

3 ERGEBNISSE

3 Ergebnisse

3.1 Bedeutung von S1P und TGF- β an den migratorischen Effekten von DCs

3.1.1 Einfluss von S1P, LPA und TGF- β auf die Migration von XS52 Zellen

Entscheidend für die Funktionalität von DCs ist die Fähigkeit zwischen der Peripherie des Körpers und den Lymphorganen zu migrieren. In Abhängigkeit des Differenzierungsstatus der Zellen wird die Migration durch verschiedene Chemokine ausgelöst. Neben den Chemokinen regulieren eine Reihe von Wachstumsfaktoren sowie die LPL LPA und S1P die Bewegung von DCs. Der Wachstumsfaktor TGF- β besitzt eine Schlüsselfunktion in der Anreicherung von unreifen LCs in der Epidermis, was durch fehlende LCs in der Epidermis von TGF- β 1^{-/-} Mäusen gezeigt werden konnte. Weiterhin bewirkt TGF- β bei dermalen Verletzungen eine Rekrutierung von Monozyten in das Wundareal und beeinflusst den Heilungsprozess. Da die LPL als auch TGF- β von Thrombozyten im Wundareal sekretiert werden und ähnliche zelluläre Effekte bezüglich Proliferation und Migration von dermalen Zellen aufweisen, wurden im Folgenden die Wirkungen von TGF- β und S1P auf die Migration von unreifen LCs näher untersucht. Als Positivkontrolle für den unreifen Differenzierungsstatus der XS52 Zellen diente MIP-3 α , ein Ligand des Rezeptors CCR6, der selektiv die Migration von imDCs bewirkt und keine Effekte auf mDCs ausübt.

Für Migrationsexperimente wurden Zellkultureinsätze bestehend aus einer Polycarbonatmembran mit 8 μ M Porengröße verwendet. Die Zellen wurden durch die im Vorfeld zur besseren Adhäsion mit Fibronectin beschichteten Filtern von den Stimuli enthaltenden Medien getrennt. Bereits die Zugabe von 0,001 ng/ml TGF- β regte XS52 Zellen zur Migration an, die durch eine Konzentrationserhöhung auf 0,1 ng/ml bis zu einem migratorischen Index von $4,5 \pm 0,27$ verstärkt wurde. Konzentrationen oberhalb von 0,1 ng/ml TGF- β führten zu keiner weiteren Erhöhung des migratorischen Signals. Um chemotaktische Effekte von chemokinetischen Effekten abzugrenzen, wurde der Konzentrationsgradient durch Zugabe der gleichen TGF- β -Konzentration in die Zellsuspension aufgehoben. Chemokinese war erst ab

einer Konzentration von 1 ng/ml TGF- β zu messen, jedoch migrierten die Zellen im Konzentrationsgradienten weitaus stärker, was auf einen primär chemotaktischen Effekt hinweist (Abb. 3.1.1A).

In Gegenwart von S1P zeigten XS52 Zellen konzentrationsabhängig eine gesteigerte Migration, die mit der von TGF- β vergleichbar war. Die Zellen migrierten bereits ab 0,1 μ M S1P und erreichten ihr Migrationsoptimum bei 10 μ M S1P mit einem migratorischen Index von $6,1 \pm 0,9$. In Analogie zu TGF- β wurde der migratorische Effekt von S1P im wesentlichen durch Chemotaxis verursacht, identische Konzentrationen von S1P über und unter dem Filter führten zu einer um etwa 50 % geringeren Zellbewegung (Abb. 3.1.1B).

Im Gegensatz zu S1P löste die Zugabe von LPA weder chemotaktische noch chemokinetische Effekte im getesteten Konzentrationsbereich von 0,01 μ M bis 10,0 μ M LPA aus (Abb. 3.1.1C).

Der unreife Differenzierungsstatus der LCs konnte durch eine verstärkte Migration in Gegenwart von MIP-3 α bestätigt werden, die vergleichbar war mit den migratorischen Wirkungen von S1P und TGF- β (Abb. 3.1.1D).

