

# **SIGNALWEGE VON SPHINGOSIN-1-PHOSPHAT UND DEREN BEDEUTUNG IN DER MIGRATION VON LANGERHANSZELLEN**

## **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

**Henrik von Wenckstern**

aus Berlin

Juni, 2006

1. Gutachter: Herr Privatdozent Dr. Burkhard Kleuser  
2. Gutachter: Frau Professor Dr. Monika Schäfer-Korting  
Datum der Disputation: 25.07.2006

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von

Herrn Privatdozent Dr. Burkhard Kleuser

in der Abteilung für Pharmakologie und Toxikologie  
des Instituts für Pharmazie  
der Freien Universität Berlin angefertigt.

Für Isabel und Karla

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. Burkhard Kleuser für die Überlassung des Promotionsthemas, die Betreuung und die wissenschaftliche Unterstützung während der Arbeit. Seine Kompetenz, insbesondere seine Diskussionsbereitschaft und sein umfassendes Verständnis auf dem Gebiet der Sphingolipide waren eine stetige Hilfe für das Entstehen dieser Arbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting für ihre wissenschaftliche Unterstützung und die Möglichkeit der Weiterbildung zum Fachapotheker für Arzneimittelinformation bedanken.

Herrn Professor Dr. Heinfried H. Radeke danke ich für die wissenschaftliche Kooperation und die Unterstützung auf dem Gebiet der Immunologie. Durch sein Fachwissen war er ein wertvoller Gesprächspartner im Rahmen von immunologischen Aspekten dieser Arbeit.

Frau Dr. Stefanie Hammer vom Max Planck Institut für Molekulare Genetik danke ich für ihre Hilfsbereitschaft bei der Real-Time PCR und ihre langwierige Unterstützung am konfokalen Mikroskop.

Besonders möchte ich mich auch bei Frau Hannelore Gonska bedanken, die mir den Umgang mit Zellkulturen beibrachte und stets hilfreich bei zellbiologischen Fragen zur Seite stand.

Ferner möchte ich mich bei Frau Dr. Bettina Sauer für die kompetente Einarbeitung in molekularbiologische Methoden bedanken.

Den ganzen Mitarbeitern des Arbeitskreises von Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting danke ich für das freundliche Arbeitsklima und die nette Zusammenarbeit. Insbesondere möchte ich mich bei der Sphingolipidgruppe (dazu zählen Frau Corinna Schraut, Herr Karsten Zimmermann, Frau Pilar Rivera Gil, Frau Daniela Malek, Frau Christina Keller, Frau Melanie Schüppel und Herr Ullrich Kürschner) sowie bei Frau Sylvia Schreiber bedanken.

## Originalarbeiten

B. Sauer, R. Vogler, H. von Wenckstern, M. Fujii, M.B. Anzano, A.B. Glick, M. Schafer-Korting, A.B. Roberts and B. Kleuser: Involvement of Smad signaling in sphingosine 1-phosphate-mediated biological responses of keratinocytes. *J Biol Chem*, 279, 38471-38479, 2004

H.H. Radeke, H. von Wenckstern, K. Stoldtner, B. Sauer, S. Hammer and B. Kleuser: Overlapping signaling pathways of sphingosine 1-phosphate and TGF-beta in the murine Langerhans cell line XS52. *J Immunol*, 174, 2778-2786, 2005

H. von Wenckstern, K. Zimmermann and B. Kleuser: The role of the lysophospholipid sphingosine 1-phosphate in immune cell biology, *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, eingereicht

## Vortrag

H. von Wenckstern, B. Kleuser: Sphingosine 1-phosphate promotes internalization of T $\beta$ R-I and blocks TGF- $\beta$ -signaling. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (Suppl 1)* 372, 2006

## Poster

H.H. Radeke, H. von Wenckstern, K. Stoldtner, C. Schraut, B. Kleuser: Sphingosine 1-phosphate induces chemotaxis of murine dendritic cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (Suppl 1)* 367, 2003

