

## **1 EINLEITUNG**

## 1 Einleitung

### 1.1 Dendritische Zellen

In ihrer Funktion als antigenpräsentierende Zellen (APCs) intervenieren Dendritische Zellen (DCs) bereits in der Initiierungsphase der spezifischen Immunkaskade und sind dadurch maßgeblich an der Regulation immunologischer Prozesse beteiligt. DCs werden anhand ihres Reifegrades in unreife (im) und reife (m) DCs klassifiziert, die veränderte Rezeptor- und Integrinprofile in der Zellmembran aufweisen und sich somit stark in zellbiologischen Prozessen wie der Migration und Antigenpräsentation unterscheiden (Shortman and Liu, 2002). Neben ihrer Eigenschaft als APCs regulieren DCs in Abhängigkeit ihres Reifezustandes den T-Zell-Aktivierungsprozess über die Freisetzung von Zytokinen und sind demzufolge in der Lage, sowohl eine Immuntoleranz aber auch eine Immuninduktion auszulösen. Die Aktivierung von naiven T-Zellen und deren Differenzierung zu T-Effektorzellen findet in mehreren Phasen statt, die sich in die Antigenpräsentation, die Migration in sekundäre Lymphorgane und die Formierung des DC / T-Zell-Komplexes in den T-Zellbereichen der Lymphknoten untergliedert (Banchereau and Steinman, 1998). Im unreifen Differenzierungsstatus residieren DCs in der Peripherie des Körpers und examinieren permanent die Umgebung auf potentielle Fremdantigene. In Anwesenheit eines immunologischen Stimulus unterlaufen DCs einem Reifungsprozess, in dem die Expression einer Vielzahl für die Aktivierung von T-Lymphozyten benötigten Rezeptoren erhöht wird. Dazu zählen in erster Linie die ko-stimulatorischen Moleküle CD80, CD83, CD86 sowie die Chemokinrezeptoren CCR5 und CCR7 (Steinman, 2003). Neben der Bildung von immuninduzierenden CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen führt die Aktivierung von naiven T-Zellen auch zur Generierung von regulatorischen (reg) T-Zellen, welche aufgrund ihrer proliferationshemmenden Wirkung auf T-Effektorzellen eine antigenspezifische immunsuppressive Wirkung ausüben. Die Bildung dieser regT-Zellen wird in erster Linie durch imDCs vermittelt (Wallet et al., 2005). Im Hinblick auf die Limitierung der T-Zell-Aktivierung auf sekundäre Lymphorgane besitzt die Migration von DCs in die Lymphknoten eine Schlüsselfunktion im T-Zell-Aktivierungsprozess. Darüber hinaus steuern migratorische Prozesse auch die Infiltration von imDCs in die Peripherie, so dass die

Zellbewegung letztendlich einen essentiellen Prozess für die Funktionalität von DCs von der Antigenprozessierung im Gewebe bis zur T-Zell-Aktivierung in den Lymphknoten darstellt.

### 1.1.1 Entstehung von DCs und Charakterisierung der einzelnen Subtypen

DCs werden aus hämatopoetischen Vorläuferzellen gebildet und anhand ihrer phänotypischen Gemeinsamkeiten mit T- beziehungsweise B-Vorläuferzellen in myeloide oder lymphoide DCs eingeteilt (Inaba et al., 1993; Izon et al., 2001). Jedoch definiert die Vorläuferzelle nicht automatisch den finalen DC-Phänotyp, da aus isolierten lymphoiden und myeloiden Progenitor-Zellen sämtliche Subtypen von reifen Milz- und Thymus-DCs gebildet werden können (Wu et al., 2001). Die Heterogenität dieses Zelltyps wird abermals durch die Möglichkeit hervorgehoben, mDCs aus isolierten Monozyten in Kultur unter Zusatz von Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierenden Faktor (GM-CSF) und Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) zu generieren (Shortman and Liu, 2002).

Aus den Vorläuferzellen entstehen zunächst imDCs, die eine hohe phagozytotische Aktivität und eine geringe Expression von MHC (major histocompatibility complex) II Rezeptoren sowie die für die T-Zell-Aktivierung notwendigen Ko-Rezeptoren CD40, CD80 und CD86 aufweisen. Diese imDCs sind mit einer Vielzahl an Rezeptoren für die Erkennung von mikrobiologischen Strukturen ausgestattet. Dazu zählen die Scavenger-Rezeptoren und die hoch konservierten Toll-like Rezeptoren (TLRs). Es existieren insgesamt 10 verschiedene TLRs, die jeweils auf unterschiedliche mikrobielle Antigene reagieren (Medzhitov and Janeway, 2000). Die einzelnen DC-Subtypen unterscheiden sich in ihrem TLR-Expressionsmuster und leiten differente Immunreaktionen in Abhängigkeit des mikrobiellen Antigens ein (Medzhitov and Janeway, 2000).

DCs, die als mDCs klassifiziert sind, exprimieren alle CD11c, CD80, CD86, CD40 und hohe Level an MHCII und werden anhand der Expression von CD4, CD8, CD11b und CD205 in 5 Subtypen (siehe Tab. 1.1.1) eingeteilt (Anjuere et al., 1999). Interessant ist, dass mDCs die T-Zell-spezifischen Ko-Rezeptoren CD4 und CD8 exprimieren, jedoch kein Beweis für eine Funktion dieser Rezeptoren in DCs existiert (Shortman and Liu, 2002). Von den 5 mDC-Subtypen sind die CD4<sup>-</sup>CD8<sup>hi</sup>CD205<sup>hi</sup>CD11b<sup>-</sup> DCs, die CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD205<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> DCs sowie die CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>

CD205<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> DCs in der Lage, direkt über den Blutkreislauf in die Milz zu migrieren, während die CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD205<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> DCs und die CD4<sup>-</sup>CD8<sup>lo</sup>CD205<sup>hi</sup>CD11b<sup>+</sup> DCs nur über afferente Lymphbahnen sekundäre Lymphknoten ansteuern. Letztere konnten bisher ausschließlich in Haut-assoziierten Lymphknoten lokalisiert werden und werden nach seinem Entdecker Paul Langerhans als Langerhanszelle (LC) bezeichnet. Charakteristika dieses Zelltyps sind die Präsenz von Birbeck-Granula sowie die Expression der LC-assoziierten Antigene Langerin und E-Cadherin (Romani et al., 2003). Die Verteilung der einzelnen DC-Subtypen in den Lymphorganen ist in Tab. 1.1.1 dargestellt.

**Tab. 1.1.1:** Verteilung der murinen DC-Subtypen im lymphatischen Gewebe (nach Shortman and Liu, 2002)

% der Gesamt- DCs in	Lymphoide DCs CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>hi</sup> CD205 <sup>hi</sup> CD11b <sup>-</sup>	Myeloide DCs CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD205 <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup>	Myeloide DCs CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD205 <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup>	Myeloide DCs CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD205 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup>	LCs CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>lo</sup> CD205 <sup>hi</sup> CD11b <sup>+</sup>
Milz	23	56	19	<4	<1
Thymus	70	-	-	-	-
Mesenteriale Lymphknoten	19	4	37	26	<4
Haut- assoziierte Lymphknoten	17	4	17	20	33

### 1.1.2 In vitro Methoden zur Generierung von DCs

Da DCs im Blut nur marginal vorhanden sind und in erster Linie in der Gewebesperipherie und in den Lymphorganen residieren, gestaltet sich die Isolierung dieser Zellen mit ausreichender Anzahl für zellbiologische Untersuchungen als schwierig. Die Gewinnung einer quantitativ hohen Ausbeute an DCs ist nur *in vitro* durch Kultivierung von DC-Vorläufern unter Zusatz von definierten Zytokinen möglich. Drei verschiedene DC-Precursor wurden bisher verwendet, um DCs *in vitro* zu generieren. Aus Monozyten lassen sich unter Zusatz von GM-CSF und Interleukin (IL)-4 imDCs herstellen, die in Anwesenheit von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  oder mikrobiellen Produkten wie Lipopolysacchariden (LPS) zu mDCs differenzieren (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Den zweiten Precursor bilden Plasmazytotische Progenitorzellen. Aus diesen DC-Vorläuferzellen lassen sich in IL-

3- und CD154-supplemierten Kulturmedien mDCs generieren. In der CD34<sup>+</sup> Fraktion, isoliert aus Knochenmark- oder Nabelschnurblut, ist der dritte DC-Precursor enthalten. Unter Zusatz von TNF- $\alpha$  und GM-CSF entstehen DCs, die den Phänotyp von intestinalen DCs ausbilden. Die weitere Kultivierung dieser DC-Precursor in Anwesenheit des Transformierenden Wachstumsfaktors- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ermöglicht die Gewinnung von LCs (Caux et al., 1996).

Neben der *in vitro* Generierung von DCs aus isolierten Monozyten bzw. DC-Vorläuferzellen existieren auch immortalisierte DCs (Shortman and Liu, 2002). Besonders gut charakterisiert ist die Zelllinie XS52. Diese Zelllinie besitzt ihren Ursprung in der Epidermis von neugeborenen BALB/c Mäusen und weist bei Kultivierung in GM-CSF-haltigem Medium die Charakteristika von imLCs auf (Xu et al., 1995a). In Analogie zu frisch isolierten LCs aus der Epidermis exprimieren XS52 Zellen das LC-typische Antigen Cadherin und zeigen eine geringe Expression an MHC II- und CD80-Proteinen, welches dem Phänotyp von imLCs entspricht (Xu et al., 1995b). Ferner besitzen XS52 Zellen eine ähnliche Morphologie wie imLCs und sind nur begrenzt in der Lage, naive T-Zellen zu aktivieren (Takashima et al., 1995). Durch die Verwendung der XS52 Zelllinie war es möglich, eine hohe Zahl an DCs zu generieren, die den Phänotyp von imLCs aufweisen. Sämtliche Untersuchungen in der hier vorliegenden Arbeit wurden an dieser Zelllinie durchgeführt.

