecengost, B. D. Lee, Y. Zhuang, S. N. Smith, J. L. Eberly, J. K. Yun and C. D. Smith (2003). "Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase." Cancer Res **63**(18): 5962-5969.
- French, K. J., J. J. Upson, S. N. Keller, Y. Zhuang, J. K. Yun and C. D. Smith (2006). "Antitumor activity of sphingosine kinase inhibitors." J Pharmacol Exp Ther **318**(2): 596-603.
- Freudenberg, M. A., P. R. Esser, T. Jakob, C. Galanos and S. F. Martin (2009). "Innate and adaptive immune responses in contact dermatitis: analogy with infections." G Ital Dermatol Venereol **144**(2): 173-185.
- Fukao, T. and S. Koyasu (2003). "PI3K and negative regulation of TLR signaling." Trends Immunol **24**(7): 358-363.
- Fukao, T., M. Tanabe, Y. Terauchi, T. Ota, S. Matsuda, T. Asano, T. Kadowaki, T. Takeuchi and S. Koyasu (2002). "PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in DCs." Nat Immunol **3**(9): 875-881.
- Gallucci, S., M. Lolkema and P. Matzinger (1999). "Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells." Nat Med **5**(11): 1249-1255.
- Garrett, W. S., L. M. Chen, R. Kroschewski, M. Ebersold, S. Turley, S. Trombetta, J. E. Galan and I. Mellman (2000). "Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42." Cell **102**(3): 325-334.
- Gazi, U. and L. Martinez-Pomares (2009). "Influence of the mannose receptor in host immune responses." Immunobiology **214**(7): 554-561.
- Ghigo, A., F. Damilano, L. Braccini and E. Hirsch (2010). "PI3K inhibition in inflammation: Toward tailored therapies for specific diseases." Bioessays **32**(3): 185-196.
- Ghosh, T. K., J. Bian and D. L. Gill (1990). "Intracellular calcium release mediated by sphingosine derivatives generated in cells." Science **248**(4963): 1653-1656.
- Ghosh, T. K., J. Bian and D. L. Gill (1994). "Sphingosine 1-phosphate generated in the endoplasmic reticulum membrane activates release of stored calcium." J Biol Chem **269**(36): 22628-22635.
- Gordon, S. (2002). "Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response." Cell **111**(7): 927-930.
- Gordon, S., V. H. Perry, S. Rabinowitz, L. P. Chung and H. Rosen (1988). "Plasma membrane receptors of the mononuclear phagocyte system." J Cell Sci Suppl **9**: 1-26.
- Graler, M. H., R. Grosse, A. Kusch, E. Kremmer, T. Gudermann and M. Lipp (2003). "The sphingosine 1-phosphate receptor S1P4 regulates cell shape and motility via coupling to Gi and G12/13." J Cell Biochem **89**(3): 507-519.
- Granucci, F., I. Zanoni, S. Feau and P. Ricciardi-Castagnoli (2003). "Dendritic cell regulation of immune responses: a new role for interleukin 2 at the intersection of innate and adaptive immunity." EMBO J **22**(11): 2546-2551.
- Green, J. A., K. Suzuki, B. Cho, L. D. Willison, D. Palmer, C. D. Allen, T. H. Schmidt, Y. Xu, R. L. Proia, S. R. Coughlin and J. G. Cyster (2011). "The sphingosine 1-phosphate receptor S1P(2) maintains the homeostasis of germinal center B cells and promotes niche confinement." Nat Immunol **12**(7): 672-680.
- Grimmer, S., B. van Deurs and K. Sandvig (2002). "Membrane ruffling and macropinocytosis in A431 cells require cholesterol." J Cell Sci **115**(Pt 14): 2953-2962.

- Guan, H., L. Song, J. Cai, Y. Huang, J. Wu, J. Yuan, J. Li and M. Li (2011). "Sphingosine Kinase 1 Regulates the Akt/FOXO3a/Bim Pathway and Contributes to Apoptosis Resistance in Glioma Cells." PLoS One **6**(5): e19946.
- Guillemet-Guibert, J., K. Bjorklof, A. Salpekar, C. Gonella, F. Ramadani, A. Bilancio, S. Meek, A. J. Smith, K. Okkenhaug and B. Vanhaesebroeck (2008). "The p110beta isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110gamma." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(24): 8292-8297.
- Hackstein, H., T. Taner, A. J. Logar and A. W. Thomson (2002). "Rapamycin inhibits macropinocytosis and mannose receptor-mediated endocytosis by bone marrow-derived dendritic cells." Blood **100**(3): 1084-1087.
- Hait, N. C., C. A. Oskeritzian, S. W. Paugh, S. Milstien and S. Spiegel (2006). "Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases." Biochim Biophys Acta **1758**(12): 2016-2026.
- Hait, N. C., S. Sarkar, H. Le Stunff, A. Mikami, M. Maceyka, S. Milstien and S. Spiegel (2005). "Role of sphingosine kinase 2 in cell migration toward epidermal growth factor." J Biol Chem **280**(33): 29462-29469.
- Hanel, P., P. Andreani and M. H. Graler (2007). "Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood." FASEB J **21**(4): 1202-1209.
- Hannun, Y. A. and L. M. Obeid (2008). "Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(2): 139-150.
- Hara-Chikuma, M., Y. Sugiyama, K. Kabashima, E. Sohara, S. Uchida, S. Sasaki, S. Inoue and Y. Miyachi (2012). "Involvement of aquaporin-7 in the cutaneous primary immune response through modulation of antigen uptake and migration in dendritic cells." FASEB J **26**(1): 211-218.
- Hennessy, B. T., D. L. Smith, P. T. Ram, Y. Lu and G. B. Mills (2005). "Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery." Nat Rev Drug Discov **4**(12): 988-1004.
- Herr, D. R., N. Grillet, M. Schwander, R. Rivera, U. Muller and J. Chun (2007). "Sphingosine 1-phosphate (S1P) signaling is required for maintenance of hair cells mainly via activation of S1P2." J Neurosci **27**(6): 1474-1478.
- Hla, T. (2001). "Sphingosine 1-phosphate receptors." Prostaglandins **64**(1-4): 135-142.
- Hla, T. and T. Maciag (1990). "An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors." J Biol Chem **265**(16): 9308-9313.
- Holland, I. B. and M. A. Blight (1999). "ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans." J Mol Biol **293**(2): 381-399.
- Hong, J. H., J. K. Youm, M. J. Kwon, B. D. Park, Y. M. Lee, S. I. Lee, D. M. Shin and S. H. Lee (2008). "K6PC-5, a direct activator of sphingosine kinase 1, promotes epidermal differentiation through intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling." J Invest Dermatol **128**(9): 2166-2178.