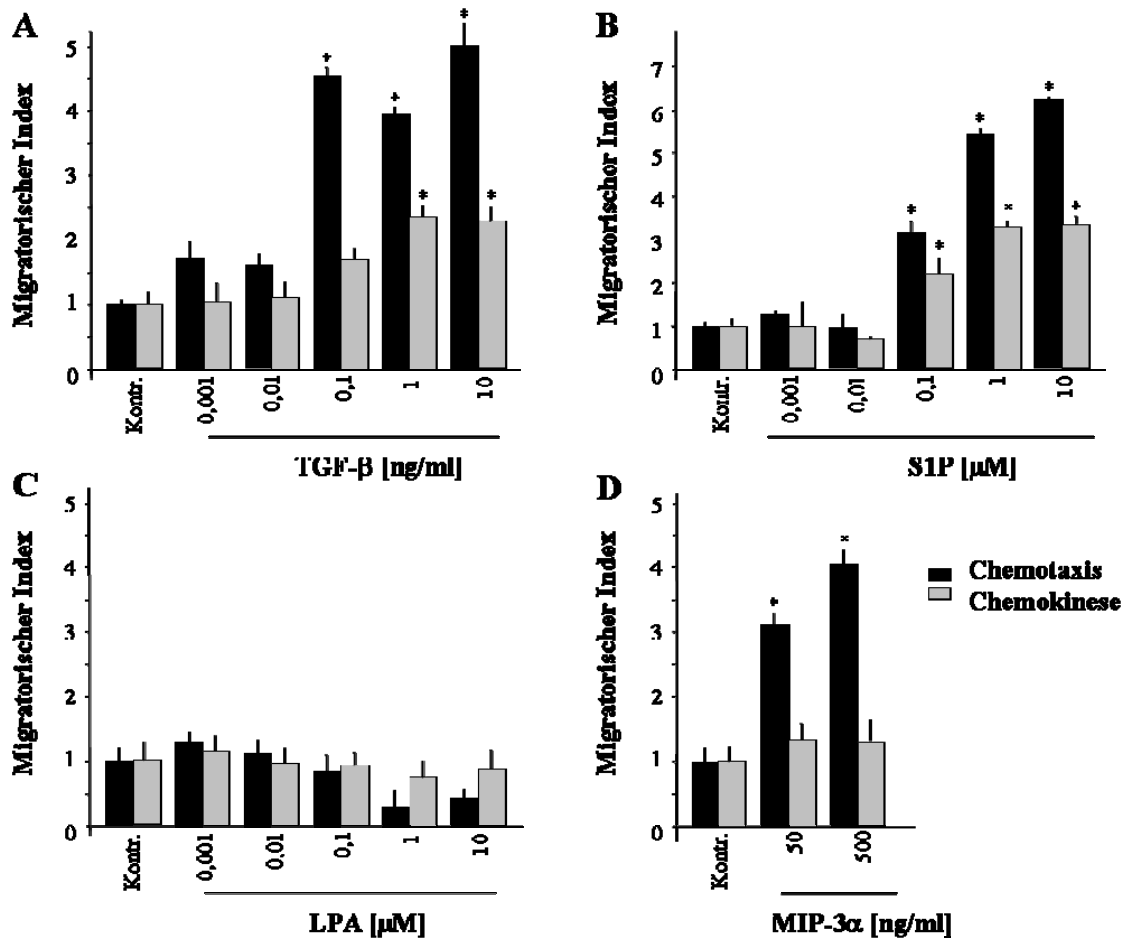


Abb. 3.1.1: Chemotaktische und chemokinetische Effekte von TGF-β, S1P, LPA und MIP-3α in XS52 Zellen. Zellen wurden in der oberen Kammer eines Transwellsystems kultiviert. Die untere Kammer enthielt konditioniertes Medium und wurde für die Bestimmung der chemotaktischen Wirkung mit TGF-β (A), S1P (B), LPA (C) oder MIP-3α (D) in den angegebenen Konzentrationen supplementiert. Zur Bestimmung der chemokinetischen Wirkung wurden die Konzentrationsgradienten durch Zugabe der Stimuli in die obere Kammer aufgehoben. Nach 5 h erfolgte die Auszählung der durch die Membran gewanderten Zellen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SD von Zweifachbestimmungen. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und führte zu vergleichbaren Ergebnissen. * $p \leq 0,05$.