### 1.1.3 Antigenaufnahme, -prozessierung und -präsentation

DCs besitzen die strukturellen Voraussetzungen, um Antigene zu erkennen, aufzunehmen und letztendlich gebunden an MHC I oder MHC II T-Zellen zu präsentieren. Der initiale Schritt der Antigenpräsentation besteht in der Erkennung von mikrobiellen Produkten, die anhand der hoch konservierten TLR und der Scavenger-Rezeptoren ermöglicht wird (Medzhitov and Janeway, 2000; Shakushiro et al., 2004). Neben der direkten Antigenerkennung können auch bereits durch Antikörper neutralisierte Antigene über Fc-Rezeptoren (FcR) erkannt und prozessiert werden (Regnault et al., 1999). Im Anschluss an die Antigenerkennung erfolgt die Endozytose der Antigene über den Prozess der Macropinozytose, Phagozytose oder Clathrin-vermittelten Endozytose. LCs nehmen Antigene zusätzlich über ihre subtypspezifischen Birbeck-Granula auf, die sich nahe der Zytoplasmamembran unter Bildung von Striationen formieren (Valladeau et al., 2000). Die Prozessierung der

Antigene und die Beladung der MHCII mit den Antigenfragmenten finden in den Lysosomen statt, in denen MHCII während des unreifen Differenzierungsstatus bevorzugt akkumulieren (Cella et al., 1997; Pierre et al., 1997). Im Zuge der Reifung von DCs nach Kontakt mit einem immunologischen Stimulus erhöht sich die Oberflächenexpression der MHCII, die nicht auf eine erhöhte Translation zurückzuführen ist, sondern durch eine Cathepsin S-abhängige Translokation der MHCII verursacht wird (Pierre and Mellman, 1998). Zusätzlich sind DCs in der Lage MHCII-Peptid-Komplexe zu bilden und Antigene über MHCII zu präsentieren. Dieser als „exogener“ oder „Cross Präsentation“ bezeichnete Weg kann durch Phagozytose von virus-infizierten Zellen oder Tumorzellen und anschließender Cross-Präsentation der viralen bzw. tumorassoziierten Antigene auf MHCII erfolgen (Albert et al., 1998). Darüber hinaus werden auch lösliche Antigene und Immunkomplexe über MHCII präsentiert, letztere nach vorgeschalteter Bindung an FcRs und anschließender Endozytose.

### 1.1.4 T-Zell-Interaktion - Immunstimulation vs. Immuntoleranz

Die Funktion von DCs besteht zum einen in der Initiierung einer Immunantwort in Gegenwart eines immunologischen Stimulus und zum anderen in der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz gegenüber Autoantigenen. Zentrale Toleranz der T-Zellen wird bereits im Prozess der Prägung durch die negative Selektion erzielt. Thymus-DCs simulieren über die Formierung von Selbstpeptid-beladenen MHC-Rezeptoren das Repertoire potentieller Autoantigene und lösen in selbstreaktiven T-Zellen Apoptose aus (Brocker et al., 1997). Jedoch werden nicht alle autoreaktiven T-Zellen während der Prägung im Thymus entfernt, so dass deren potentielle immunologische Aktivität durch periphere Toleranzinduktion unterdrückt werden muss. Dieser Prozess wird abermals durch DCs vermittelt, die Toleranz entweder durch Anergie (T-Zell-Inaktivität) oder Generierung von regT-Zellen erzielen (Roncarolo et al., 2001). Die Mechanismen der peripheren Toleranzinduktion sind bereits hinreichend durchleuchtet, jedoch besteht weiterhin Unklarheit in dem DC-Subtyp, welcher letztendlich diese Effekte vermittelt. Zum einen wird den imDCs die Rolle zugeschrieben, die endozytotisch aktiv sind, kontinuierlich MHC-Peptid-Komplexe auf der Zelloberfläche präsentieren und aufgrund fehlender kostimulierender Faktoren eine T-Zell-Toleranz induzieren (Inaba et al., 1998). Zum

anderen wird eine Beteiligung von so genannten reifen aber ruhenden DCs an der Toleranzinduktion diskutiert. Diese DCs weisen bereits alle Merkmale von mDCs auf, allerdings werden die Ko-Rezeptoren weitaus geringer exprimiert, so dass hier die Interaktion mit einer T-Zelle zu einer Toleranzinduktion führt (Kamath et al., 2000). Zusätzlich wird eine Beteiligung von spezialisierten regDCs an der Aufrechterhaltung peripherer Toleranz in Erwägung gezogen, deren Bedeutung aber noch nicht hinreichend belegt werden konnte (Fazekas de St Groth, 1998; Suss and Shortman, 1996).

Außer ihrer zentralen Rolle in der Einleitung von Immuntoleranz gegenüber Autoantigenen sind DCs maßgeblich in der Induktion von Immunantworten gegenüber Fremdanitigenen involviert. Diese Immunabwehr wird hauptsächlich durch T-Effektorzellen erzielt, die im Vorfeld aufgrund des Kontakts mit mDCs ihre Aktivierung erfahren haben. Nach der Gefahren-Hypothese bedarf die Reifung von DCs Zellen als Voraussetzung für die Induktion einer T-Zell-Antwort so genannter Gefahren-Signale (Matzinger, 1994). Diese Hypothese postuliert, dass immunologische Reaktionen nicht gegen „Fremdes“ allein, sondern nur gegen „Fremdes im Kontext mit endogenen oder exogenen Faktoren“ ausgelöst werden. Zu den endogenen Faktoren werden der CD40-Ligand sowie die Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  gezählt, die vom Gewebe bei Stress, Verletzung und Nekrose freigesetzt werden. Somit ist die Präsenz der Zytokine neben der des immunogenen Antigens das entscheidende Signal für die Differenzierung zu mDCs. Es existieren aber auch Zytokine, welche die Reifung von imDCs inhibieren. Eine solche Rolle konnte dem IL-10 zugeordnet werden (Buelens et al., 1997).

Das Signal von mDCs während der T-Zell-Interaktion zeichnet sich nicht nur durch Aktivierung und Proliferation der T-Zellen aus, sondern reguliert maßgeblich den finalen T-Zell-Subtyp und die Zytokinproduktion in den entstandenen T-Effektorzellen. CD8<sup>+</sup> DCs induzieren in CD4<sup>+</sup> T-Zellen vorwiegend die Generierung von TH1-Zellen, hingegen bewirken CD8<sup>-</sup> DCs eher die Bildung von TH2-Zellen, was in erster Linie auf die geringere Produktion an IL-12 in CD8<sup>-</sup> DCs zurückzuführen ist (Maldonado-Lopez et al., 1999; Moser and Murphy, 2000). Die Zytokinsekretion von mDCs und dem daraus resultierenden T-Effektorzell-Subtyp wird zusätzlich von der Art des immunologischen Stimulus bestimmt. LPS, isoliert aus *Escherichia coli* Bakterien, induziert eine sehr hohe Produktion an IL-12 und fördert dadurch die Bildung von TH1-Zellen, während LPS, isoliert aus *Porphyromonas gingivalis*,

keinen Einfluss auf die IL-12-Spiegel ausübt und eher eine TH2-Antwort bewirkt (Pulendran et al., 2001). Ferner wird die Zytokinsekretion aktivierter T-Zellen entscheidend vom DC-Subtyp beeinflusst. In CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen werden durch CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> DCs größere Mengen an IL-2, Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und GM-CSF gebildet als in Anwesenheit von CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> DCs, obwohl die Proliferation in beiden Fällen weitestgehend unbeeinträchtigt ist. Wahrscheinlich existieren unterschiedliche Mechanismen für die Regulation von T-Zell-Proliferation und T-Zell-Zytokinsekretion. Darüber hinaus regulieren DCs indirekt durch die Interaktion mit T-Zellen die Antikörpersekretion und den Isotypenwechsel in B-Lymphozyten (Fayette et al., 1997).

Diese Daten unterstreichen die Komplexität dieses Zelltyps und geben Aufschluss über die Funktion von DCs, die weit über die Antigenpräsentation hinausgeht und entscheidende Prozesse wie die Toleranz- und Immuninduktion durch Interaktion mit T- und B-Zellen reguliert.

### 1.1.5 Migration von DCs

Die Migration stellt einen bedeutenden biologischen Prozess in der Ausübung immunologischer Funktionen von DCs dar, indem entscheidende Abläufe in der Immunkaskade von DCs wie die Antigenaufnahme und die T-Zell-Interaktion miteinander verknüpft werden. Eine Schlüsselfunktion in der Steuerung der Zellmotilität von DCs nehmen Chemokine ein. Diese Substanzen zählen zu einer Familie von chemotaktischen Proteinen und stimulieren durch Bindung an G-Proteingekoppelte Rezeptoren (GPCRs) die Zellbewegung von Zielzellen, unter anderem DCs. Neben den Chemokinen regulieren eine Reihe von Wachstumsfaktoren, aber auch Lipidmediatoren wie die Lysophospholipide (LPL) Sphingosin-1-phosphat (S1P) und Lysophosphatidsäure (LPA) die Migration von DCs (Idzko et al., 2002; Panther et al., 2002).

Nach der Generierung von Precursor-DCs im Knochenmark treten diese in den Blutstrom ein und gelangen ins periphere Gewebe, wo sie als imDCs residieren. Von den Faktoren, welche die Migration von Precursor-DCs ins periphere Gewebe regulieren, ist wenig bekannt. Für LCs konnte eine Beteiligung von TGF- $\beta$  beschrieben werden, da in TGF- $\beta$ <sup>-/-</sup> Mäusen keine LCs in der Haut vorhanden sind (Borkowski et al., 1996). Hingegen wird die Rekrutierung von myeloiden DCs in die



Regionen der Peyer's Patches im Darm über das Makrophagenentzündungsprotein-3 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein-3 $\alpha$ , MIP-3 $\alpha$ ) vermittelt, einem Chemokin, welches allgemein die Migration von imDCs durch Bindung des Rezeptors CCR6 induziert (Iwasaki and Kelsall, 2000). Unabhängig von der Art des Antigens müssen DCs in die T-Zell Bereiche der Lymphknoten migrieren, um durch den Kontakt mit naiven T-Lymphozyten Toleranz oder Immunität zu induzieren. Eine Trennung der migrationsauslösenden Faktoren zwischen imDCs und mDCs konnte bisher nur unzureichend erzielt werden.