- Huwiler, A., T. Kolter, J. Pfeilschifter and K. Sandhoff (2000). "Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling." Biochim Biophys Acta **1485**(2-3): 63-99.
- Idzko, M., H. Hammad, M. van Nimwegen, M. Kool, T. Muller, T. Soullie, M. A. Willart, D. Hijdra, H. C. Hoogsteden and B. N. Lambrecht (2006). "Local application of FTY720 to the lung abrogates experimental asthma by altering dendritic cell function." J Clin Invest **116**(11): 2935-2944.

- Igyarto, B. Z., M. C. Jenison, J. C. Dudda, A. Roers, W. Muller, P. A. Koni, D. J. Campbell, M. J. Shlomchik and D. H. Kaplan (2009). "Langerhans cells suppress contact hypersensitivity responses via cognate CD4 interaction and langerhans cell-derived IL-10." J Immunol **183**(8): 5085-5093.
- Inaba, K., M. Inaba, M. Naito and R. M. Steinman (1993). "Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo." J Exp Med **178**(2): 479-488.
- Inagaki, Y., T. T. Pham, Y. Fujiwara, T. Kohno, D. A. Osborne, Y. Igarashi, G. Tigyi and A. L. Parrill (2005). "Sphingosine 1-phosphate analogue recognition and selectivity at S1P4 within the endothelial differentiation gene family of receptors." Biochem J **389**(Pt 1): 187-195.
- Ishii, I., N. Fukushima, X. Ye and J. Chun (2004). "Lysophospholipid receptors: signaling and biology." Annu Rev Biochem **73**: 321-354.
- Ito, K., Y. Anada, M. Tani, M. Ikeda, T. Sano, A. Kihara and Y. Igarashi (2007). "Lack of sphingosine 1-phosphate-degrading enzymes in erythrocytes." Biochem Biophys Res Commun **357**(1): 212-217.
- Jaillard, C., S. Harrison, B. Stankoff, M. S. Aigrot, A. R. Calver, G. Duddy, F. S. Walsh, M. N. Pangalos, N. Arimura, K. Kaibuchi, B. Zalc and C. Lubetzki (2005). "Edg8/S1P5: an oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival." J Neurosci **25**(6): 1459-1469.
- Japtok, L. and B. Kleuser (2009). "The role of sphingosine-1-phosphate receptor modulators in the prevention of transplant rejection and autoimmune diseases." Curr Opin Investig Drugs **10**(11): 1183-1194.
- Jonuleit, H., U. Kuhn, G. Muller, K. Steinbrink, L. Paragnik, E. Schmitt, J. Knop and A. H. Enk (1997). "Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions." Eur J Immunol **27**(12): 3135-3142.
- Jung, I. D., H. S. Lee, H. Y. Lee and O. H. Choi (2009). "FcepsilonRI-mediated mast cell migration: signaling pathways and dependence on cytosolic free Ca<sup>2+</sup> concentration." Cell Signal **21**(11): 1698-1705.
- Junger, W. G. (2011). "Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling." Nat Rev Immunol **11**(3): 201-212.
- Kaplan, D. H., M. C. Jenison, S. Saeland, W. D. Shlomchik and M. J. Shlomchik (2005). "Epidermal langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity." Immunity **23**(6): 611-620.
- Kaplan, D. H., A. Kissenpfennig and B. E. Clausen (2008). "Insights into Langerhans cell function from Langerhans cell ablation models." Eur J Immunol **38**(9): 2369-2376.
- Karmouty-Quintana, H., S. Siddiqui, M. Hassan, K. Tsuchiya, P. A. Risse, L. Xicota-Vila, M. Marti-Solano and J. G. Martin (2012). "Treatment with a sphingosine-1-phosphate analog inhibits airway remodeling following repeated allergen exposure." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **302**(8): L736-745.
- Kato, M., T. K. Neil, D. B. Fearnley, A. D. McLellan, S. Vuckovic and D. N. Hart (2000). "Expression of multilectin receptors and comparative FITC-dextran uptake by human dendritic cells." Int Immunol **12**(11): 1511-1519.
- Katsnelson, A. (2006). "Kicking off adaptive immunity: the discovery of dendritic cells." J Exp Med **203**(7): 1622.
- Kerr, M. C. and R. D. Teasdale (2009). "Defining macropinocytosis." Traffic **10**(4): 364-371.

- Kihara, A., Y. Anada and Y. Igarashi (2006). "Mouse sphingosine kinase isoforms SPHK1a and SPHK1b differ in enzymatic traits including stability, localization, modification, and oligomerization." J Biol Chem **281**(7): 4532-4539.
- Kim, J. W., Y. W. Kim, Y. Inagaki, Y. A. Hwang, S. Mitsutake, Y. W. Ryu, W. K. Lee, H. J. Ha, C. S. Park and Y. Igarashi (2005). "Synthesis and evaluation of sphingoid analogs as inhibitors of sphingosine kinases." Bioorg Med Chem **13**(10): 3475-3485.
- Kim, R. H., K. Takabe, S. Milstien and S. Spiegel (2009). "Export and functions of sphingosine-1-phosphate." Biochim Biophys Acta **1791**(7): 692-696.
- Kimber, I. and R. J. Dearman (2002). "Allergic contact dermatitis: the cellular effectors." Contact Dermatitis **46**(1): 1-5.
- Kinet, J. P. (1989). "Antibody-cell interactions: Fc receptors." Cell **57**(3): 351-354.
- Kissenpfennig, A., S. Henri, B. Dubois, C. Laplace-Builhe, P. Perrin, N. Romani, C. H. Tripp, P. Douillard, L. Leserman, D. Kaiserlian, S. Saeland, J. Davoust and B. Malissen (2005). "Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells." Immunity **22**(5): 643-654.
- Kitajima, T., K. Ariizumi, P. R. Bergstresser and A. Takashima (1996). "A novel mechanism of glucocorticoid-induced immune suppression: the inhibition of T cell-mediated terminal maturation of a murine dendritic cell line." J Clin Invest **98**(1): 142-147.
- Klippel, A., W. M. Kavanaugh, D. Pot and L. T. Williams (1997). "A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain." Mol Cell Biol **17**(1): 338-344.
- Kobayashi, N., T. Nishi, T. Hirata, A. Kihara, T. Sano, Y. Igarashi and A. Yamaguchi (2006). "Sphingosine 1-phosphate is released from the cytosol of rat platelets in a carrier-mediated manner." J Lipid Res **47**(3): 614-621.
- Kobayashi, N., A. Yamaguchi and T. Nishi (2009). "Characterization of the ATP-dependent sphingosine 1-phosphate transporter in rat erythrocytes." J Biol Chem **284**(32): 21192-21200.