3.1.2 Expression von LPL- und TGF-β-Rezeptoren in XS52 Zellen

S1P vermittelt einen großen Teil seiner Effekte über GPCRs, die als S1P₁₋₅ bezeichnet werden, während die Signaltransduktion von LPA nach bisherigen Erkenntnissen ausschließlich über die spezifischen LPA Rezeptoren LPA₁, LPA₂, LPA₃ und LPA₄ vermittelt wird. Im Hinblick auf die unterschiedlichen migratorischen Wirkungen von S1P und LPA in XS52 Zellen wurde der Gehalt an mRNA Transkripten der LPL- und der TGF-β-Rezeptoren über eine quantitative Real-Time PCR Analyse charakterisiert (Abb. 3.1.2). mRNA aus drei unterschiedlichen Kulturansätzen von XS52 Zellen wurden mit dem Quick-PrepTM Micro mRNA

Aufreinigungskit isoliert und anschließend in cDNA über eine Reverse Transkription umgeschrieben. Die synthetisierte cDNA diente als Matrize für die Amplifizierung der Rezeptor-spezifischen DNA-Sequenzen mit den im Methodenteil aufgelisteten Primern (Tab. 2.1.4C). Nach Normalisierung der gewonnenen Daten gegen β -Aktin als Referenzgen wurde die relative mRNA Expression quantifiziert. mRNA-Transkripte von allen S1P-Rezeptoren mit Ausnahme von S1P₅ konnten nachgewiesen werden. Die S1P-Rezeptoren S1P₁ und S1P₂ wurden am stärksten exprimiert, während eine geringere Menge an S1P₃ und S1P₄ detektierbar war. In Einklang mit der fehlenden Migration von XS52 Zellen auf einen LPA-Stimulus steht die nur marginale Expression der LPA-Rezeptoren. Sowohl T β R-I als auch T β R-II sind in XS52 Zellen im gleichen Verhältnis enthalten, was durch die vorhandenen migratorischen Effekte in Gegenwart von TGF- β auch zu erwarten war.

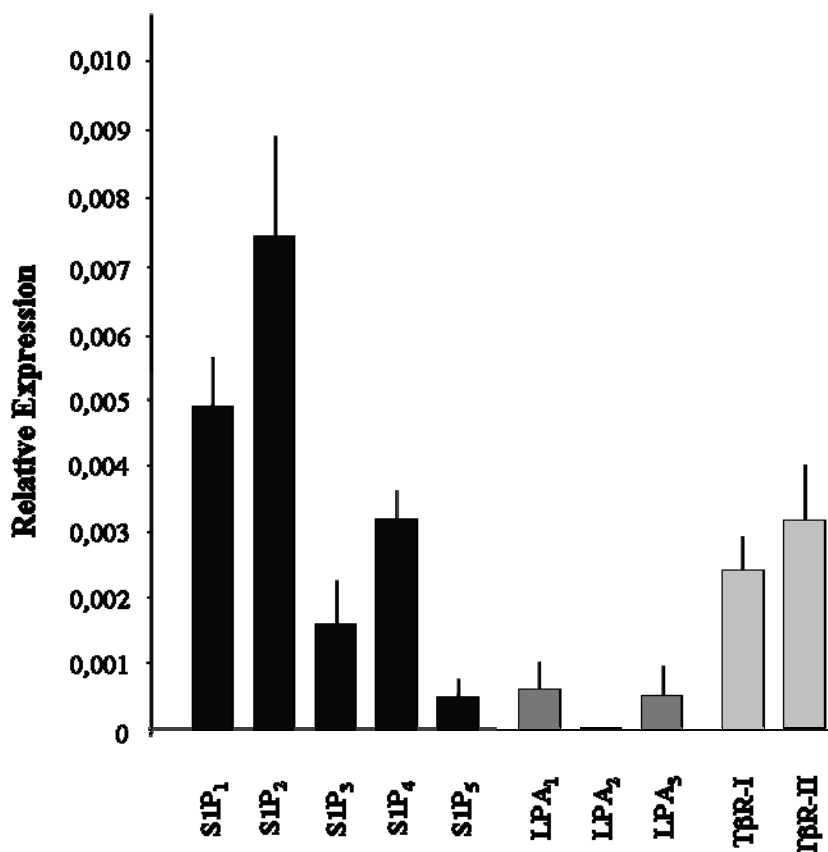


Abb. 3.1.2: Quantitative Bestimmung der Expression von LPL- und TGF- β -Rezeptoren in XS52 Zellen. mRNA aus drei verschiedenen Kulturansätzen von XS52 Zellen wurden isoliert und anschließend in cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der Rezeptorspezifischen mRNA-Transkripte über eine Real-Time PCR Analyse. Die angegebenen Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Versuchsungen normalisiert gegen β -Aktin als Referenzgen.