In LCs führt die verringerte Expression von E-Cadherin zur Trennung der Bindung an Keratinozyten und leitet dadurch den initialen Schritt in der Mobilisierung von LCs aus dem epidermalen Gewebe in die Lymphgefäße ein (Tang et al., 1993). Weiterhin exprimieren sowohl imLCs als auch mLCs konstitutiv CCR2 und sind in der Lage, chemotaktisch auf dessen Liganden MCP-1 zu reagieren. Die Bedeutung von CCR2 in der Rekrutierung von LCs aus der Dermis in die dermalen Lymphknoten konnte in CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen bestätigt werden (Sato et al., 2000). Im Gegensatz zu imLCs wird die Expression von MCP-1 in mLCs stark erhöht, so dass im Sinne eines autokrinen Mechanismus die Mobilität der mDCs auf MCP-1 deutlich ansteigt (Sallusto et al., 1998).

DCs gelangen hauptsächlich über das afferente Lymphsystem in die Lymphknoten. Eine zentrale Rolle in der Steuerung der Migration von DCs in die T-Zell Bereiche der Lymphknoten wird dem CCR7/CCL19/CCL21 Chemokinsystem zugeordnet (Robbiani et al., 2000; Saeki et al., 1999). So weisen *plt/plt* Mäuse, die weder CCL19 noch CCL21 exprimieren, keine DCs in den Lymphknoten auf (Gunn et al., 1999). CCL19 und CCL21 werden verstärkt im lymphatischen Endothel exprimiert und bilden somit einen steigenden Konzentrationsgradienten von dem peripheren Gewebe zu den Lymphknoten (Martín-Fontecha et al., 2003). Obwohl die Induktion der CCR7-Expression bisher immer mit der Reifung von DCs in Verbindung gebracht wurde, existieren auch vom Reifungsgrad unabhängige Mechanismen (Geissmann et al., 2002), so dass die These der Kopplung von Reifezustand und migratorischer Antwort neu hinterfragt werden muss (Randolph, 2002). Trotz alledem wird die CCR7-induzierte Migration in Anwesenheit von inflammatorischen Signalen stark erhöht, während nur eine geringe migratorische Rate von imDCs im *steady state* zu beobachten ist (MacPherson et al., 1995). So führen proinflammatorische Faktoren wie Cysteinylleukotriene und Prostaglandin E2 zu einer verstärkten Expression von

CCR7 und erhöhen den migratorischen Fluss von mDCs in die Lymphknoten (Robbiani et al., 2000; Scandella et al., 2002). Ferner scheint der Eintritt von DCs in die Lymphknoten mit einer erhöhten Expression von  $\beta_2$ -Integrinen einherzugehen (Xu et al., 2001). Integrine stellen eine Klasse von Adhäsionsproteinen dar, die bei migratorischen Prozessen die Adhäsion von Leukozyten am Endothel einleiten. Dadurch wird die Bindung der DCs am lymphatischen Endothel und der Eintritt in die Lymphknoten initiiert. Die erhöhte migratorische Aktivität der mDCs wird in den Lymphknoten durch die Interaktion mit naiven T-Zellen über CD40 wieder gebremst. Als Folge verweilen die mDCs länger in den T-Zellbereichen der Lymphknoten und erhöhen dadurch die Wahrscheinlichkeit der Aktivierung einer T-Zelle (Luft et al., 2004).

Aus den bisherigen Daten ist erkenntlich, wie stark migratorische Prozesse in dem Funktionszyklus von DCs von der Antigenaufnahme bis zur T-Zell Aktivierung involviert sind. Die Migration von mDCs, insbesondere die Bedeutung des CCR7/CCL19/CCL21 Chemokinsystem, wurde bereits hinreichend durchleuchtet, hingegen bleiben die Mechanismen der Migration von imDCs im *steady state* weitestgehend unklar. Im Hinblick auf die konstanten Spiegel von S1P im Serum und den ersten *in vitro* gewonnenen Daten zu den migratorischen Effekten von S1P in imDCs (Idzko et al., 2002) lässt sich eine Beteiligung des Lipimediators an den migratorischen Prozessen von imDCs im *steady state* vermuten.

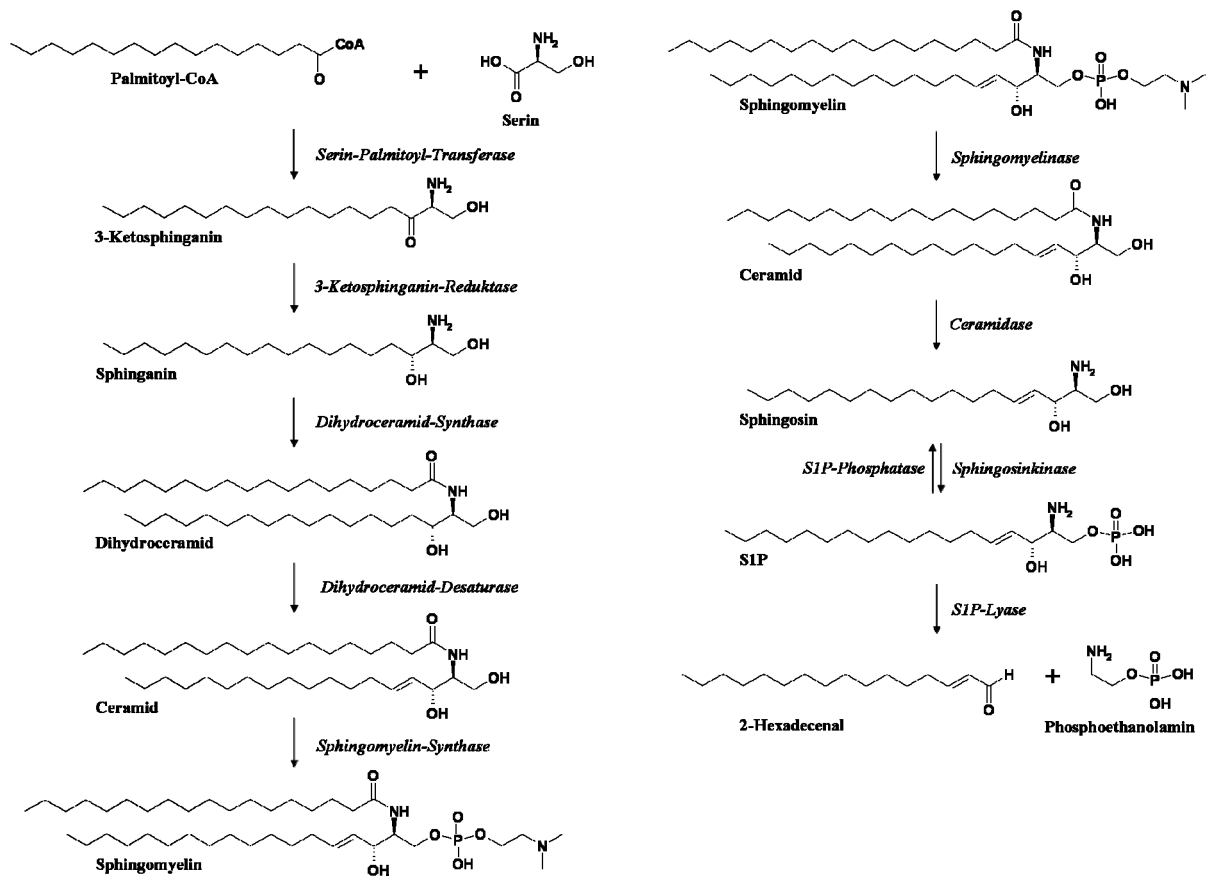
### 1.2 Sphingosin-1-phosphat

S1P ist neben LPA der wichtigste Vertreter der LPL, dessen Funktion seit seiner Entdeckung im Jahre 1884 lange Zeit als strukturelle Komponente in der Zytoplasmamembran eukariontischer Zellen angesehen wurde (Thudichum, 1884). In den letzten zwei Jahrzehnten wurde die Bedeutung von S1P als Regulator einer Vielzahl von zellulären Prozessen erkannt und durch die Entdeckung einer Familie von GPCRs für S1P zusätzlich hervorgehoben. Neben der Bindung an Rezeptoren vermittelt S1P einen Teil seiner Effekte als intrazellulärer Mediator und ist an der Steuerung von zellulären Vorgängen wie Apoptose, Differenzierung, Migration und Proliferation beteiligt. Über diese Prozesse greift S1P in die Angiogenese und Embryogenese ein, beschleunigt die Wundheilung und reguliert eine Reihe von immunologischen Vorgängen.

### 1.2.1 Biosynthese und Abbau von S1P

Sphingolipide können zum einen direkt durch *De-novo*-Synthese als auch indirekt durch Hydrolyse von Membran-Lipiden gebildet werden (Abb. 1.2.1). Die *De-novo*-Synthese von Sphingolipiden findet auf der zytosolischen Seite des endoplasmatischen Retikulums (ER) statt und wird durch die Kondensation von Serin und Palmitoyl-CoA zu 3-Ketosphinganin über das Enzym Serin-Palmitoyl-Transferase eingeleitet (Hannun et al., 2001). Nach der Reduktion zu Dihydrosphingosin folgt eine N-Acylierung mit der Bildung von Dihydroceramiden durch die Dihydroceramid-Synthase. Anschließend katalysiert die Dihydroceramid-Desaturase die Einführung einer trans-4,5 Doppelbindung und es entstehen Ceramide, die je nach Enzym weiter zu Glykosphingolipiden, zu Ceramid-1-phosphat oder zu dem Membranlipid Sphingomyelin umgesetzt werden (Bajjalieh et al., 1989; Jeckel et al., 1992). Alternativ können Ceramide auch durch den Abbau von Sphingomyelin über Sphingomyelinasen gebildet werden. Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte die Existenz von 5 Isoformen der Sphingomyelinase nachgewiesen werden. Die einzelnen Isoformen unterscheiden sich in ihrer zellulären Lokalisation, dem pH-Optimum und den für die Wirkung benötigten Kationen (Levade and Jaffrezou, 1999). Die Aktivität der Sphingomyelinasen und die daraus resultierenden Ceramid-Spiegel werden durch eine Reihe von Faktoren reguliert; so bewirken zum Beispiel Wachstumsfaktoren, Zytokine, Arachidonsäuren und Stressfaktoren eine Erhöhung der Enzymaktivität (Levade and Jaffrezou, 1999). Neben ihrer strukturellen Funktion nehmen Ceramide eine zentrale Rolle in der Steuerung von Differenzierungsvorgängen ein (Okazaki et al., 1989) und sind wirkungsvolle Induktoren der Apoptose. Die Degradation von Ceramiden zu Sphingosin wird durch Ceramidasen reguliert, die sich anhand ihrer pH-Optima in saure, neutrale und alkalische Ceramidasen differenzieren (Bernardo et al., 1995; El Bawab et al., 2000; Koch et al., 1996). Anschließend wird Sphingosin durch Phosphorylierung über Sphingosinkinasen (SphKs) zu S1P umgesetzt. Bisher sind zwei Formen der SphK beschrieben, von denen die SphK1 bereits 1998 aus der Ratte isoliert wurde (Olivera et al., 1998), während die deutlich größere SphK2 erst zwei Jahre später aus der Maus isoliert und das entsprechende Gen kloniert werden konnte (Liu et al., 2000a). Beide Formen werden in fast allen Geweben exprimiert; die SphK1 zeigt jedoch eine deutliche Präferenz zu Lunge, Leber und Milz, die SphK2 ist hingegen vermehrt in