- Kono, M., I. A. Belyantseva, A. Skoura, G. I. Frolenkov, M. F. Starost, J. L. Dreier, D. Lidington, S. S. Bolz, T. B. Friedman, T. Hla and R. L. Proia (2007). "Deafness and stria vascularis defects in S1P2 receptor-null mice." J Biol Chem **282**(14): 10690-10696.
- Kumar, A. and J. D. Saba (2009). "Lyase to live by: sphingosine phosphate lyase as a therapeutic target." Expert Opin Ther Targets **13**(8): 1013-1025.
- Kyewski, B. and L. Klein (2006). "A central role for central tolerance." Annu Rev Immunol **24**: 571-606.
- Lahiri, S. and A. H. Futerman (2007). "The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids." Cell Mol Life Sci **64**(17): 2270-2284.
- Lamana, A., P. Martin, H. de la Fuente, L. Martinez-Munoz, A. Cruz-Adalia, M. Ramirez-Huesca, C. Escribano, K. Gollmer, M. Mellado, J. V. Stein, J. L. Rodriguez-Fernandez, F. Sanchez-Madrid and G. M. del Hoyo (2011). "CD69 modulates sphingosine-1-phosphate-induced migration of skin dendritic cells." J Invest Dermatol **131**(7): 1503-1512.
- Lambrecht, B. N. and H. Hammad (2003). "Taking our breath away: dendritic cells in the pathogenesis of asthma." Nat Rev Immunol **3**(12): 994-1003.
- Le Roux, D., A. Le Bon, A. Dumas, K. Taleb, M. Sachse, R. Sikora, M. Julithe, A. Benmerah, G. Bismuth and F. Niedergang (2012). "Antigen stored in dendritic cells after macropinocytosis is released unprocessed from late endosomes to target B cells." Blood **119**(1): 95-105.

- Lee, H. M., J. L. Bautista and C. S. Hsieh (2011). "Thymic and peripheral differentiation of regulatory T cells." Adv Immunol **112**: 25-71.
- Lehner, M., B. Kellert, J. Proff, M. A. Schmid, P. Diessenbacher, A. Ensser, J. Dorrie, N. Schaft, M. Leverkus, E. Kampgen and W. Holter (2012). "Autocrine TNF is critical for the survival of human dendritic cells by regulating BAK, BCL-2, and FLIPL." J Immunol **188**(10): 4810-4818.
- Lew, D. B., E. Songu-Mize, S. E. Pontow, P. D. Stahl and M. C. Rattazzi (1994). "A mannose receptor mediates mannosyl-rich glycoprotein-induced mitogenesis in bovine airway smooth muscle cells." J Clin Invest **94**(5): 1855-1863.
- Liao, W., J. X. Lin and W. J. Leonard (2011). "IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation." Curr Opin Immunol **23**(5): 598-604.
- Lim, J. P. and P. A. Gleeson (2011). "Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps." Immunol Cell Biol **89**(8): 836-843.
- Liu, F., A. D. Verin, P. Wang, R. Day, R. P. Wersto, F. J. Chrest, D. K. English and J. G. Garcia (2001). "Differential regulation of sphingosine-1-phosphate- and VEGF-induced endothelial cell chemotaxis. Involvement of G(alpha2)-linked Rho kinase activity." Am J Respir Cell Mol Biol **24**(6): 711-719.
- Liu, K. and M. C. Nussenzweig (2010). "Origin and development of dendritic cells." Immunol Rev **234**(1): 45-54.
- Liu, X., Q. H. Zhang and G. H. Yi (2012). "Regulation of metabolism and transport of sphingosine-1-phosphate in mammalian cells." Mol Cell Biochem **363**(1-2): 21-33.
- Liu, Y., J. Jiang, H. Xiao, X. Wang, Y. Li, Y. Gong, D. Wang and Y. Huang (2012). "Topical application of FTY720 and cyclosporin A prolong corneal graft survival in mice." Mol Vis **18**: 624-633.
- Liu, Y., R. Wada, T. Yamashita, Y. Mi, C. X. Deng, J. P. Hobson, H. M. Rosenfeldt, V. E. Nava, S. S. Chae, M. J. Lee, C. H. Liu, T. Hla, S. Spiegel and R. L. Proia (2000). "Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation." J Clin Invest **106**(8): 951-961.
- Liu, Y. J. (2001). "Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity." Cell **106**(3): 259-262.
- Lutz, M. B. (2012). "Therapeutic potential of semi-mature dendritic cells for tolerance induction." Front Immunol **3**: 123.
- Lutz, M. B., N. Kukutsch, A. L. Ogilvie, S. Rossner, F. Koch, N. Romani and G. Schuler (1999). "An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow." J Immunol Methods **223**(1): 77-92.
- Lutz, M. B. and G. Schuler (2002). "Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?" Trends Immunol **23**(9): 445-449.
- Maceyka, M., H. Sankala, N. C. Hait, H. Le Stunff, H. Liu, R. Toman, C. Collier, M. Zhang, L. S. Satin, A. H. Merrill, Jr., S. Milstien and S. Spiegel (2005). "SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism." J Biol Chem **280**(44): 37118-37129.
- MacLennan, A. J., P. R. Carney, W. J. Zhu, A. H. Chaves, J. Garcia, J. R. Grimes, K. J. Anderson, S. N. Roper and N. Lee (2001). "An essential role for the H218/AGR16/Edg-5/LP(B2) sphingosine 1-phosphate receptor in neuronal excitability." Eur J Neurosci **14**(2): 203-209.
- Maeda, Y., H. Matsuyuki, K. Shimano, H. Kataoka, K. Sugahara and K. Chiba (2007). "Migration of CD4 T cells and dendritic cells toward sphingosine 1-phosphate

- (S1P) is mediated by different receptor subtypes: S1P regulates the functions of murine mature dendritic cells via S1P receptor type 3." J Immunol **178**(6): 3437-3446.
- Mandala, S., R. Hajdu, J. Bergstrom, E. Quackenbush, J. Xie, J. Milligan, R. Thornton, G. J. Shei, D. Card, C. Keohane, M. Rosenbach, J. Hale, C. L. Lynch, K. Rupprecht, W. Parsons and H. Rosen (2002). "Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists." Science **296**(5566): 346-349.
- Manicassamy, S. and B. Pulendran (2011). "Dendritic cell control of tolerogenic responses." Immunol Rev **241**(1): 206-227.
- Manz, M. G., D. Traver, K. Akashi, M. Merad, T. Miyamoto, E. G. Engleman and I. L. Weissman (2001). "Dendritic cell development from common myeloid progenitors." Ann N Y Acad Sci **938**: 167-173; discussion 173-164.