B. Sauer, H. von Wenckstern, C. Schraut and B. Kleuser: Dependence of Smad-Signaling in Sphingosine 1-phosphate mediated biological responses of fibroblasts. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (Suppl 1)* 369, 2004

H. von Wenckstern, H.H. Radeke, B. Kleuser: Sphingosine 1-phosphate-modulated migration of murine dendritic cells is mediated by the receptor subtypes S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> AND S1P<sub>3</sub>. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (Suppl 1)* 371, 2005

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1</b>	<b>Dendritische Zellen.....</b>	<b>2</b>
1.1.1	Entstehung von DCs und Charakterisierung der einzelnen Subtypen .....	3
1.1.2	<i>In vitro</i> Methoden zur Generierung von DCs .....	4
1.1.3	Antigenaufnahme, -prozession und -präsentation.....	5
1.1.4	T-Zell-Interaktion - Immunstimulation vs. Immuntoleranz.....	6
1.1.5	Migration von DCs .....	8
<b>1.2</b>	<b>Sphingosin-1-phosphat.....</b>	<b>10</b>
1.2.1	Biosynthese und Abbau von S1P .....	11
1.2.2	Syntheseorte und Verteilung von S1P im Organismus .....	14
1.2.3	Rezeptoren für S1P .....	14
1.2.4	S1P-Rezeptoren und deren Effekte in Immunzellen .....	16
1.2.5	Bedeutung des S1P-Strukturanalogons FTY720 in Immunzellen .....	17
1.2.6	Interaktion von S1P- und Wachstumsfaktor-Rezeptoren .....	19
<b>1.3</b>	<b>Transformierender Wachstumsfaktor-<math>\beta</math>.....</b>	<b>20</b>
1.3.1	Bedeutung von TGF- $\beta$ in immunologischen Prozessen .....	20
1.3.2	TGF- $\beta$ -Rezeptoren.....	23
1.3.3	Smad-Proteine .....	24
1.3.4	Bedeutung der Smad-Proteine an zellulären Prozessen .....	26
1.3.5	Bedeutung von Smad3 an den Effekten von S1P in epidermalen Zellen.....	27
<b>1.4</b>	<b>Fragestellung und Zielsetzung .....</b>	<b>28</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>31</b>
<b>2.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>31</b>
2.1.1	Geräte .....	31
2.1.2	Reagenzien und Verbrauchsmaterialien .....	32
2.1.3	Lösungen zur Zellkultivierung.....	34
2.1.4	Oligonukleotide .....	35
2.1.5	Plasmide .....	37
2.1.6	Lösungen zur Zell-Lyse .....	37
2.1.7	Lösungen für die Western-Blot-Analyse und die Elektrophorese von Agarose-Gelen....	38
2.1.8	Lösungen für die Fluoreszenzmikroskopie .....	39
<b>2.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>40</b>
2.2.1	Lösungen der Testsubstanzen .....	40