der Leber und im Herzen vorhanden (Le Stunff et al., 2004). Neben der verstärkten Expression im Zytosol (Liu et al., 2000a) konnten SphKs auch an membranären Strukturen und im Nukleus nachgewiesen werden (Igarashi et al., 2003; Kleuser et al., 1998; Yoshimoto et al., 2003). SphKs können durch eine Vielzahl von Substanzen aktiviert werden, darunter Wachstumsfaktoren wie der thrombozytäre Wachstumsfaktor (PDGF, platelet derived growth factor), Liganden von GPCRs, Zytokine, Phorbolmyristataacetat und Antigene (Melendez et al., 1998; Meyer zu Heringdorf et al., 1999; Olivera and Spiegel, 1993; Spiegel and Milstien, 2002). Der Abbau von S1P erfolgt entweder durch die S1P-Lyase, durch Lipidphosphat-Phosphohydrolasen (LPPs) oder die S1P-Phosphatase. S1P-Phosphatasen weisen eine hohe Substratspezifität für S1P auf und sind im Gegensatz zu den meisten LPPs hauptsächlich im ER vorhanden (Le Stunff et al., 2002). Kürzlich konnte eine zweite Form der S1P-Phosphatase isoliert werden (Ogawa et al., 2003), die vor allem gewebsspezifisch, insbesondere in Niere und Herz, exprimiert wird. Die Pyridoxalphosphat-abhängige S1P-Lyase spaltet die C2-C3-Bindung von S1P bei einem pH-Optimum von pH 7,4 - 7,6 in Hexadecanal und Phosphoethanolamin. Die Blockade der S1P-Lyase durch 2-Acetyl-4-Tetrahydroxybutylimidazol (THI) oder genetisch durch den Einsatz von siRNA führt zu erhöhten S1P-Spiegeln im lymphatischen Gewebe und bewirkt eine Retention der Lymphozyten in den Lymphknoten, was die Bedeutung von S1P bei immunologischen Prozessen widerspiegelt (Schwab et al., 2005).



**Abb. 1.2.1:** Sphingolipid-Metabolismus: De-novo-Biosynthese von Ceramiden sowie die Biosynthese von S1P aus Sphingomyelin und der Abbau von S1P

### 1.2.2 Syntheseorte und Verteilung von S1P im Organismus

Obwohl die für die Bildung von S1P entscheidenden Enzyme in fast allen Geweben exprimiert werden, unterscheiden sich die S1P-Gehalte im Körper teilweise um den Faktor 100. Im peripheren Gewebe liegen S1P-Konzentrationen zwischen 10 nM und 30 nM vor. Hingegen existieren in den lymphatischen Gefäßen (10 – 100 nM) und im Blut (100 - 1000  $\mu$ M) sehr viel höhere Konzentrationen des LPL. Dieser vorherrschende Konzentrationsgradient zwischen den Lymphknoten und dem Blutsystem nimmt eine zentrale Bedeutung in der Steuerung immunologischer Prozesse in Antwort auf S1P ein. Die Hauptquellen von S1P im Blut bilden die Zellen des hämatopoetischen Systems, vor allem Thrombozyten, die im Gegensatz zu allen anderen Körperzellen keine S1P-Lyase besitzen und eine hohe Aktivität der SphK aufweisen (Yatomi et al., 2001). Die Sekretion von S1P wird durch Aktivierung der Thrombozyten initiiert. Darüber hinaus regulieren aktivierte Thrombozyten durch die Freisetzung von S1P migratorische und proliferative Effekte in epidermalen Zellen und üben Einfluss auf den Wundheilungsprozess aus (Vogler et al., 2003). Neben Thrombozyten sekretieren auch Erythrozyten, Neutrophile und mononukleare Zellen kontinuierlich S1P, wenn auch in viel kleineren Mengen, und sind dadurch an der Aufrechterhaltung konstanter S1P-Plasmaspiegel beteiligt (Yang et al., 1999a).

### 1.2.3 Rezeptoren für S1P

S1P zählt zur Gruppe der LPL und stellt neben LPA einen hochaffinen Liganden der GPCRs aus der LPL-Rezeptor-Familie dar, die ursprünglich als EDG (endothelial differentiation gene)-Rezeptoren bezeichnet wurden. Der Name EDG leitet sich von der Funktion des erstmals 1990 klonierten Rezeptors für S1P aus Endothelzellen der Nabelschnur ab. Da dessen Transkription in Anwesenheit von Phorbolmyristat (PMA) stark erhöht ist und gleichzeitig einen Differenzierungsprozess von Endothelzellen zu kapillarähnlichen Strukturen auslöst, benannte man das entsprechende Gen als endotheliales Differenzierungsgen (endothelial differentiation gene) beziehungsweise EDG1 (Hla and Maciag, 1990). Die Bedeutung dieses Rezeptors für S1P wurde erst viel später mit der Identifizierung von S1P als hochaffinen Liganden erkannt. In den folgenden Jahren wurden weitere 7 verwandte Rezeptoren kloniert, die mit S1P und LPA interagieren und anhand des Liganden mit der höchsten Affinität in S1P<sub>1-5</sub> und

LPA<sub>1-3</sub> umbenannt wurden. Die LPL-Rezeptoren lassen sich anhand ihrer Sequenzhomologie in 2 Untergruppen klassifizieren, deren Aminosäure (AS)-Sequenz innerhalb der Gruppe zu 46 - 54 % und untereinander zu 32 - 36 % übereinstimmt. Neben den LPL-Rezeptoren existieren noch weitere Rezeptoren, an denen LPL als Liganden binden, wie zum Beispiel GPR3, GPR6 und GPR12 für S1P (Ignatov et al., 2003; Kostenis, 2004; Uhlenbrock et al., 2002), jedoch sind die Funktionen und Signalwege dieser Rezeptoren noch weitestgehend unbekannt.

Die Ursachen für die pleiotropen Wirkungen von S1P sind hauptsächlich in dem zellspezifischen Expressionsmuster der Rezeptoren und den differenten G-Protein-Untereinheiten der einzelnen GPCRs begründet. Jeder Rezeptor stimuliert mindestens zwei der drei durch S1P-Rezeptoren aktivierbaren G-Proteine, zu denen die Pertussis-Toxin (PTX)-sensitiven G<sub>i/o</sub>- und die PTX-insensitiven G<sub>12/13</sub>- und G<sub>q</sub>-Proteine zählen (Ishii et al., 2004), und aktiviert dadurch unterschiedliche Signalkaskaden (Tab. 1.2.3).

S1P<sub>1</sub> induziert primär migratorische Effekte unter Beteiligung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und nachgeschalteter Aktivierung von Rac und Rho. Die Deletion von S1P<sub>1</sub> in Mäusen führt zur embryonalen Lethalität und wird durch eine verringerte Migration von Glattmuskelzellen zu den Gefäßwänden hervorgerufen, während Vaskularisierung und Angiogenese nicht beeinträchtigt werden (Liu et al., 2000b). Hingegen sind S1P<sub>2</sub><sup>-/-</sup> Mäuse überlebensfähig, zeigen keine anatomischen oder histologischen Defekte, aber weisen spontan auftretende epileptische Anfälle auf (MacLennan et al., 2001). S1P<sub>2</sub> wird ubiquitär exprimiert und besitzt vermutlich eine Bedeutung in der neuronalen Entwicklung während der Embryogenese (MacLennan et al., 1997). Im Gegensatz zu S1P<sub>1</sub> inhibiert S1P<sub>2</sub> die Aktivierung von Rac über G<sub>12/13</sub>-Proteine und führt zu einer Migrationshemmung (Okamoto et al., 2000). S1P<sub>3</sub> stimuliert die gleichen G-Proteine wie S1P<sub>2</sub> und ähnelt in seinem intrazellulären Signalverhalten diesem Rezeptorsubtyp, erhöht aber die Aktivität von Rac und löst dadurch migratorische Effekte aus (Ishii et al., 2004). S1P<sub>4</sub> wurde zuerst aus *in vitro*-differenzierten DCs isoliert und ist in seiner Expression im Vergleich zu S1P<sub>1-3</sub> auf die lymphatischen Organe beschränkt (Graeler et al., 1998). Dieser S1P-Rezeptorsubtyp ist somit vor allem in die Regulation von immunologischen Prozessen involviert (Wang et al., 2005). Über die physiologische Bedeutung von S1P<sub>5</sub> ist bislang nur wenig bekannt. Wie S1P<sub>4</sub> wird dieser Rezeptor nur in bestimmten Geweben exprimiert, zu denen Gehirn, Milz und Leukozyten

zählen. Die S1P-induzierte Stimulation dieses Rezeptors zeigt gegensätzliche Effekte zu den anderen S1P-Rezeptoren und induziert durch die Inhibierung der MAPKinase eine Hemmung des Zellwachstums (Malek et al., 2001).