- Marshall, N. A., K. C. Galvin, A. M. Corcoran, L. Boon, R. Higgs and K. H. Mills (2012). "Immunotherapy with PI3K inhibitor and Toll-like receptor agonist induces IFN-gamma+IL-17+ polyfunctional T cells that mediate rejection of murine tumors." Cancer Res **72**(3): 581-591.
- Martin, P., G. M. del Hoyo, F. Anjuere, S. R. Ruiz, C. F. Arias, A. R. Marin and C. Ardavin (2000). "Concept of lymphoid versus myeloid dendritic cell lineages revisited: both CD8alpha(-) and CD8alpha(+) dendritic cells are generated from CD4(low) lymphoid-committed precursors." Blood **96**(7): 2511-2519.
- Martino, A. (2007). "Sphingosine 1-phosphate as a novel immune regulator of dendritic cells." J Biosci **32**(6): 1207-1212.
- Martino, A., E. Volpe, G. Auricchio, V. Izzi, F. Poccia, F. Mariani, V. Colizzi and P. M. Baldini (2007). "Sphingosine 1-phosphate interferes on the differentiation of human monocytes into competent dendritic cells." Scand J Immunol **65**(1): 84-91.
- Matsushita, S., R. Takagi, K. Hashimoto and T. Higashi (2011). "Qualitative evaluation of adjuvant activities and its application to Th2/17 diseases." Int Arch Allergy Immunol **155 Suppl 1**: 2-5.
- Mattie, M., G. Brooker and S. Spiegel (1994). "Sphingosine-1-phosphate, a putative second messenger, mobilizes calcium from internal stores via an inositol trisphosphate-independent pathway." J Biol Chem **269**(5): 3181-3188.
- McGreal, E. P., J. L. Miller and S. Gordon (2005). "Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors." Curr Opin Immunol **17**(1): 18-24.
- McQuiston, T., C. Luberto and M. Del Poeta (2011). "Role of sphingosine-1-phosphate (S1P) and S1P receptor 2 in the phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* by alveolar macrophages." Microbiology **157**(Pt 5): 1416-1427.
- Medzhitov, R. (2001). "Toll-like receptors and innate immunity." Nat Rev Immunol **1**(2): 135-145.
- Merrill, A. H., Jr. (2002). "De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway." J Biol Chem **277**(29): 25843-25846.
- Meyer zu Heringdorf, D., H. Lass, I. Kuchar, M. Lipinski, R. Alemany, U. Rumenapp and K. H. Jakobs (2001). "Stimulation of intracellular sphingosine-1-phosphate production by G-protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptors." Eur J Pharmacol **414**(2-3): 145-154.
- Michaud, J., D. S. Im and T. Hla (2010). "Inhibitory role of sphingosine 1-phosphate receptor 2 in macrophage recruitment during inflammation." J Immunol **184**(3): 1475-1483.
- Milburn, C. C., M. Deak, S. M. Kelly, N. C. Price, D. R. Alessi and D. M. Van Aalten (2003). "Binding of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate to the pleckstrin

- homology domain of protein kinase B induces a conformational change." Biochem J **375**(Pt 3): 531-538.
- Mitra, P., C. A. Oskeritzian, S. G. Payne, M. A. Beaven, S. Milstien and S. Spiegel (2006). "Role of ABCC1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(44): 16394-16399.
- Mizugishi, K., T. Yamashita, A. Olivera, G. F. Miller, S. Spiegel and R. L. Proia (2005). "Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development." Mol Cell Biol **25**(24): 11113-11121.
- Moeller, I., G. C. Spagnoli, J. Finke, H. Veelken and L. Houet (2012). "Uptake routes of tumor-antigen MAGE-A3 by dendritic cells determine priming of naive T-cell subtypes." Cancer Immunol Immunother.
- Mommaas, A. M., A. A. Mulder, R. Jordens, C. Out, M. C. Tan, P. Cresswell, P. M. Kluin and F. Koning (1999). "Human epidermal Langerhans cells lack functional mannose receptors and a fully developed endosomal/lysosomal compartment for loading of HLA class II molecules." Eur J Immunol **29**(2): 571-580.
- Murata, N., K. Sato, J. Kon, H. Tomura, M. Yanagita, A. Kuwabara, M. Ui and F. Okajima (2000). "Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions." Biochem J **352 Pt 3**: 809-815.
- Nayak, D., Y. Huo, W. X. Kwang, P. N. Pushparaj, S. D. Kumar, E. A. Ling and S. T. Dheen (2010). "Sphingosine kinase 1 regulates the expression of proinflammatory cytokines and nitric oxide in activated microglia." Neuroscience **166**(1): 132-144.
- Nicola, A. M., A. Casadevall and D. L. Goldman (2008). "Fungal killing by mammalian phagocytic cells." Curr Opin Microbiol **11**(4): 313-317.
- Nicolo, C., B. Tomassini, M. R. Rippo and R. Testi (2001). "UVB-induced apoptosis of human dendritic cells: contribution by caspase-dependent and caspase-independent pathways." Blood **97**(6): 1803-1808.
- Niessen, F., F. Schaffner, C. Furlan-Freguia, R. Pawlinski, G. Bhattacharjee, J. Chun, C. K. Derian, P. Andrade-Gordon, H. Rosen and W. Ruf (2008). "Dendritic cell PAR1-S1P3 signalling couples coagulation and inflammation." Nature **452**(7187): 654-658.
- Nieuwenhuis, B., A. Luth and B. Kleuser (2010). "Dexamethasone protects human fibroblasts from apoptosis via an S1P3-receptor subtype dependent activation of PKB/Akt and Bcl XL." Pharmacol Res **61**(5): 449-459.
- Nobes, C. and M. Marsh (2000). "Dendritic cells: new roles for Cdc42 and Rac in antigen uptake?" Curr Biol **10**(20): R739-741.
- Nofer, J. R., M. van der Giet, M. Tolle, I. Wolinska, K. von Wnuck Lipinski, H. A. Baba, U. J. Tietge, A. Godecke, I. Ishii, B. Kleuser, M. Schafers, M. Fobker, W. Zidek, G. Assmann, J. Chun and B. Levkau (2004). "HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3." J Clin Invest **113**(4): 569-581.
- Norbury, C. C. (2006). "Drinking a lot is good for dendritic cells." Immunology **117**(4): 443-451.
- Nossal, G. J. (1994). "Negative selection of lymphocytes." Cell **76**(2): 229-239.
- Ocana-Morgner, C., P. Reichardt, M. Chopin, S. Braungart, C. Wahren, M. Gunzer and R. Jessberger (2011). "Sphingosine 1-phosphate-induced motility and endocytosis of dendritic cells is regulated by SWAP-70 through RhoA." J Immunol **186**(9): 5345-5355.

- Okamoto, H., N. Takuwa, T. Yokomizo, N. Sugimoto, S. Sakurada, H. Shigematsu and Y. Takuwa (2000). "Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3." Mol Cell Biol **20**(24): 9247-9261.