3.1.3 Charakterisierung der an der S1P-induzierten Migration beteiligten Rezeptoren

Migratorische Effekte von S1P sind bisher ausschließlich durch Aktivierung von GPCRs beschrieben worden. So konnten die Subtypen S1P₁ und S1P₃, die hauptsächlich G_{αi}-Proteine aktivieren, als migrationsstimulierende Rezeptoren identifiziert werden. Dahingehend sollte durch Vorinkubation mit PTX geprüft werden, ob die Migration gegen S1P inhibiert werden konnte, da PTX irreversibel die Aktivierung der G_{αi}-Unterheit trimärer G-Proteine blockiert. Eine zweistündige Vorbehandlung mit 200 ng/ml PTX reduzierte die Migration in Gegenwart von S1P um 90 %, was auf eine Beteiligung G_{αi}-gekoppelter Rezeptoren an der zur Migration führenden Signaltransduktion hinweist und intrazelluläre Effekte von S1P weitestgehend ausschließt (Abb. 3.1.3A).

Um die Funktion spezifischer S1P-Rezeptorsubtypen näher zu identifizieren, wurde durch Einsatz von Antisense-ODN die Translation der mRNA und somit die Proteinbiosynthese der einzelnen S1P-Rezeptorsubtypen gehemmt. Die verringerte Expression der Rezeptoren konnte auf Proteinebene anhand einer Westernblot-Analyse bestätigt werden.

Der migratorische Effekt von S1P wurde in Anwesenheit von S1P₁-Antisense-ODN um ca. 90 % reduziert, hingegen zeigte die Vorinkubation mit S1P₃ lediglich eine Migrationshemmung um etwa 20 %. Im Gegensatz zu den migratorischen Effekten von S1P₁ und S1P₃ führte eine verringerte S1P₂-Expression zu einer Erhöhung der Chemotaxis von XS52 Zellen in Antwort auf S1P. Die Behandlung der XS52 Zellen mit S1P₄-Antisense-ODN zeigte keinen Effekt auf die Migration in Gegenwart von S1P (Abb. 3.1.3B-D).