**Tab. 1.2.3:** *Expression und Signaltransduktion der S1P-Rezeptoren in Mäusen (nach Takuwa et al., 2002)*

Rezeptor	G-Protein-Kopplung	Signaltransduktion	Expression
S1P <sub>1</sub>	G <sub>i/o</sub>	MAPK ↑, AC ↑↓, PLC/Ca ↑, (Rho ↑), Rac ↑, PI3K/Akt ↑	Ubiquitär
S1P <sub>2</sub>	G <sub>i/o</sub> , G <sub>q</sub> , G <sub>12/13</sub> , G <sub>s</sub>	MAPK ↑, AC ↑, PLC/Ca ↑, Rho ↑, Rac ↓	Ubiquitär
S1P <sub>3</sub>	G <sub>i/o</sub> , G <sub>q</sub> , G <sub>12/13</sub> , G <sub>s</sub>	MAPK ↑, AC ↑↓, PLC/Ca ↑, Rho ↑, Rac ↑, PI3K/Akt ↑	Ubiquitär
S1P <sub>4</sub>	G <sub>i/o</sub> , G <sub>12/13</sub> , G <sub>s</sub>	MAPK ↑, AC ↑, PLC/Ca ↑, Rho ↑	Lymphknoten, Milz, Thymus, Lunge
S1P <sub>5</sub>	G <sub>i/o</sub> , G <sub>12/13</sub>	MAPK ↓, AC ↓, PLC/Ca ↑	Thymus, Milz, Knochenmark

#### 1.2.4 S1P-Rezeptoren und deren Effekte in Immunzellen

S1P besitzt eine zentrale Rolle in der Regulation von immunologischen Prozessen und interagiert mit einer Vielzahl von zellulären Vorgängen, die hauptsächlich durch die Expression von S1P-Rezeptoren und deren Signalkaskaden gesteuert werden (Tab. 1.2.4). In Lymphozyten dominieren die Rezeptoren S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>4</sub> (Graeler and Goetzl, 2002). Die Expression von S1P<sub>1</sub> ist im Wesentlichen an migratorische Prozesse gekoppelt. S1P<sub>1</sub> wird erstmals während der Entwicklung von CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Thymozyten in der Milz gebildet und bewirkt den Austritt von reifen Thymozyten in die Blutbahn infolge des S1P-Konzentrationsgradienten (Matloubian et al., 2004). Ferner reguliert S1P<sub>1</sub> den Egress von T- und B-Lymphozyten aus den sekundären Lymphorganen in das efferente Lymphsystem und veranlasst über eine Downregulation den Verbleib von T-Lymphozyten in den T-Zell-Bereichen der Lymphknoten während der T-Zell-Aktivierung (Matloubian et al., 2004). Neben Lymphozyten wirkt S1P chemotaktisch auf weitere Immunzellen, unter anderem DCs (Idzko et al., 2002), jedoch sind die beteiligten Rezeptorsubtypen und Signalkaskaden noch nicht identifiziert. S1P<sub>4</sub> werden in erster Linie Zytokin-modulierende Eigenschaften in T-Zellen zugeordnet, während migratorische Effekte



über diesen Rezeptorsubtyp nicht vermittelt werden. Nach Stimulation mit S1P wird über S1P<sub>4</sub> in T-Zellen die INF- $\gamma$ -Sekretion reduziert und die IL-10-Synthese erhöht (Wang et al., 2005), so dass in Anwesenheit von S1P eher eine TH2-basierte Immunantwort zu erwarten ist (Muller et al., 2005). Im Gegensatz zu S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>4</sub> wird S1P<sub>2</sub> nur auf mononuklearen Zellen exprimiert. S1P ist direkt an der Regulation von allergischen Typ I Reaktionen beteiligt, indem über S1P<sub>2</sub> die IgE-vermittelte Degranulation und Mediatorfreisetzung in Mastzellen erhöht sind (Jolly et al., 2004). Über die Rezeptoren S1P<sub>3</sub> und S1P<sub>5</sub> ist bisher nur wenig bekannt. Obwohl sie in einigen Immunzellen vorhanden sind (Goetzl et al., 2004), konnten diesen Rezeptorsubtypen noch keine eindeutigen Funktionen zugeordnet werden.

**Tab. 1.2.4:** S1P-Rezeptorprofil und deren Effekte in Immunzellen

	T-Zellen	B-Zellen	DCs	Makrophagen	Mastzellen
<b>S1P<sub>1</sub></b>	+	+	+	+	+
	Chemotaxis $\uparrow$	Chemotaxis $\uparrow$		Chemotaxis $\uparrow$	Chemotaxis $\uparrow$
<b>S1P<sub>2</sub></b>	-	-	+	+	+
					Chemotaxis $\downarrow$ Degranulation $\uparrow$
<b>S1P<sub>3</sub></b>	-	(+)	+	+	-
<b>S1P<sub>4</sub></b>	+	+	+	+	-
	IL-10 $\uparrow$ IL-2 $\downarrow$ , IL-4 $\downarrow$ INF- $\gamma$ $\downarrow$				
<b>S1P<sub>5</sub></b>	-	-	-	-	-

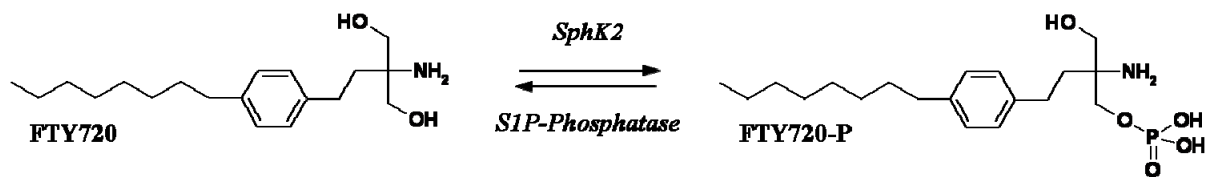
### 1.2.5 Bedeutung des S1P-Strukturanalogons FTY720 in Immunzellen

Die Funktion von S1P in der Regulation von immunologischen Prozessen gewann mit dem Nachweis, dass FTY720 seine immunsuppressive Wirkung durch Interaktion mit S1P-Rezeptoren transduziert, zunehmend an Bedeutung (Matloubian et al., 2004). FTY720 wurde erstmals 1992 durch Modifikation der natürlichen Substanz Myoriscin hergestellt (Brinkmann et al., 2004). Myoriscin, auch bekannt als Thermozytocidin oder ISP-1, wurde zunächst als fungizider Metabolit der Schimmelpilze *Mycelia sterilia* und *Myriococcum albomyces* identifiziert (Kluepfel et al., 1972). Während eines Screening-Programms von biologischen Substanzen auf eine potentiell immunsuppressive Wirkung wurde Myoriscin in dem Ascomyceten

*Isaria sinclairii* erneut isoliert (Fujita et al., 1996b). Diese natürliche Substanz reduziert sowohl die Lymphozytenproliferation in der gemischten Lymphozytenkultur (MLC, mixed lymphocyte reaction) als auch die T-Zell-abhängige Antikörperproduktion sowie die Bildung von zytotoxischen T-Zellen (Fujita et al., 1996a). Ein Teil dieser Effekte wird durch die Hemmung des ersten Enzyms im Sphingolipid-Metabolismus, der Serin-Palmitoyl-Transferase, vermittelt. So konnte die Myoriscin-induzierte Wachstumshemmung von Lymphozyten in Gegenwart mikromolarer Konzentrationen von Dihydrosphingosin, Sphingosin oder S1P wieder aufgehoben werden (Miyake et al., 1995). Um potentere Immunsuppressiva zu gewinnen, wurden Derivate des Myoriscins, unter anderem FTY720, synthetisiert. Jedoch reduziert FTY720 im Gegensatz zu Myoriscin nicht die Aktivität der Serin-Palmitoyl-Transferase und inhibiert weder die T-Zell-Proliferation noch die T-Zell-Aktivierung, sondern vermittelt seinen immunsuppressiven Effekt durch die Retention von Lymphozyten in den Lymphknoten (Brinkmann et al., 2000; Matloubian et al., 2004; Pinschewer et al., 2000).

FTY720 stellt analog zu Sphingosin ein Substrat der SphK2 dar und wirkt in seiner phosphorylierten Form FT720-P als Agonist an S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>3</sub>, S1P<sub>4</sub> und S1P<sub>5</sub> (Brinkmann et al., 2002). Im Vergleich zum natürlichen Liganden erfolgt die Degradierung von FT720-P nur durch Phosphatasen, während die S1P-Lyase keinen Effekt auf den Abbau von FTY720 ausübt (Bandhuvula et al., 2005) (Abb. 1.2.5). Dieser Gegensatz ist eine mögliche Ursache für die Unterschiede des Strukturanalogs in seiner Wechselwirkung mit S1P-Rezeptoren. So bewirkt FTY720 eine langanhaltende Internalisierung des S1P<sub>1</sub> in Lymphozyten und verhindert dadurch die Migration der Lymphozyten aus den Lymphknoten in Antwort auf S1P (Matloubian et al., 2004).

Die immunsuppressive Wirkung von FTY720 wird zusätzlich durch eine Interaktion mit Lymphknoten-assoziierten Endothelzellen hervorgerufen. So induziert FTY720 in Endothelzellen die Translokation von E-Cadherin an die fokale Kontaktseite und erzielt dadurch eine verstärkte Zusammenlagerung der Endothelzellen (Sanchez et al., 2003). Daraufhin ist die Transmigration von Lymphozyten durch das Endothel in die efferenten Lymphgefäße deutlich erschwert. Diese Daten lassen vermuten, dass FTY720 seine immunsuppressive Wirkung durch die Interaktion mit mehreren Zelltypen erzielt. Im Hinblick auf die chemotaktische Wirkung von S1P auf DCs sind zelluläre Effekte von FTY720 auch für DCs zu erwarten.