- Olivera, A. and J. Rivera (2011). "An emerging role for the lipid mediator sphingosine-1-phosphate in mast cell effector function and allergic disease." Adv Exp Med Biol **716**: 123-142.
- Papadopoulos, E. J., C. Sasseti, H. Saeki, N. Yamada, T. Kawamura, D. J. Fitzhugh, M. A. Saraf, T. Schall, A. Blauvelt, S. D. Rosen and S. T. Hwang (1999). "Fractalkine, a CX3C chemokine, is expressed by dendritic cells and is up-regulated upon dendritic cell maturation." Eur J Immunol **29**(8): 2551-2559.
- Pettus, B. J., J. Bielawski, A. M. Porcelli, D. L. Reames, K. R. Johnson, J. Morrow, C. E. Chalfant, L. M. Obeid and Y. A. Hannun (2003). "The sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate pathway mediates COX-2 induction and PGE2 production in response to TNF-alpha." FASEB J **17**(11): 1411-1421.
- Pierre, P. and I. Mellman (1998). "Exploring the mechanisms of antigen processing by cell fractionation." Curr Opin Immunol **10**(2): 145-153.
- Pitson, S. M., P. A. Moretti, J. R. Zebol, H. E. Lynn, P. Xia, M. A. Vadas and B. W. Wattenberg (2003). "Activation of sphingosine kinase 1 by ERK1/2-mediated phosphorylation." EMBO J **22**(20): 5491-5500.
- Platt, C. D., J. K. Ma, C. Chalouni, M. Ebersold, H. Bou-Reslan, R. A. Carano, I. Mellman and L. Delamarre (2010). "Mature dendritic cells use endocytic receptors to capture and present antigens." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(9): 4287-4292.
- Platta, H. W. and H. Stenmark (2011). "Endocytosis and signaling." Curr Opin Cell Biol **23**(4): 393-403.
- Puneet, P., C. T. Yap, L. Wong, Y. Lam, D. R. Koh, S. Moochhala, J. Pfeilschifter, A. Huwiler and A. J. Melendez (2010). "SphK1 regulates proinflammatory responses associated with endotoxin and polymicrobial sepsis." Science **328**(5983): 1290-1294.
- Racoosin, E. L. and J. A. Swanson (1989). "Macrophage colony-stimulating factor (rM-CSF) stimulates pinocytosis in bone marrow-derived macrophages." J Exp Med **170**(5): 1635-1648.
- Racoosin, E. L. and J. A. Swanson (1992). "M-CSF-induced macropinocytosis increases solute endocytosis but not receptor-mediated endocytosis in mouse macrophages." J Cell Sci **102 ( Pt 4)**: 867-880.
- Radeke, H. H., H. von Wenckstern, K. Stoldtner, B. Sauer, S. Hammer and B. Kleuser (2005). "Overlapping signaling pathways of sphingosine 1-phosphate and TGF-beta in the murine Langerhans cell line XS52." J Immunol **174**(5): 2778-2786.
- Rathinasamy, A., N. Czeloth, O. Pabst, R. Forster and G. Bernhardt (2010). "The origin and maturity of dendritic cells determine the pattern of sphingosine 1-phosphate receptors expressed and required for efficient migration." J Immunol **185**(7): 4072-4081.
- Rea, P. A., Z. S. Li, Y. P. Lu, Y. M. Drozdowicz and E. Martinoia (1998). "From Vacuolar Gs-X Pumps to Multispecific Abc Transporters." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **49**: 727-760.
- Reines, I., M. Kietzmann, R. Mischke, T. Tschernig, A. Luth, B. Kleuser and W. Baumer (2009). "Topical application of sphingosine-1-phosphate and FTY720 attenuate allergic contact dermatitis reaction through inhibition of dendritic cell migration." J Invest Dermatol **129**(8): 1954-1962.

- Reis e Sousa, C., P. D. Stahl and J. M. Austyn (1993). "Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro." J Exp Med **178**(2): 509-519.
- Ren, S., C. Xin, J. Pfeilschifter and A. Huwiler (2010). "A novel mode of action of the putative sphingosine kinase inhibitor 2-(p-hydroxyanilino)-4-(p-chlorophenyl) thiazole (SKI II): induction of lysosomal sphingosine kinase 1 degradation." Cell Physiol Biochem **26**(1): 97-104.
- Rescigno, M., F. Granucci and P. Ricciardi-Castagnoli (1999). "Dendritic cells at the end of the millennium." Immunol Cell Biol **77**(5): 404-410.
- Riccio, A. (2010). "New endogenous regulators of class I histone deacetylases." Sci Signal **3**(103): pe1.
- Robbiani, D. F., R. A. Finch, D. Jager, W. A. Muller, A. C. Sartorelli and G. J. Randolph (2000). "The leukotriene C(4) transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3beta, ELC)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes." Cell **103**(5): 757-768.
- Romani, N., P. M. Brunner and G. Stingl (2012). "Changing views of the role of Langerhans cells." J Invest Dermatol **132**(3 Pt 2): 872-881.
- Romani, N., S. Holzmann, C. H. Tripp, F. Koch and P. Stoitzner (2003). "Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis." APMIS **111**(7-8): 725-740.
- Rommel, C., M. Camps and H. Ji (2007). "PI3K delta and PI3K gamma: partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond?" Nat Rev Immunol **7**(3): 191-201.
- Rose, L., C. Schneider, C. Stock, T. M. Zollner and W. D. Docke (2012). "Extended DNFB-induced contact hypersensitivity models display characteristics of chronic inflammatory dermatoses." Exp Dermatol **21**(1): 25-31.
- Rosen, H., P. J. Gonzalez-Cabrera, M. G. Sanna and S. Brown (2009). "Sphingosine 1-phosphate receptor signaling." Annu Rev Biochem **78**: 743-768.
- Ruedl, C., P. Koebel and K. Karjalainen (2001). "In vivo-matured Langerhans cells continue to take up and process native proteins unlike in vitro-matured counterparts." J Immunol **166**(12): 7178-7182.
- Ruwisch, L., M. Schafer-Korting and B. Kleuser (2001). "An improved high-performance liquid chromatographic method for the determination of sphingosine-1-phosphate in complex biological materials." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **363**(3): 358-363.
- Saito, K., A. M. Scharenberg and J. P. Kinet (2001). "Interaction between the Btk PH domain and phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate directly regulates Btk." J Biol Chem **276**(19): 16201-16206.
- Salamone, G., G. Lombardi, S. Gori, K. Nahmod, C. Jancic, M. M. Amaral, M. Vermeulen, A. Espanol, M. E. Sales and J. Geffner (2011). "Cholinergic modulation of dendritic cell function." J Neuroimmunol **236**(1-2): 47-56.
- Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli and A. Lanzavecchia (1995). "Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products." J Exp Med **182**(2): 389-400.
- Sallusto, F. and A. Lanzavecchia (1994). "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha." J Exp Med **179**(4): 1109-1118.
- Sanna, M. G., S. K. Wang, P. J. Gonzalez-Cabrera, A. Don, D. Marsolais, M. P. Matheu, S. H. Wei, I. Parker, E. Jo, W. C. Cheng, M. D. Cahalan, C. H. Wong and H. Rosen (2006). "Enhancement of capillary leakage and restoration of

- lymphocyte egress by a chiral S1P1 antagonist in vivo." Nat Chem Biol **2**(8): 434-441.
- Sarkar, K., M. J. Kruhlak, S. L. Erlandsen and S. Shaw (2005). "Selective inhibition by rottlerin of macropinocytosis in monocyte-derived dendritic cells." Immunology **116**(4): 513-524.
- Sasaki, S., R. Hashimoto, M. Kiuchi, K. Inoue, T. Ikumoto, R. Hirose, K. Chiba, Y. Hoshino, T. Okumoto and T. Fujita (1994). "Fungal metabolites. Part 14. Novel potent immunosuppressants, mycostericins, produced by *Mycelia sterilia*." J Antibiot (Tokyo) **47**(4): 420-433.
- Sato, K., E. Malchinkhuu, Y. Horiuchi, C. Mogi, H. Tomura, M. Tosaka, Y. Yoshimoto, A. Kuwabara and F. Okajima (2007). "Critical role of ABCA1 transporter in sphingosine 1-phosphate release from astrocytes." J Neurochem **103**(6): 2610-2619.
- Satthaporn, S. and O. Eremin (2001). "Dendritic cells (I): Biological functions." J R Coll Surg Edinb **46**(1): 9-19.
- Saudemont, A., F. Garcon, H. Yadi, M. Roche-Molina, N. Kim, A. Segonds-Pichon, A. Martin-Fontecha, K. Okkenhaug and F. Colucci (2009). "p110gamma and p110delta isoforms of phosphoinositide 3-kinase differentially regulate natural killer cell migration in health and disease." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(14): 5795-5800.
- Savill, J., I. Dransfield, N. Hogg and C. Haslett (1990). "Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis." Nature **343**(6254): 170-173.
- Savina, A. and S. Amigorena (2007). "Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells." Immunol Rev **219**: 143-156.
- Scheicher, C., M. Mehlig, R. Zecher and K. Reske (1992). "Dendritic cells from mouse bone marrow: in vitro differentiation using low doses of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." J Immunol Methods **154**(2): 253-264.
- Schroder, M., C. Richter, M. H. Juan, K. Maltusch, O. Giegold, G. Quintini, J. M. Pfeilschifter, A. Huwiler and H. H. Radeke (2011). "The sphingosine kinase 1 and S1P1 axis specifically counteracts LPS-induced IL-12p70 production in immune cells of the spleen." Mol Immunol **48**(9-10): 1139-1148.
- Schulze, T., S. Golfier, C. Tabeling, K. Rabel, M. H. Graler, M. Witzenrath and M. Lipp (2011). "Sphingosine-1-phosphate receptor 4 (S1P(4)) deficiency profoundly affects dendritic cell function and TH17-cell differentiation in a murine model." FASEB J **25**(11): 4024-4036.
- Schuppel, M., U. Kurschner, U. Kleuser, M. Schafer-Korting and B. Kleuser (2008). "Sphingosine 1-phosphate restrains insulin-mediated keratinocyte proliferation via inhibition of Akt through the S1P2 receptor subtype." J Invest Dermatol **128**(7): 1747-1756.
- Schwab, S. R., J. P. Pereira, M. Matloubian, Y. Xu, Y. Huang and J. G. Cyster (2005). "Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients." Science **309**(5741): 1735-1739.
- Segura, E. and J. A. Villadangos (2011). "A modular and combinatorial view of the antigen cross-presentation pathway in dendritic cells." Traffic **12**(12): 1677-1685.
- Segura, E., J. Wong and J. A. Villadangos (2009). "Cutting edge: B220+CCR9-dendritic cells are not plasmacytoid dendritic cells but are precursors of conventional dendritic cells." J Immunol **183**(3): 1514-1517.

- Seo, E. Y., G. T. Park, K. M. Lee, J. A. Kim, J. H. Lee and J. M. Yang (2006). "Identification of the target genes of atopic dermatitis by real-time PCR." J Invest Dermatol **126**(5): 1187-1189.
- Shklovskaya, E., B. Roediger and B. Fazekas de St Groth (2008). "Epidermal and dermal dendritic cells display differential activation and migratory behavior while sharing the ability to stimulate CD4+ T cell proliferation in vivo." J Immunol **181**(1): 418-430.
- Shortman, K. and Y. J. Liu (2002). "Mouse and human dendritic cell subtypes." Nat Rev Immunol **2**(3): 151-161.
- Shortman, K. and S. H. Naik (2007). "Steady-state and inflammatory dendritic-cell development." Nat Rev Immunol **7**(1): 19-30.
- Shu, X., W. Wu, R. D. Mosteller and D. Broek (2002). "Sphingosine kinase mediates vascular endothelial growth factor-induced activation of ras and mitogen-activated protein kinases." Mol Cell Biol **22**(22): 7758-7768.
- Siow, D. and B. Wattenberg (2011). "The compartmentalization and translocation of the sphingosine kinases: mechanisms and functions in cell signaling and sphingolipid metabolism." Crit Rev Biochem Mol Biol **46**(5): 365-375.
- Skazik, C., R. Heise, O. Bostanci, N. Paul, B. Denecke, S. Jousen, K. Kiehl, H. F. Merk, G. Zwadlo-Klarwasser and J. M. Baron (2008). "Differential expression of influx and efflux transport proteins in human antigen presenting cells." Exp Dermatol **17**(9): 739-747.
- Slobodin, G., A. Kessel, R. Peri, N. Zaigraikin, M. Rozenbaum, I. Rosner and E. Toubi (2009). "Etanercept impairs maturation of human monocyte-derived dendritic cells by inhibiting the autocrine TNFalpha-mediated signaling." Inflammation **32**(3): 146-150.
- Smits, H. H., A. Engering, D. van der Kleij, E. C. de Jong, K. Schipper, T. M. van Capel, B. A. Zaat, M. Yazdanbakhsh, E. A. Wierenga, Y. van Kooyk and M. L. Kapsenberg (2005). "Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin." J Allergy Clin Immunol **115**(6): 1260-1267.