2.2.2	Kultur von Säugetierzellen.....	40
2.2.2.1	Kultivierung von XS52 Zellen .....	40
2.2.2.2	Passagierung von XS52 Zellen .....	41
2.2.2.3	Lagerung und Reaktivierung von XS52 Zellen.....	41
2.2.3	Kultivierung von Escherichia coli Bakterien .....	41
2.2.3.1	Plattenkultur.....	41
2.2.3.2	Flüssigkultur .....	42
2.2.3.3	Lagerung und Reaktivierung von E. coli .....	42
2.2.4	Transformation und Expression in E. coli .....	43
2.2.5	Transfektion von Plasmiden in XS52 Zellen.....	44
2.2.6	Antisense Untersuchungen.....	44
2.2.7	Untersuchung der mRNA-Transkription .....	45
2.2.7.1	Isolierung der mRNA .....	45
2.2.7.2	Synthese von cDNA .....	46
2.2.7.3	Amplifizierung von DNA mittels PCR .....	46
2.2.7.4	Real-Time PCR .....	47
2.2.8	Proteinanalytische Methoden .....	48
2.2.8.1	Zellyse mit RIPA Puffer .....	48
2.2.8.2	Proteinbestimmung.....	48
2.2.8.3	Probenaufbereitung der Proteinlysate für die direkte Westernblot-Analyse .....	49
2.2.8.4	Immunpräzipitation von Proteinen.....	49
2.2.8.5	DNA-Präzipitation von Proteinen.....	49
2.2.8.6	SDS-Gelelektrophorese .....	50
2.2.8.7	Westernblot- und Immunoblot-Analyse .....	50
2.2.9	Migrationsassay .....	51
2.2.10	Durchflusszytometrische Bestimmung der Oberflächenexpression von Proteinen.....	52
2.2.10.1	Präparation der Zellen zur Detektion der Oberflächenexpression von Proteinen über die FACS-Analyse .....	52
2.2.10.2	Einstellung des Durchflusszytometers und Messung.....	53
2.2.11	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Oberflächenexpression von Proteinen am konfokalen Mikroskop .....	54
2.2.11.1	Zellstimulation und –präparation für die mikroskopische Analyse .....	54
2.2.12	Statistik .....	55
2.2.12.1	Datenpräsentation .....	55
2.2.12.2	Statisitische Beurteilung .....	55
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>57</b>
<b>3.1</b>	<b>Bedeutung von S1P und TGF-<math>\beta</math> an den migratorischen Effekten von DCs .....</b>	<b>57</b>
3.1.1	Einfluss von S1P, LPA und TGF- $\beta$ auf die Migration von XS52 Zellen.....	57

3.1.2	Expression von LPL- und TGF- $\beta$ -Rezeptoren in XS52 Zellen.....	59
3.1.3	Charakterisierung der an der S1P-induzierten Migration beteiligten Rezeptoren .....	61
3.1.4	Beteiligung des Smad-Signalweges an den migratorischen Effekten von TGF- $\beta$ und S1P .....	63
3.1.4.1	Semiquantitative PCR-Analyse zum Nachweis von mRNA-Transkripten der Smad- Proteine in XS52 Zellen.....	63
3.1.4.2	Aktivierung von Smad-Proteinen durch TGF- $\beta$ .....	64
3.1.4.3	Aktivierung von Smad-Proteinen durch S1P .....	65
3.1.4.4	Migration von S1P und TGF- $\beta$ in Gegenwart von Smad3-Antisense-ODN .....	66
3.1.5	Beteiligung von T $\beta$ R-I an der S1P-induzierten Migration von XS52 Zellen.....	68
3.1.6	Additive migratorische Effekte von S1P und TGF- $\beta$ .....	69
3.1.7	Untersuchung zur Migration nach Desensitivierung der TGF- $\beta$ - bzw. S1P-Rezeptoren. 71	
3.1.7.1	Untersuchung der migratorischen Wirkung von S1P nach der Vorinkubation von XS52 Zellen mit S1P bzw. TGF- $\beta$ .....	71
3.1.7.2	Untersuchung der migratorischen Wirkung von TGF- $\beta$ nach der Vorinkubation von XS52 Zellen mit S1P bzw. TGF- $\beta$ .....	72
3.1.7.3	Inhibierung der TGF- $\beta$ -Wirkung auf Ebene der Smad-Aktivierung durch S1P .....	73
3.1.7.4	Rezeptorabhängigkeit der Hemmeffekte von S1P auf die TGF- $\beta$ -Wirkungen .....	74
3.1.7.5	Bedeutung von S1P <sub>1</sub> an den Hemmeffekten von S1P auf die TGF- $\beta$ -Wirkungen .....	76
3.1.7.6	Einfluss von ERK auf die S1P-induzierte Hemmung der TGF- $\beta$ -Effekte .....	78
3.1.8	Internalisierung des T $\beta$ R-I .....	79
3.1.8.1	FACS-Analyse zur Bestimmung der Oberflächenexpression des HA-markierten T $\beta$ R-I .....	79
3.1.8.2	FACS-Analyse zur Bestimmung der Internalisierung von T $\beta$ R-I durch S1P.....	80
3.1.8.3	FACS-Analyse zur Bestimmung der Internalisierung von T $\beta$ R-I durch TGF- $\beta$ .....	81
3.1.8.4	Fluoreszenzmikroskopische Analyse der T $\beta$ R-I-Internalisierung.....	82
3.1.9	Interaktion von S1P <sub>1</sub> und T $\beta$ R-I.....	84
3.1.9.1	Dimerisierung von T $\beta$ R-I und S1P <sub>1</sub> infolge einer S1P-Stimulation .....	84
3.1.9.2	FACS-Analyse zur Bestimmung der Internalisierung von S1P <sub>1</sub> nach Stimulation mit S1P .....	85
3.1.9.3	Fluoreszenzmikroskopische Analyse der S1P <sub>1</sub> -Internalisierung.....	86
3.1.10	Einfluss von FTY720 auf die Wirkungen von S1P und TGF- $\beta$ .....	88
3.1.10.1	FACS-Analyse zur Bestimmung der Internalisierung von S1P <sub>1</sub> in Gegenwart von FTY720.....	88
3.1.10.2	FACS-Analyse zur Bestimmung der Internalisierung von T $\beta$ R-I in Gegenwart von FTY720.....	89
3.1.10.3	Untersuchungen der migratorischen Wirkungen von S1P und TGF- $\beta$ nach Inkubation mit FTY720 .....	90