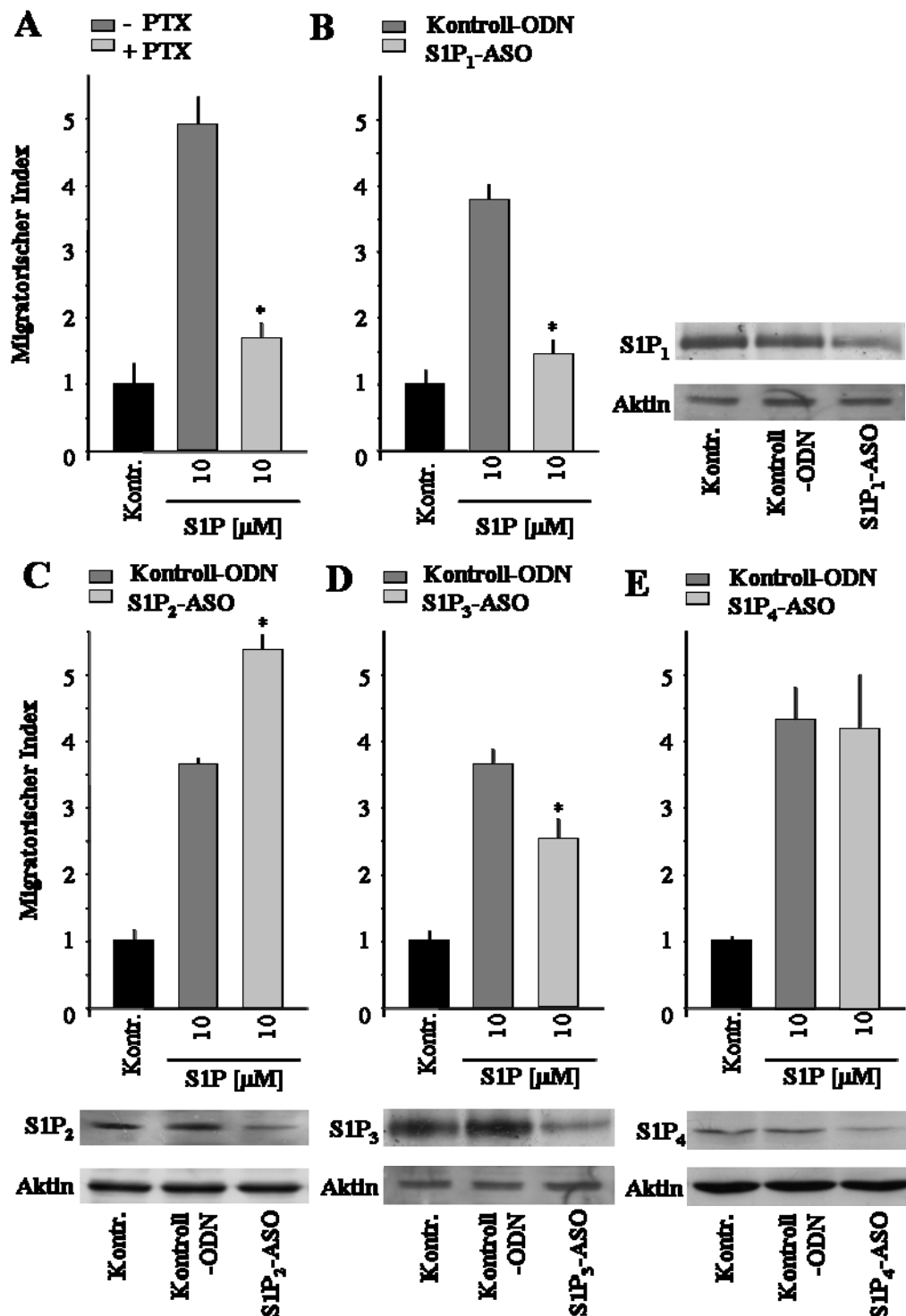


Abb. 3.1.3: Einfluss von PTX und S1P₁₋₄ Antisense-ODN auf die S1P-induzierte Migration von XS52 Zellen. XS52 Zellen wurden vor Versuchsbeginn mit PTX (200 ng/ml) (A) für 2h oder mit S1P₁- (B), S1P₂- (C), S1P₃- (D) oder S1P₄-Antisense-ODN (E) bzw. mit Kontroll-ODN über 3 d mit einer Konzentration von 100 nM inkubiert und anschließend in einer Transwell-Kammer kultiviert. Die unteren Kammern waren mit Kontrollvehikel (Kontr.) oder S1P (10 μ M) supplementiert. Nach 5 h Inkubation erfolgte die Auszählung der durch die Membran migrierten Zellen. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert \pm SD einer Zweifachbestimmung. Der Versuch wurde unabhängig noch zweimal durchgeführt und zeigte vergleichbare Ergebnisse. * $p \leq 0,05$.

Zum Nachweis der Wirksamkeit der Antisense-Strategie wurde nach Inkubation mit den angegebenen Antisense-ODN bzw. Kontroll-ODN eine Westernblot-Analyse mit Anti-S1P₁-, -S1P₂-, -S1P₃- oder -S1P₄-Antikörpern durchgeführt (B-E).

3.1.4 Beteiligung des Smad-Signalweges an den migratorischen Effekten von TGF- β und S1P

3.1.4.1 Semiquantitative PCR-Analyse zum Nachweis von mRNA-Transkripten der Smad-Proteine in XS52 Zellen

Die Bedeutung von Smad3 an der TGF- β -induzierten Migration wurde in der Literatur an Smad3^{-/-} Monozyten demonstriert, die in Abwesenheit von Smad3 nicht auf einen TGF- β -Stimulus migrierten (Ashcroft et al., 1999). Monozyten und DCs weisen ähnliche Eigenschaften auf und werden beide aus hämatopoetischen Vorläuferzellen generiert. Ferner ist es möglich, DCs aus Monozyten *in vitro* unter Zusatz von GM-CSF und TNF- α zu erzeugen (Shortman and Liu, 2002). Dahingehend wurde im Folgenden eine Beteiligung des Smad-Signalweges an den TGF- β -induzierten migratorischen Effekten von XS52 Zellen untersucht.