- Song, L., H. Xiong, J. Li, W. Liao, L. Wang, J. Wu and M. Li (2011). "Sphingosine kinase-1 enhances resistance to apoptosis through activation of PI3K/Akt/NF-kappaB pathway in human non-small cell lung cancer." Clin Cancer Res **17**(7): 1839-1849.
- Sparber, F., C. H. Tripp, M. Hermann, N. Romani and P. Stoitzner (2010). "Langerhans cells and dermal dendritic cells capture protein antigens in the skin: possible targets for vaccination through the skin." Immunobiology **215**(9-10): 770-779.
- Sparwasser, T., E. S. Koch, R. M. Vabulas, K. Heeg, G. B. Lipford, J. W. Ellwart and H. Wagner (1998). "Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells." Eur J Immunol **28**(6): 2045-2054.
- Spiegel, S. and S. Milstien (2003). "Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(5): 397-407.
- Spiegel, S. and S. Milstien (2011). "The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity." Nat Rev Immunol **11**(6): 403-415.
- Stahl, P. D., J. S. Rodman, M. J. Miller and P. H. Schlesinger (1978). "Evidence for receptor-mediated binding of glycoproteins, glycoconjugates, and lysosomal glycosidases by alveolar macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(3): 1399-1403.

- Steinman, R. M. (2003). "Some interfaces of dendritic cell biology." *APMIS* **111**(7-8): 675-697.
- Steinman, R. M. and J. Banchereau (2007). "Taking dendritic cells into medicine." *Nature* **449**(7161): 419-426.
- Steinman, R. M. and Z. A. Cohn (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." *J Exp Med* **137**(5): 1142-1162.
- Strub, G. M., M. Paillard, J. Liang, L. Gomez, J. C. Allegood, N. C. Hait, M. Maceyka, M. M. Price, Q. Chen, D. C. Simpson, T. Kordula, S. Milstien, E. J. Lesnefsky and S. Spiegel (2011). "Sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase 2 in mitochondria interacts with prohibitin 2 to regulate complex IV assembly and respiration." *FASEB J* **25**(2): 600-612.
- Sukocheva, O., C. Wadham, A. Holmes, N. Albanese, E. Verrier, F. Feng, A. Bernal, C. K. Derian, A. Ullrich, M. A. Vadas and P. Xia (2006). "Estrogen transactivates EGFR via the sphingosine 1-phosphate receptor Edg-3: the role of sphingosine kinase-1." *J Cell Biol* **173**(2): 301-310.
- Sullivan, S., P. R. Bergstresser, R. E. Tigelaar and J. W. Streilein (1986). "Induction and regulation of contact hypersensitivity by resident, bone marrow-derived, dendritic epidermal cells: Langerhans cells and Thy-1+ epidermal cells." *J Immunol* **137**(8): 2460-2467.
- Szabo, S. J., B. M. Sullivan, S. L. Peng and L. H. Glimcher (2003). "Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses." *Annu Rev Immunol* **21**: 713-758.
- Takabe, K., R. H. Kim, J. C. Allegood, P. Mitra, S. Ramachandran, M. Nagahashi, K. B. Harikumar, N. C. Hait, S. Milstien and S. Spiegel (2010). "Estradiol induces export of sphingosine 1-phosphate from breast cancer cells via ABCG1 and ABCG2." *J Biol Chem* **285**(14): 10477-10486.
- Takabe, K., S. W. Paugh, S. Milstien and S. Spiegel (2008). "'Inside-out' signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets." *Pharmacol Rev* **60**(2): 181-195.
- Takasugi, N., T. Sasaki, K. Suzuki, S. Osawa, H. Isshiki, Y. Hori, N. Shimada, T. Higo, S. Yokoshima, T. Fukuyama, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, T. Tomita and T. Iwatsubo (2011). "BACE1 activity is modulated by cell-associated sphingosine-1-phosphate." *J Neurosci* **31**(18): 6850-6857.
- Takuwa, Y., N. Takuwa and N. Sugimoto (2002). "The Edg family G protein-coupled receptors for lysophospholipids: their signaling properties and biological activities." *J Biochem* **131**(6): 767-771.
- Tamura, N., K. Hazeki, N. Okazaki, Y. Kametani, H. Murakami, Y. Takaba, Y. Ishikawa, K. Nigorikawa and O. Hazeki (2009). "Specific role of phosphoinositide 3-kinase p110alpha in the regulation of phagocytosis and pinocytosis in macrophages." *Biochem J* **423**(1): 99-108.
- Tanfin, Z., M. Serrano-Sanchez and D. Leiber (2011). "ATP-binding cassette ABCG1 is involved in the release of sphingosine 1-phosphate from rat uterine leiomyoma ELT3 cells and late pregnant rat myometrium." *Cell Signal* **23**(12): 1997-2004.
- Taylor, A., J. Verhagen, K. Blaser, M. Akdis and C. A. Akdis (2006). "Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells." *Immunology* **117**(4): 433-442.
- Uhlenbrock, K., H. Gassenhuber and E. Kostenis (2002). "Sphingosine 1-phosphate is a ligand of the human gpr3, gpr6 and gpr12 family of constitutively active G protein-coupled receptors." *Cell Signal* **14**(11): 941-953.

- Valladeau, J., O. Ravel, C. Dezutter-Dambuyant, K. Moore, M. Kleijmeer, Y. Liu, V. Duvert-Frances, C. Vincent, D. Schmitt, J. Davoust, C. Caux, S. Lebecque and S. Saeland (2000). "Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules." Immunity **12**(1): 71-81.
- van de Ven, R., J. J. Lindenberg, A. W. Reurs, R. J. Scheper, G. L. Scheffer and T. D. de Gruijl (2012). "Preferential Langerhans cell differentiation from CD34(+) precursors upon introduction of ABCG2 (BCRP)." Immunol Cell Biol **90**(2): 206-215.
- van de Ven, R., R. Oerlemans, J. W. van der Heijden, G. L. Scheffer, T. D. de Gruijl, G. Jansen and R. J. Scheper (2009). "ABC drug transporters and immunity: novel therapeutic targets in autoimmunity and cancer." J Leukoc Biol **86**(5): 1075-1087.
- van Koppen, C. J., D. Meyer zu Heringdorf, R. Alemany and K. H. Jakobs (2001). "Sphingosine kinase-mediated calcium signaling by muscarinic acetylcholine receptors." Life Sci **68**(22-23): 2535-2540.
- Venkataraman, K., Y. M. Lee, J. Michaud, S. Thangada, Y. Ai, H. L. Bonkovsky, N. S. Parikh, C. Habrukowich and T. Hla (2008). "Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate." Circ Res **102**(6): 669-676.
- Villadangos, J. A. and P. Schnorrer (2007). "Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo." Nat Rev Immunol **7**(7): 543-555.