**Abb. 1.2.5:** Bildung und Metabolismus von FTY720-P

### 1.2.6 Interaktion von S1P- und Wachstumsfaktor-Rezeptoren

Es wird immer deutlicher, dass Liganden von GPCRs ihre Wirkungen nicht ausschließlich durch Aktivierung ihrer Rezeptoren und deren nachgeschalteten Signalwegen transduzieren, sondern auch durch Interaktion mit Wachstumsfaktorrezeptoren zelluläre Effekte auslösen (Pyne et al., 2003). Eine solche Wechselwirkung konnte für S1P<sub>1</sub> und dem PDGF-Rezeptor (PDGFR) beschrieben werden. So führt die Stimulation von HEK293 Zellen mit sowohl PDGF als auch S1P zur Bildung eines S1P<sub>1</sub>/PDGFR-Komplexes und anschließend zur Aktivierung von ERK1 und ERK2 (Alderton et al., 2001). Interessant ist, dass die Aktivierung von ERK1/2 in Antwort auf S1P sowie PDGF durch den Einsatz von S1P<sub>1</sub>-Antisense-Oligodesoxynukleotiden (ODN) reduziert werden konnte (Waters et al., 2003). Ferner ist die PDGF-induzierte Migration in S1P<sub>1</sub><sup>-/-</sup> Fibroblasten vollständig aufgehoben (Hobson et al., 2001). Auch scheinen migratorische Störungen für die Ähnlichkeiten zwischen den Phänotypen der S1P<sub>1</sub><sup>-/-</sup> und PDGFR<sup>-/-</sup> Mäuse verantwortlich zu sein, die durch starke embryonale Blutungen gekennzeichnet sind. Die Defekte in den Gefäßen werden hauptsächlich durch die fehlende Migration von Glattmuskelzellen in neu gebildete Gefäße hervorgerufen (Lee et al., 1999; Lindahl et al., 1997).

Nicht nur S1P<sub>1</sub>, sondern auch weitere Rezeptoren der LPL-Familie interagieren mit Wachstumsfaktorrezeptoren. So konnte ein Crosstalk zwischen dem Tropomyosin Rezeptorkinase A (Trk A) Rezeptor und LPA<sub>1</sub> nachgewiesen werden (Moughal et al., 2004). Ferner scheint eine Beteiligung von TGF-β-Rezeptoren in der S1P-induzierten Migration als sehr wahrscheinlich, da in Anwesenheit eines funktionell inaktiven TGF-β Typ I-Rezeptors (TβR-I) S1P keine migratorischen Effekte in epidermalen Zellen ausübte (Sauer et al., 2004a).

## **1.3 Transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$**

### **1.3.1 Bedeutung von TGF- $\beta$ in immunologischen Prozessen**

TGF- $\beta$  stellt eines der über 40 strukturell ähnlichen Polypeptidwachstumsfaktoren der TGF- $\beta$ -Superfamilie dar, deren Mitglieder eine hohe Sequenzhomologie aufweisen und sich in die TGF- $\beta$ -, Aktivin-, die GDF (Growth and Differentiation Factor, Wachstums- und Differenzierungsfaktor)- und die BMP (Bone Morphogenetic Protein)-Unterfamilien gliedern. Die pleiotrop sekretierten Faktoren regulieren zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Migration und wurden hauptsächlich aufgrund ihrer Bedeutung in der Gewebsdifferenzierung und Organentwicklung identifiziert (Tab. 1.3.1) (Cohen, 2003; Massague, 1998).

TGF- $\beta$  bildet den Prototypen dieser Familie und wurde erstmals als Faktor mit transformierenden Eigenschaften auf Fibroblasten in Nagern entdeckt (De Larco et al., 1980). Es existieren 3 hoch konservierte Isoformen von TGF- $\beta$ , TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3, die aufgrund der Bindung an identischen Rezeptoren ähnliche intrazelluläre Zielmoleküle aktivieren und sich vorwiegend in ihrem Expressionsmuster unterscheiden (Attisano and Wrana, 1996). So wird TGF- $\beta$ 1 hauptsächlich im Endothel, in Bindegewebszellen und in hämatopoetischen Zellen und TGF- $\beta$ 2 im differenzierten und reifen Epithel exprimiert (Taipale et al., 1998). TGF- $\beta$ 3 konnte insbesondere im epithelialen und mesenchymalen Gewebe nachgewiesen werden (Taipale et al., 1998). Die Isoformen TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3 besitzen daher eine zentrale Rolle in der Regulation von organellen und epithelialen Wachstums- und Differenzierungsprozessen, während TGF- $\beta$ 1 nahezu an sämtlichen immunologischen Vorgängen beteiligt ist (Cohen, 2003).

Jede immunkompetente Zelle ist in der Lage TGF- $\beta$  zu produzieren und übt über autokrine und parakrine Mechanismen zelluläre Effekte aus, die in Abhängigkeit von dem Zelltyp, dem Differenzierungsgrad und dem Zytokinmilieu unterschiedlich und zum Teil auch gegensätzlich ausgeprägt sind (Letterio and Roberts, 1998). Gewöhnlich besitzt TGF- $\beta$  eher antiproliferative Eigenschaften und hemmt das IL-2-induzierte Wachstum von T-Zellen (Kehrl et al., 1986), jedoch sind auch proliferative Effekte, insbesondere in naiven T-Zellen, beschrieben worden (Cerwenka et al., 1994). Darüber hinaus greift TGF- $\beta$  im Zuge der T-Zell-Aktivierung in die Differenzierung des T-Effektorzellsubtyps ein, indem TGF- $\beta$  die Synthese von IL-12,

IFN- $\gamma$  und IL-4 in T-Zellen reguliert. Es ist zu erwähnen, dass kontroverse Daten hinsichtlich des finalen T-Zellsubtyps existieren (Schmitt et al., 1994; Swain et al., 1991). Übereinstimmende Ergebnisse liegen in der Bedeutung von TGF- $\beta$  als Schlüsselzytokin der immunsuppressiven Wirkung von regT-Zellen vor. In einem T-Zell-Transfer Colitis ulcerosa Mausmodell reagierten dominant negativ TGF- $\beta$  Typ II-Rezeptoren (T $\beta$ R-II) exprimierende CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht auf den immunsuppressiven Effekt der regulatorischen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen (Fahlen et al., 2005). Die Mäuse bildeten starke Entzündungen in den intestinalen Regionen, was die Relevanz von TGF- $\beta$  in der Toleranz gegenüber Autoantigenen demonstriert. Eine derart erhöhte inflammatorische Aktivität gegenüber Autoantigenen kennzeichnet auch den Phänotyp von TGF- $\beta$ 1<sup>-/-</sup> Mäusen (Shull et al., 1992), in denen eine verstärkte Anzahl von reaktiven Immunzellen aller Subpopulationen auffindbar war (Kulkarni et al., 1993).

Ferner sind die TGF- $\beta$ 1<sup>-/-</sup> Mäuse durch das Fehlen von LCs in der Epidermis charakterisiert (Borkowski et al., 1996). Als Ursache für diesen Defekt werden sowohl fehlende migratorische Funktionen als auch Störungen in der Differenzierung von Vorläuferzellen diskutiert. Wahrscheinlich ist eine Beteiligung des Differenzierungsfaktors Id2 (inhibitor of differentiation 2), da Id2<sup>-/-</sup> Mäuse analog zu den TGF- $\beta$ 1<sup>-/-</sup> Mäusen keine LCs in der Epidermis exprimieren. Weiterhin erfährt Id2 eine transiente Hochregulation in Antwort auf TGF- $\beta$  und konnte als direktes Zielgen des Zytokins identifiziert werden (Hacker et al., 2003).

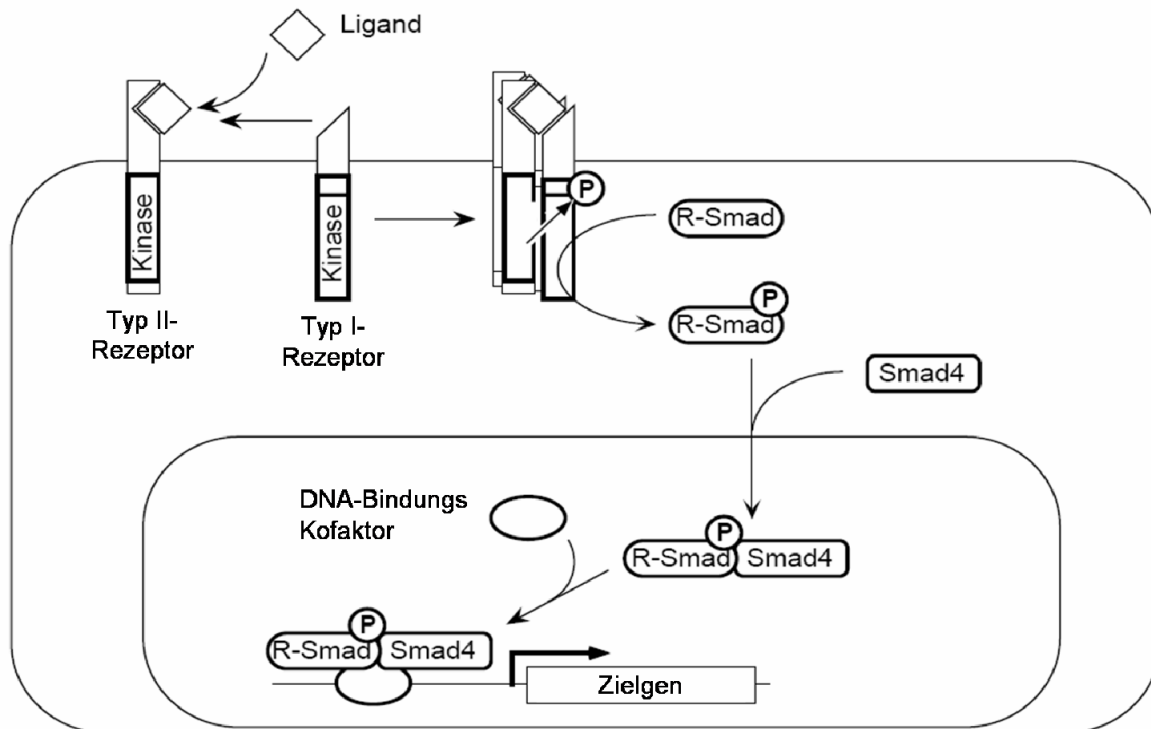
Im Gegensatz zu den TGF- $\beta$ 1<sup>-/-</sup> Mäusen sind die Phänotypen der TGF- $\beta$ 2<sup>-/-</sup> und TGF- $\beta$ 3<sup>-/-</sup> Mäuse hauptsächlich durch Störungen in organellen Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen gekennzeichnet (Letterio and Bottinger, 1998). TGF- $\beta$ 2<sup>-/-</sup> Mäuse sterben bereits in der Perinatalen Phase und sind durch starke Anomalien in Lunge, Herz, des Skelettes, der Augen und Ohren sowie des Urogenitaltraktes gekennzeichnet. Auch die TGF- $\beta$ 3<sup>-/-</sup> Mäuse sterben kurz nach der Geburt und weisen Anomalien der Lunge, Missbildungen im Gesichtsbereich und eine veränderte Entwicklung von Mesenchym und Epithel auf.