Zunächst sollte geprüft werden, ob die TGF- β -spezifischen Smad-Proteine Smad2, Smad3 und Smad4 in XS52 Zellen enthalten sind. Dahingehend wurde mRNA mit dem Quick-PrepTM Micro mRNA Aufreinigungskit aus XS52 Zellen isoliert und anschließend über eine Reverse Transkriptase Reaktion in cDNA umgeschrieben. Die Amplifizierung der Smad-Protein-spezifischen DNA-Sequenzen erfolgte durch eine PCR unter Verwendung der im Methodenteil aufgelisteten Primer (0). Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben im Agarosegel wurden die DNA-Fragmente mit Ethiumbromid angefärbt und unter UV-Bestrahlung visualisiert. 3 Fragmente der Größen 502bp, 508bp und 578bp waren zu erkennen, welche die Präsenz von mRNA-Transkripten der TGF- β -Signalproteine Smad2, Smad3 und Smad4 in XS52 Zellen bestätigten (Abb. 3.1.4.1).

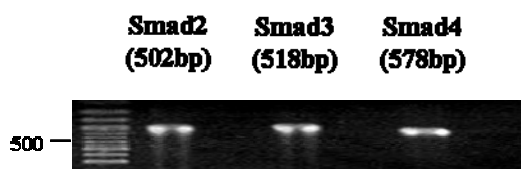


Abb. 3.1.4.1: RT-PCR zur Identifizierung der mRNA von Smad-Proteinen in XS52 Zellen

3.1.4.2 Aktivierung von Smad-Proteinen durch TGF- β

Smad-Proteine werden durch den TGF- β -Rezeptorkomplex unmittelbar nach einer TGF- β -Stimulation aktiviert, indem die Kinase-Aktivität des T β R-I die Phosphorylierung von Smad2 bzw. Smad3 und deren Oligomerisierung mit Smad4 bewirkt. Nach Translokation in den Nukleus reguliert der formierte Komplex die Transkription von Genen durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren oder durch direkte Bindung an den Promoterregionen von Zielgenen. Um einen funktionell aktiven Smad-Signalweg in XS52 Zellen nachzuweisen, sollte die Heteromerisierung von Smad3 und Smad4 nach Stimulation mit TGF- β anhand einer Immunpräzipitation mit einem Anti-Smad3-Antikörper und anschließender Westernblot Analyse gegen Smad4 gemessen werden. Die Ergebnisse der Westernblot Analyse zeigten eine transiente Formierung des Smad3/Smad4-Komplexes über einen Zeitraum von 90 min mit einem Maximum nach 30 min (Abb. 3.1.4.2A). Bereits Konzentrationen von 0,01 ng/ml TGF- β führten zu einer schwachen Smad3/Smad4-Dimerisierung, die bis zu einer TGF- β -Konzentration von 2 ng/ml zunehmend stärker wurde (Abb. 3.1.4.2B). Smad3-induzierte zelluläre Effekte werden ausschließlich durch Interaktion des formierten Smad3/Smad4-Komplexes mit der DNA vermittelt. Dahingehend wurden zur Bestimmung der transkriptionellen Aktivität des formierten Smad3/Smad4-Komplexes DNA-Affinitätstests an dem Promotor des PAI1-Gens, welches ein responsives Smad3 Gen darstellt und nur von phosphoryliertem Smad3 gebunden wird, durchgeführt. Für die Analyse der Smad3-DNA-Bindung wurden die Lysate von unstimulierten und TGF- β -stimulierten Zellen mit einem doppelsträngigen DNA-Fragment bestehend aus 3 aufeinander folgenden CAGA-Sequenzen, welches der Region des PAI1 Promoters entspricht, für 1 h inkubiert. Nach der Fällung des DNA-Fragments mit Streptavidin-Agarose wurde der Gehalt des an dem Oligonukleotidstrang gebundenen Smad3 über eine Westernblot Analyse bestimmt. Die Stimulation von XS52 Zellen mit 2 ng/ml TGF- β verursachte eine deutlich stärkere Smad3-DNA-Bindung als unstimulierte Zellen, was die Präsenz einer aktiven Smad-Protein-Signalkaskade nochmals unterstreicht (Abb. 3.1.4.2E).