- Villarreal, M. R. (2007). "Endocytosis types", unter:  
[http://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Endocytosis\\_types\\_de.png](http://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Endocytosis_types_de.png)
- Vremec, D., J. Pooley, H. Hochrein, L. Wu and K. Shortman (2000). "CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen." J Immunol **164**(6): 2978-2986.
- Vremec, D., M. Zorbas, R. Scollay, D. J. Saunders, C. F. Ardavin, L. Wu and K. Shortman (1992). "The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells." J Exp Med **176**(1): 47-58.
- Walzer, T., L. Chiossone, J. Chaix, A. Calver, C. Carozzo, L. Garrigue-Antar, Y. Jacques, M. Baratin, E. Tomasello and E. Vivier (2007). "Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor." Nat Immunol **8**(12): 1337-1344.
- Wang, J., L. S. Wicker and P. Santamaria (2009). "IL-2 and its high-affinity receptor: genetic control of immunoregulation and autoimmunity." Semin Immunol **21**(6): 363-371.
- Wang, W., M. H. Graeler and E. J. Goetzl (2005). "Type 4 sphingosine 1-phosphate G protein-coupled receptor (S1P4) transduces S1P effects on T cell proliferation and cytokine secretion without signaling migration." FASEB J **19**(12): 1731-1733.
- Watts, C. and S. Amigorena (2001). "Phagocytosis and antigen presentation." Semin Immunol **13**(6): 373-379.
- Watts, C. and M. Marsh (1992). "Endocytosis: what goes in and how?" J Cell Sci **103** ( Pt 1): 1-8.
- Weigert, A., N. Weis and B. Brune (2009). "Regulation of macrophage function by sphingosine-1-phosphate." Immunobiology **214**(9-10): 748-760.
- West, M. A., M. S. Bretscher and C. Watts (1989). "Distinct endocytotic pathways in epidermal growth factor-stimulated human carcinoma A431 cells." J Cell Biol **109**(6 Pt 1): 2731-2739.

- West, M. A., A. R. Prescott, E. L. Eskelinen, A. J. Ridley and C. Watts (2000). "Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation." Curr Biol **10**(14): 839-848.
- Williams, D. L., C. Li, T. Ha, T. Ozment-Skelton, J. H. Kalbfleisch, J. Preiszner, L. Brooks, K. Breuel and J. B. Schweitzer (2004). "Modulation of the phosphoinositide 3-kinase pathway alters innate resistance to polymicrobial sepsis." J Immunol **172**(1): 449-456.
- Wood, S. H., D. N. Clements, W. E. Ollier, T. Nuttall, N. A. McEwan and S. D. Carter (2009). "Gene expression in canine atopic dermatitis and correlation with clinical severity scores." J Dermatol Sci **55**(1): 27-33.
- Wu, L., C. L. Li and K. Shortman (1996). "Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny." J Exp Med **184**(3): 903-911.
- Xie, J., J. Qian, J. Yang, S. Wang, M. E. Freeman, 3rd and Q. Yi (2005). "Critical roles of Raf/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling and inactivation of p38 MAP kinase in the differentiation and survival of monocyte-derived immature dendritic cells." Exp Hematol **33**(5): 564-572.
- Xu, S., K. Ariizumi, G. Caceres-Dittmar, D. Edelbaum, K. Hashimoto, P. R. Bergstresser and A. Takashima (1995). "Successive generation of antigen-presenting, dendritic cell lines from murine epidermis." J Immunol **154**(6): 2697-2705.
- Xu, S., K. Ariizumi, D. Edelbaum, P. R. Bergstresser and A. Takashima (1995). "Cytokine-dependent regulation of growth and maturation in murine epidermal dendritic cell lines." Eur J Immunol **25**(4): 1018-1024.
- Xu, S., P. R. Bergstresser and A. Takashima (1995). "Phenotypic and functional heterogeneity among murine epidermal-derived dendritic cell clones." J Invest Dermatol **105**(6): 831-836.
- Yanagawa, Y., M. Matsumoto and H. Togashi (2010). "Enhanced dendritic cell antigen uptake via alpha2 adrenoceptor-mediated PI3K activation following brief exposure to noradrenaline." J Immunol **185**(10): 5762-5768.
- Yang, L., N. Chang, X. Liu, Z. Han, T. Zhu, C. Li and L. Li (2012). "Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Differentiate to Hepatic Myofibroblasts by Transforming Growth Factor-beta1 via Sphingosine Kinase/Sphingosine 1-Phosphate (S1P)/S1P Receptor Axis." Am J Pathol **181**(1): 85-97.
- Yang, Y. L., C. Ji, L. Cheng, L. He, C. C. Lu, R. Wang and Z. G. Bi (2012). "Sphingosine kinase-1 (SphK1) inhibition sensitizes curcumin-induced growth inhibition and apoptosis in ovarian cancer cells." Cancer Sci.
- Youm, J. K., H. Jo, J. H. Hong, D. M. Shin, M. J. Kwon, S. K. Jeong, B. D. Park, E. H. Choi and S. H. Lee (2008). "K6PC-5, a sphingosine kinase activator, induces anti-aging effects in intrinsically aged skin through intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling." J Dermatol Sci **51**(2): 89-102.
- Zahner, S. P., J. M. Kel, C. A. Martina, I. Brouwers-Haspels, M. A. van Roon and B. E. Clausen (2011). "Conditional deletion of TGF-betaR1 using Langerin-Cre mice results in Langerhans cell deficiency and reduced contact hypersensitivity." J Immunol **187**(10): 5069-5076.
- Zhan, Y., Y. Xu and A. M. Lew (2012). "The regulation of the development and function of dendritic cell subsets by GM-CSF: More than a hematopoietic growth factor." Mol Immunol **52**(1): 30-37.
- Zhang, H., N. N. Desai, A. Olivera, T. Seki, G. Brooker and S. Spiegel (1991). "Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation." J Cell Biol **114**(1): 155-167.

- Zhang, J., X. Xu and Y. Liu (2004). "Activation-induced cell death in T cells and autoimmunity." Cell Mol Immunol **1**(3): 186-192.
- Zhang, Y., Y. Y. Zhang, M. Ogata, P. Chen, A. Harada, S. Hashimoto and K. Matsushima (1999). "Transforming growth factor-beta1 polarizes murine hematopoietic progenitor cells to generate Langerhans cell-like dendritic cells through a monocyte/macrophage differentiation pathway." Blood **93**(4): 1208-1220.
- Zhu, J., H. Yamane and W. E. Paul (2010). "Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*)." Annu Rev Immunol **28**: 445-489.
- Zhu, S. and Y. Qian (2012). "IL-17/IL-17 receptor system in autoimmune disease: mechanisms and therapeutic potential." Clin Sci (Lond) **122**(11): 487-511.