---

<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>93</b>
<b>4.1</b>	<b>Bedeutung der LPL und TGF-<math>\beta</math> in der Migration von XS52 Zellen.....</b>	<b>93</b>
4.1.1	Migratorische Effekte von S1P in XS52 Zellen.....	93
4.1.1.1	Beteiligung der S1P-Rezeptoren an der S1P-evozierten Migration.....	94
4.1.2	Migratorische Effekte von TGF- $\beta$ in XS52 Zellen .....	96
4.1.3	Beteiligung des Smad-Signalweges an der TGF- $\beta$ -induzierten Migration in XS52 Zellen .....	98
4.1.4	Aktivierung von Smad3 durch S1P und deren Bedeutung in der S1P-induzierten Migration .....	99
4.1.4.1	Bedeutung der S1P-Rezeptoren in der Aktivierung von Smad-Proteinen durch S1P .....	100
4.1.4.2	Bedeutung der TGF- $\beta$ -Rezeptoren in der Aktivierung von Smad-Proteinen durch S1P .....	100
<b>4.2</b>	<b>Interaktion der S1P- und TGF-<math>\beta</math>-Rezeptoren .....</b>	<b>101</b>
4.2.1	Interaktion von GPCRs und Wachstumsfaktorrezeptoren.....	101
4.2.2	Gegensätzliche Effekte von S1P auf die TGF- $\beta$ -induzierten Wirkungen in XS52 Zellen .....	103
4.2.2.1	Beteiligung von ERK an den inhibierenden Effekten von S1P auf den TGF- $\beta$ -Signalweg .....	104
4.2.3	Internalisierung von S1P-Rezeptoren.....	105
4.2.4	Internalisierung von TGF- $\beta$ -Rezeptoren .....	107
<b>4.3</b>	<b>Physiologische Relevanz der S1P<sub>1</sub>-Oberflächenexpression und des Crosstalks mit TGF-<math>\beta</math>-Rezeptoren in Immunzellen .....</b>	<b>108</b>
<b>4.4</b>	<b>Bedeutung von FTY720 in der Biologie von LCs .....</b>	<b>109</b>
<b>4.5</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>111</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>114</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>121</b>