3.1.4.3 Aktivierung von Smad-Proteinen durch S1P

Die Aktivierung von Smad-Proteinen ist kein exklusiver Effekt von TGF- β , was an migratorischen und proliferativen Wirkungen der LPL S1P und LPA in epidermalen Zellen nachgewiesen werden konnte (Sauer et al., 2004a; Sauer et al., 2004b). Dahingehend wurden Lysate S1P-stimulierter Zellen einer Immunpräzipitation mit einem Anti-Smad1/2/3 Antikörper gefolgt von einer Westernblot-Analyse auf Smad4 unterzogen. Analog zu TGF- β war die Formierung des Smad3/Smad4-Komplexes in Antwort auf S1P bereits nach 10 min sichtbar, jedoch wurden basale Level schon nach 45 min wieder erreicht (Abb. 3.1.4.2C). Ferner konnte auch für S1P eine Konzentrationsabhängigkeit der Smad3/Smad4-Heterodimerisierung beginnend mit 100 nM S1P und einem maximalen Effekt bei 10 μ M gezeigt werden (Abb. 3.1.4.2D). DNA-Affinitäts-Untersuchungen an dem Promoter des PAI-Gens zeigten für S1P (10 μ M) eine vergleichbar starke Smad3-DNA-Bindung wie bei TGF- β , so dass die Transkription von Smad3-spezifischen Genen und Smad3-abhängige zelluläre Prozesse auch für S1P zu erwarten sind (Abb. 3.1.4.2E).