**Tab. 1.3.1:** Mitglieder der TGF- $\beta$ -Familie und deren physiologische Wirkungen  
(nach Massague, 1998)

Mitglieder der TGF- $\beta$ Familie	Sequenz-homologie (in %)	Ausgewählte physiologische Eigenschaften
<b>BMP2-Unterfamilie</b>		
BMP2	100	Gastrulation, Neurogenese, Knorpelbildung, Apoptose
BMP4	92	Frosch: Mesodermentwicklung Fliege: Entwicklung von Augen, Flügeln
<b>BMP5-Unterfamilie</b>		
BMP5	61	Zusammen mit BMP2 und BMP4 ist diese Unterfamilie an der Entwicklung nahezu aller Organe beteiligt, außerdem vielfältige Funktionen bei der Neurogenese
BMP6	61	
BMP7	60	
BMP8	55	
<b>GDF5-Unterfamilie</b>		
GDF5/ CDMP1	57	Knorpelentwicklung in Gliedmaßen
GDF6/ CDMP2	54	
GDF7	57	
<b>Vg1-Unterfamilie</b>		
GDF1	42	Entwicklung des Mesoderms in Fröschen und Fischen
<b>GDF3</b>	53	
<b>BMP3-Unterfamilie</b>		
BMP3	48	Differenzierung des Knochengewebes, fetale Knochenentwicklung, Chemotaxis von Monozyten
GDF10	46	
<b>Intermediarfaktoren</b>		
Nodal	42	Axiale Mesodermentwicklung
Dorsalin	40	Regulierung der Zelldifferenzierung im Axon
<b>GDF8</b>	41	Inhibierung des Skelettmuskelwachstums
<b>Activin-Unterfamilie</b>		
Activin- $\beta$ A	42	Diese Familie ist zuständig für die Produktion des Follikel stimulierenden Hormons in der Hypophyse, die Differenzierung der Erythrozyten, beim Frosch auch für die Induktion der Mesodermbildung
Activin- $\beta$ B	42	
Activin- $\beta$ C	37	
Activin- $\beta$ D	40	
<b>TGF-<math>\beta</math>-Unterfamilie</b>		
TGF- $\beta$ 1	35	Unterbrechung des Zellzyklus in epithelialen und hämatopoetischen Zellen, Kontrolle der Zellproliferation und -differenzierung, Beteiligung an Wundheilung und Immunsuppression
TGF- $\beta$ 2	34	
TGF- $\beta$ 3	36	

## 1.3.2 TGF- $\beta$ -Rezeptoren

Die Mitglieder der TGF- $\beta$ -Familie vermitteln ihre Effekte über spezifische membranständige Glykoproteinrezeptoren, die eine Serin/Threonin-Kinase-Aktivität aufweisen (Massague, 1998). Anhand der strukturellen und funktionellen Eigenschaften werden die Rezeptoren in zwei Unterfamilien (Typ I und II) eingeteilt. Die weitere Charakterisierung führt zu einer Klassifikation in fünf Typ I- und sieben Typ II-Rezeptoren (Kingsley, 1994). In der Abwesenheit von Liganden liegen die Typ I- und Typ II-Rezeptoren entweder als Homodimere oder als präformierte Komplexe vor. Unabhängig vom Liganden unterlaufen die TGF- $\beta$ -Rezeptoren einem permanenten Internalisierungsprozess mit anschließender Degradierung oder Rücktransport an die Zellmembran (Di Guglielmo et al., 2003). TGF- $\beta$  bindet zunächst den Typ II-Rezeptor und löst dadurch die Anlagerung des Typ I-Rezeptorproteins aus. Dieser Prozess wird als sequentieller Bindungsmodus bezeichnet (Attisano et al., 1993). Die Formierung des Rezeptorkomplexes wird durch zwei so genannte TGF- $\beta$ -Zutritts-Proteine, dem Endoglin in den Endothelien und dem Betaglykan, unterstützt (Itoh et al., 2000). Einige Liganden, wie zum Beispiel TGF- $\beta$ 2, interagieren nur mit präformierten Rezeptorkomplexen und bewirken eine Stabilisierung des heteromeren Komplexes (Derynck and Feng, 1997). Durch die Bildung des Rezeptorkomplexes erfolgt eine Autophosphorylierung des Typ II-Rezeptors an Serin- und Threoninresten mit einhergehender Aktivierung einer Kinasefunktion, die nun den Typ I-Rezeptor an Serin- und Threoninresten der GS (Glycin-Serin)-Domäne phosphoryliert. Dieser Bereich fungiert als Aktivierungszentrum für die angrenzende Kinasestruktur des Typ I-Rezeptors. Nach Zusammenlagerung der Rezeptoren internalisiert der TGF- $\beta$ -Rezeptorkomplex über Clathrin- oder Caveolin-vermittelte Wege in unterschiedliche Zellkompartimente, in denen differente Rezeptorsubstrate durch die aktivierten rezeptorassoziierten Kinasen phosphoryliert werden. Dazu zählen unter anderem die sogenannten Smad-Proteine, die in ihrer aktivierten Form eine Reihe von Transkriptionsvorgängen im Nukleus regulieren. Neben den Smad-Proteinen stimuliert TGF- $\beta$  weitere Signalkaskaden, die zum Teil den Smad-Signalweg regulieren, aber auch Smad-unabhängige Effekte auslösen können (Derynck and Zhang, 2003).



**Abb. 1.3.3A:** Darstellung des Smad-Signalweges (nach Massague, 1998)

### 1.3.3 Smad-Proteine

Die Bezeichnung der Smad-Proteine leitet sich von den sie kodierenden Genen ab, die erstmals in *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* identifiziert wurden. Durch Kombination des *Drosophila*-Gens Mad (Mother against decapentaplegic) und des *C. elegans*-Gens Sma (Small body size) wurde der Name Smad kreiert (Itoh et al., 2000). Es existieren 8 Smad-Proteine, die aufgrund ihrer strukturellen und funktionellen Eigenschaften in drei Unterfamilien eingeteilt werden, den sogenannten Rezeptor-Smad-Proteinen (R-Smad), den kooperativen Smad-Proteinen (Co-Smads) und den inhibitorischen Smad-Proteinen (I-Smads). Nach ligand-induzierter Aktivierung der TGF- $\beta$ -Rezeptoren assoziieren die formierten Rezeptorkomplexe mit den Smad-Proteinen. Diese Zusammenlagerung wird zum Teil durch Ankerproteine unterstützt, die die Rekrutierung der Smad-Proteine zu den Rezeptorkomplexen auslösen. Eine solche Funktion konnte dem Ankerprotein SARA (Smad anchor for receptor activation) für die TGF- $\beta$ -spezifischen Smad-Proteine Smad2 und Smad3 zugeteilt werden (Tsukazaki et al., 1998).



Smad2 und Smad3 zählen zu den sogenannten R-Smads, die direkt durch aktivierte Typ I-Rezeptoren phosphoryliert werden. Im Gegensatz zu Smad2 und Smad3, welche hauptsächlich durch T $\beta$ R-I phosphoryliert werden, wird Smad8 ausschließlich durch Rezeptoren der BMPs aktiviert (Derynck and Zhang, 2003). Smad1 und Smad5 besitzen große strukturelle Ähnlichkeiten mit Smad8 und werden überwiegend durch aktivierte BMP-Rezeptoren phosphoryliert (Wrana and Attisano, 2000). Aber auch TGF- $\beta$  vermag Smad1 und Smad5 zu phosphorylieren, jedoch nicht durch Aktivierung des „klassischen“ Typ I-Rezeptors T $\beta$ R-I, der auch als ALK5 (activin receptor-like kinase 5) bekannt ist, sondern durch Aktivierung des Typ I-Rezeptors ALK1 (activin receptor-like kinase 1) (Derynck and Zhang, 2003). Im Gegensatz zu dem ubiquitär vorhandenen T $\beta$ R-I wurde ALK1 bisher nur in Endothelzellen nachgewiesen (Goumans et al., 2002). Unmittelbar nach der Phosphorylierung dissoziieren die R-Smads vom Rezeptorkomplex und binden die zytoplasmatischen Co-Smads. Der aus zwei R-Smads und einem Co-Smad bestehende heteromere Komplex fungiert als Shuttle für die Translokation in den Nukleus, wo letztendlich die Bindung der Smad-Komplexe an die DNA und die Steuerung von transkriptionellen Prozessen stattfindet (Massague, 1998) (Abb. 1.3.3A). Bisher wurde nur Smad4 als Co-Smad identifiziert, welches mit allen aktivierten R-Smads wechselwirkt.

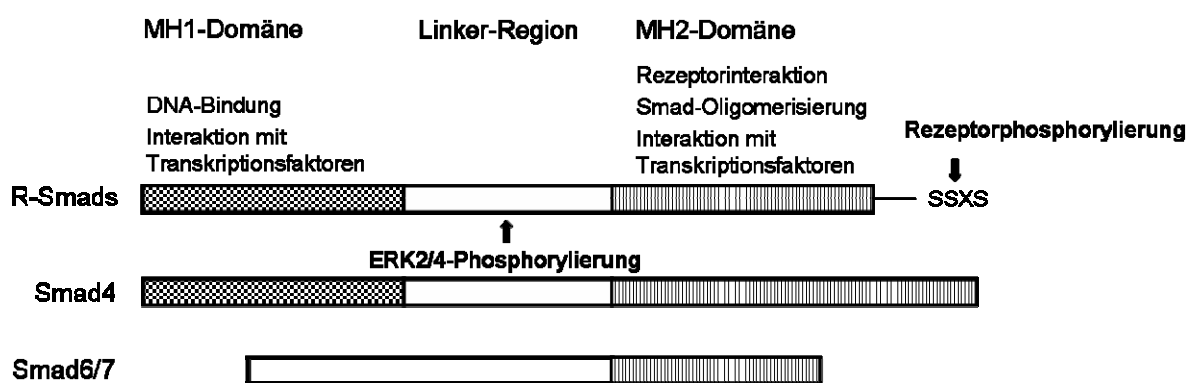
Die dritte Gruppe bilden die I-Smads, die sich in ihrer Struktur von den beiden anderen Gruppen unterscheiden und die TGF- $\beta$ -vermittelte Signaltransduktion kompetitiv durch Verhinderung der Heteromisierung von R- und Co-Smads oder der R-Smad-Rezeptor-Bindung hemmen. Die Expression von Smad6 und Smad7 wird stark von extrazellulären Signalen reguliert und unter anderem durch BMP beziehungsweise TGF- $\beta$  im Sinne eines autogenen Rückkopplungsmechanismus induziert (Massague, 2000). Im Gegensatz zu den R- und Co-Smads befinden sich die I-Smads im inaktivierten Zustand im Nukleus und gelangen erst nach TGF- $\beta$ -Stimulation aus dem Zellkern ins Zytosol.