ALK1	activin receptor-like kinase 1
ALK5	activin receptor-like kinase 5
APC	Antigenpräsentierende Zelle
AS	Aminosäure
AT1	Angiotensin II Rezeptor Typ
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	Bone morphogenetic protein
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	cluster of differentiation
d	Tag
DC	Dendritische Zelle
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
Edg	Endotheliales Differenzierungsgen
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EEA 1	Early endosomal antigen 1
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (epidermal growth factor receptor)
Erk	Extrazelluläre Signal-regulierte Kaskade (extracellular signal-regulated kinase)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorting)
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FcR	Fc-Rezeptoren
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
g	relative Zentrifugalbeschleunigung

h	Stunde
FTY720-P	FTY720-Phosphat
GDF	Wachstums- und Differenzierungsfaktor (growth and differentiation factor)
GDP	Guanosindiphosphat
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten Kolonie stimulierender Faktor
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor (g protein coupled receptor)
GS	Glycin-Serin
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HEK	human embryotic kidney
HEV	High endothelial venules
HLH	helix loop helix
Id	inhibitor of differentiation
Ig	Immunglobulin
IGF-1	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 1 (Insuline like Growth Factor 1)
IGFBP	IGF-Bindungsprotein
IGFR	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktorrezeptor (Insuline like Growth Factor receptor)
IL	Interleukin
im	unreif (immature)
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IP	Immunpräzipitation
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
ISP-1	Myoriscin
KO	Knockout
LB	Luria broth
LC	Langerhanszelle
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen 1
LPA	Lysophosphatidsäure (lysophosphatidic acid)
LPL	Lysophospholipide

LPP	Lipidphosphat-Phosphohydrolase
LPS	Lipopolysaccharide
m	mature (reif)
MAD	Mother against decapentaplegic
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase (mitogen-activated protein kinase)
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
MMP	Matrixmetalloprotease
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MIP-3 $\alpha$	Makrophagenentzündungsprotein-3 $\alpha$ (macrophage inflammatory protein-3 $\alpha$ )
MLC	gemischte Lymphozytenkultur (mixed lymphocyte reaction)
NGF	Nervenwachstumsfaktor (nerve growth factor)
OD	Optische Dichte
ODN	Oligodesoxynukleotid
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate-buffered saline)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase chain reaction)
PD 098059	2`-Amino-3`-methoxyflavon
PDGF	thrombozytärer Wachstumsfaktor (platelet derived growth factor)
PDGFR	thrombozytärer Wachstumsfaktorrezeptor (platelet derived growth factor receptor)
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PMA	Phorbolmyristat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Phosphatidylserin
Pertussis-Toxin	PTX
PVDF	Polyvinyliden-difluorid
reg	regulatorisch
RNA	Ribonukleinsäure

---

rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SARA	Smad anchor for receptor activation
SB 431542	4-(5-Benzol[1,3]dioxol-5-yl-4-pyridin-2-yl-1H-imidazol-2-yl)-benzamid
SEW 2871	5-[4-Phenyl-5-(trifluoromethyl)thiophen-2-yl]-3-[3(trifluoromethyl)phenyl]-1,2,4-oxadiazol
SH	src-homologe Domäne
siRNA	small interfering RNA
SSC	Seitwärtsstreulicht (sideward scatter)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Smase	Sphingomyelinase
Sma	Small body size
S1P	D- <i>erythro</i> -Sphingosin-1-phosphat
SPH	D- <i>erythro</i> -Sphingosin
SPHK	Sphingosinkinase
SSV/MS	Serin-Serin-Valin-Methionin-Serin-Motiv
TβR-I	TGF-β-Typ I-Rezeptor
TβR-II	TGF-β-Typ II-Rezeptor
TBE	Tris, Borat, EDTA
TBST	Tween in Tris-gepufferter Kochsalzlösung (tris buffered saline)
TE	Tris, EDTA
Temed	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TGF-α	Transformierender Wachstumsfaktor-α (transforming growth factor-α)
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor-β (transforming growth factor-β)
TH	Effektorzelle des T-Helfer-Typs
THI	2-Acetyl-4-Tetrahydroxybutylimidazol
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor-α
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
Trk A	Tropomyosin Rezeptorkinase A

Tris	Trishydroxymethylaminomethan
u	Einheiten (units)
vs	versus
VEGF	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor
WT	Wildtyp