Der funktionelle Unterschied der I-Smads ist zum einen in dem Fehlen der für die DNA-Bindung essentiellen MH1-Domäne begründet. R- und Co-Smads bestehen aus einer konservierten MH1-Domäne und einer C-terminalen MH2-Domäne, die durch eine Linkerregion miteinander verknüpft sind. Über die MH2-Domäne werden die Oligomerisierung von Smad-Proteinen und Smad-Rezeptor-Interaktionen vermittelt, während die MH1-Domäne mit Ausnahme von Smad2 direkt mit der DNA interagiert

und die Transkription von Genen reguliert (Abb. 1.3.3B). Sowohl die MH1- als auch die MH2-Domäne interagieren mit Sequenz-spezifischen Transkriptionsfaktoren und steuern indirekt die Expression von Proteinen. Die Aktivierung des Smad-Signalweges wird durch die Typ I-Rezeptorkinase vermittelte Phosphorylierung am C-terminalen Ende der MH2-Domäne von den R-Smads initiiert, wodurch die Oligomerisierung mit Smad4 und die anschließende Translokation in den Zellkern ermöglicht wird.

Neben der MH2-Domäne können Smad-Proteine auch in anderen Bereichen phosphoryliert werden. Die Aktivierung des zur Familie der MAPK (mitogen-activated protein kinase) zählenden Erk-Signalweges führt zum Beispiel zu einer Phosphorylierung von Smad1, Smad2 und Smad3 in der Linkerregion und verhindert dadurch die Translokation des Smad-Komplexes in den Zellkern. Somit sind neben den I-Smads weitere Smad-unabhängige Mechanismen an der Regulation des Smad-Signalwegs beteiligt.

Nach der Translokation des Smad-Komplexes in den Nukleus wird der größte Teil der R-Smads dephosphoryliert und relokalisiert im Zytoplasma, während kleine Mengen über den Ubiquitin-Proteasomen-Signalweg degradiert werden.



**Abb. 1.3.3B:** struktureller Aufbau der Smad-Proteine und deren Phosphorylierungsdomänen (nach Massague, 1998)

### 1.3.4 Bedeutung der Smad-Proteine an zellulären Prozessen

Die Funktion der Smad-Proteine in der Steuerung von biologischen Prozessen und deren Bedeutung in der Transduktion von TGF- $\beta$ -Effekten konnte durch Generierung von Smad-knockout Mäusen detailliert charakterisiert werden. Ausschalten des

Smad2- bzw. Smad4-Gens in Mäusen endet bereits im Embryonalstadium und ist in erster Linie auf eine defekte Gastrulation zurückzuführen (Nomura and Li, 1998; Yang et al., 1998). Smad5-defiziente Mäuse sind durch Störungen der Angiogenese mit ebenfalls letalem Ausgang in der Embryonalphase gekennzeichnet (Yang et al., 1999b). Nur Smad6<sup>-/-</sup> und Smad3<sup>-/-</sup> Mäuse überleben das Embryonalstadium, zeigen jedoch deutliche Abnormalitäten. So ist der Phänotyp von Smad6-defizienten Mäusen hauptsächlich von kardiovaskulären Anomalien geprägt (Galvin et al., 2000), während Smad3-defiziente Mäuse Fehlfunktionen des Immunsystems und eine beschleunigte Wundheilung aufweisen (Ashcroft et al., 1999). Smad3<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen eine verstärkte Reepithalisierung und eine verringerte Infiltration von Monozyten und Neutrophilen in das Wundareal. Die verringerte Einwanderung von Monozyten in die Wunde verhindert die Entstehung von Entzündungen und beschleunigt dadurch den Wundheilungsprozess. Allerdings sind Smad3<sup>-/-</sup> Mäuse bereits nach der Geburt durch eine geschwächte Immunantwort in den Mukosaschichten des Darms mit einhergehender Abszess- und Fistelbildung gekennzeichnet, die auf eine verringerte Infiltration von Monozyten und Neutrophilen zurückzuführen ist und ausschließlich durch gramnegative und für den normalen Organismus harmlose Bakterien hervorgerufen wird. Somit weisen Smad3<sup>-/-</sup> Mäuse in Analogie zu den TGF-β1<sup>-/-</sup> Mäusen immunologische Störungen auf und deuten auf Smad3 als Schlüsselprotein der TGF-β-Signalkaskade in der Regulation von immunrelevanten Prozessen hin.

### 1.3.5 Bedeutung von Smad3 an den Effekten von S1P in epidermalen Zellen

S1P wird hauptsächlich von Thrombozyten sekretiert und weist bezüglich der Freisetzung ähnliche Eigenschaften auf wie TGF-β, welches eine zentrale Rolle im Wundheilungsprozess einnimmt. Migratorische Untersuchungen als auch Untersuchungen zur Proliferation ergaben ähnliche Eigenschaften von S1P und TGF-β in epidermalen Zellen (Vogler et al., 2003). Ein Großteil der Wirkungen von TGF-β während der Wundheilung wird durch das intrazelluläre Signalprotein Smad3 vermittelt, wie an Smad3<sup>-/-</sup> Mäusen gezeigt werden konnte (Ashcroft et al., 1999). In Analogie zu TGF-β waren die migrationsfördernden und antiproliferativen Effekte von S1P in Smad3<sup>-/-</sup> Keratinozyten vollständig aufgehoben. Ferner konnte eine Aktivierung von Smad-Proteinen in S1P-stimulierten Zellen auf allen Ebenen des Signalweges von der Phosphorylierung bis zur Bindung an Smad-spezifischen

Promotergenem nachgewiesen werden (Sauer et al., 2004a). Diese Daten demonstrieren, dass Smad3 nicht ausschließlich TGF- $\beta$ -Effekte vermittelt, sondern auch einen intrazellulären Mediator von S1P darstellt. Erste Ergebnisse weisen auf eine Beteiligung des T $\beta$ R-I an den S1P-vermittelten Smad-abhängigen Effekten hin und lassen eine Interaktion auf Ebene der Rezeptoren beider Signalwege vermuten (Sauer et al., 2004a).

### 1.4 Fragestellung und Zielsetzung

S1P liegt in relativ konstanten Spiegeln mit steigendem Konzentrationsgradienten von den Lymphknoten über die Lymphgefäße bis ins Blut vor und nimmt eine zentrale Rolle in der Steuerung der Lymphozytenmigration zwischen diesen Kompartimenten ein. Die S1P-Responsivität der Lymphozyten ist abhängig von der Expression und Funktionalität des S1P<sub>1</sub>. Im Hinblick auf zelluläre Immunantworten der Lymphozyten bedarf es der Aktivierung durch APCs, von denen DCs eine Schlüsselposition einnehmen. Bisher ist wenig bekannt über die basale Migration der DCs zwischen der Peripherie und den Lymphknoten. In Bezug auf mögliche analoge Mechanismen zu den Lymphozyten sollten migratorische Effekte von S1P in der Langerhanszelllinie XS52 untersucht werden. LCs residieren in der Dermis in unmittelbarer Nähe zu den Keratinozyten und sind nur in Anwesenheit von TGF- $\beta$  in der Haut nachweisbar. Da Keratinozyten die Hauptquelle von TGF- $\beta$  in der Haut darstellen und hohe Mengen des Zytokins sekretieren, ist eine Beteiligung von TGF- $\beta$  an der Rekrutierung von LCs in die Haut denkbar. Ferner wird TGF- $\beta$  von aktivierten Thrombozyten freigesetzt und übt sowohl migratorische als auch proliferative Effekte auf epidermale Zellen aus. Es ist zu erwähnen, dass diese Effekte auch für S1P beschrieben wurden und eine Beteiligung von Smad3 als intrazellulärer Mediator der Wirkungen beider Substanzen identifiziert werden konnte. Aufgrund dieser Gemeinsamkeiten sollten im Rahmen dieser Arbeit migratorische Effekte von S1P und TGF- $\beta$  in XS52 Zellen näher charakterisiert und eine Beteiligung des Smad-Signalweges an der Migration beider Substanzen untersucht werden. Die bereits für epidermale Zellen nachgewiesene Aktivierung des Smad-Signalweges in Antwort auf S1P sollte an DCs analysiert und weiterführend hinsichtlich der genauen Interaktion von S1P in der TGF- $\beta$ -Signalkaskade charakterisiert werden. Die Arbeit gliedert sich deshalb in folgende Teilgebiete:

- Untersuchung der migratorischen Effekte von S1P, LPA und TGF- $\beta$  in XS52 Zellen
- Nachweis von mRNA-Transkripten der S1P-, LPA- und TGF- $\beta$ -Rezeptoren über eine quantitative Real-Time PCR-Analyse
- Charakterisierung der an der Migration beteiligten S1P-Rezeptorsubtypen durch Einsatz von Antisense- ODN
- Nachweis der Smad-Protein-Aktivierung durch S1P und TGF- $\beta$
- Beteiligung von Smad3 an der S1P- und TGF- $\beta$ -induzierten Migration
- Additive Effekte von S1P und TGF- $\beta$  in der Migration und der zur Migration führenden Smad-Protein-Aktivierung
- Interaktion der TGF- $\beta$ - und S1P-Rezeptoren und deren Auswirkung auf die Smad-Protein-Aktivierung und die migratorischen Effekte von S1P und TGF- $\beta$