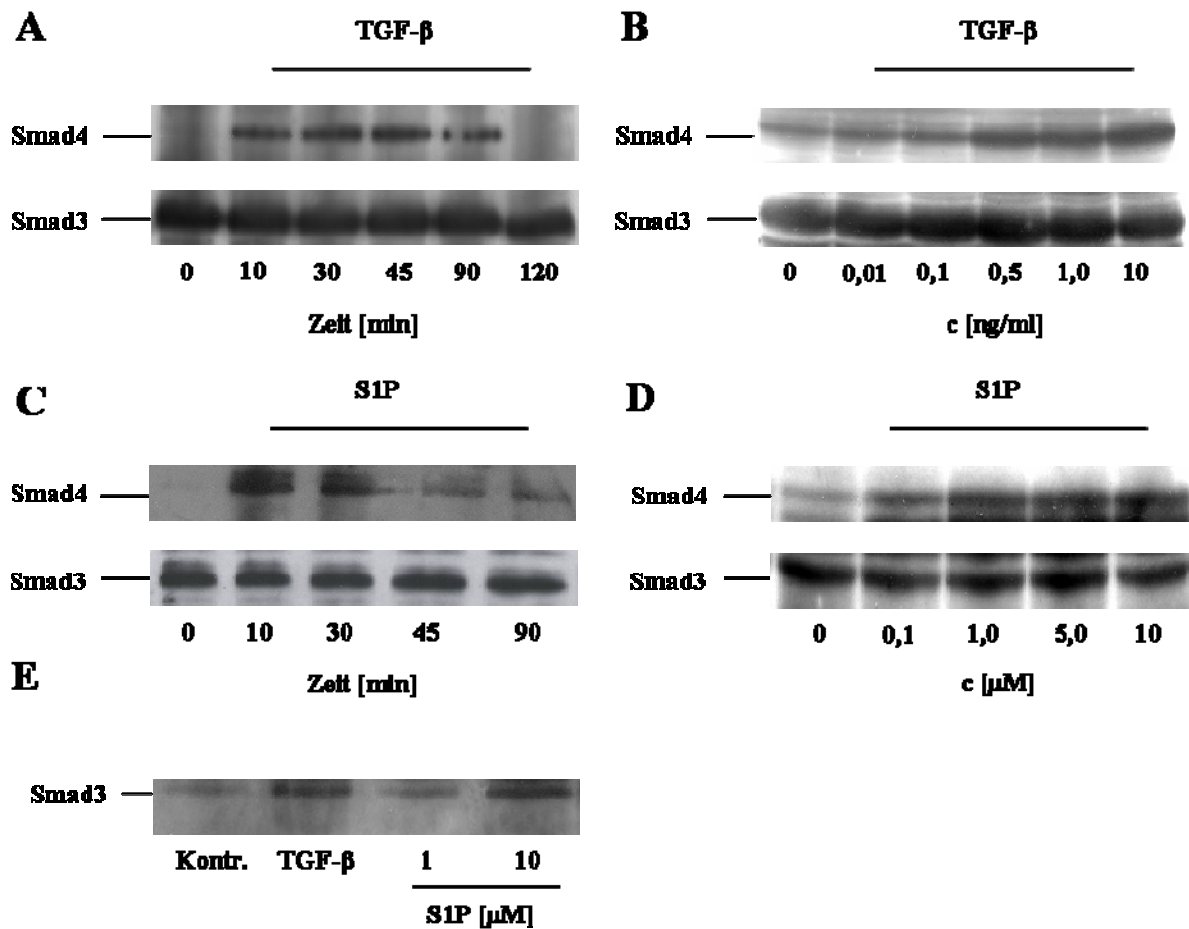


Abb. 3.1.4.2: Nachweis der Smad3/Smad4-Heteromerisierung und Bestimmung der Anlagerung von Smad3 an Promotorfragmente. XS52 Zellen wurden mit Kontrollvehikel (Kontr.), TGF- β oder S1P in den angegebenen Konzentrationen und für die angegebenen Zeitintervalle stimuliert. Anschließend erfolgte eine Immunpräzipitation mit Anti-Smad1/2/3 Antikörpern gefolgt von einer Westernblot-Analyse auf Smad3 und Smad4 (A-D).

Zur Bestimmung der Anlagerung von Smad3 an Promoternukleotide wurden XS52 Zellen mit Kontrollvehikel, TGF- β oder S1P in den angegebenen Konzentrationen für 30 min stimuliert und anschließend deren Lysate zur Präzipitation von aktivem Smad3 mit biotinylierten Oligonukleotiden Smad3-responsiver Gene und Streptavidin-Agarose versetzt. Nach der Elektrophorese wurde eine Westernblot-Analyse mit Anti-Smad1/2/3 Antikörpern durchgeführt (E). Die Blots sind charakteristisch für zwei weitere Versuche.

3.1.4.4 Migration von S1P und TGF- β in Gegenwart von Smad3-Antisense-ODN

Hinsichtlich der analogen Effekte von S1P und TGF- β auf Ebene der Smad-Aktivierung sollte eine Beteiligung von Smad3 an der TGF- β - und S1P-induzierten Migration näher untersucht werden. Mittels Antisense-ODN, spezifisch gegen die Initiationsstelle der mRNA von Smad3, wurden Smad3-defiziente XS52 Zellen generiert. Über eine Westernblot-Analyse konnte die Wirksamkeit der Antisense-Strategie nachgewiesen werden.

Nach Behandlung der Zellen mit Smad3-Antisense-ODN verringerte sich die Proteinexpression, während der Einsatz von Kontroll-ODN keine veränderten Smad3 Protein-Spiegel bewirkte (Abb. 3.1.4.4B). Der migratorische Effekt von TGF- β wurde bei Smad3-defizienten Zellen nahezu vollständig aufgehoben. Die Behandlung von XS52 Zellen mit Kontroll-ODN zeigte hingegen keine Hemmung der TGF- β -induzierten Migration. Auch die Stimulation mit S1P führte bei Smad3-defizienten Zellen zu einer mit TGF- β vergleichbaren Reduktion der Chemotaxis. Um eine generelle Beteiligung von Smad3 bei migratorischen Prozessen auszuschließen, wurde die Zellbewegung von Smad3-defizienten Zellen in Gegenwart von MIP-3 α gemessen. Eine verringerte Expression von Smad3 zeigte keine Hemmung der MIP-3 α -induzierten Chemotaxis (Abb. 3.1.4.4A). Somit ist Smad3 als Signalprotein eine Schlüsselfunktion sowohl bei der TGF- β - als auch bei der S1P-induzierten Migration zuzuordnen, während für die migratorischen Effekte des Chemokins MIP-3 α Smad3-unabhängige Prozesse verantwortlich sind.

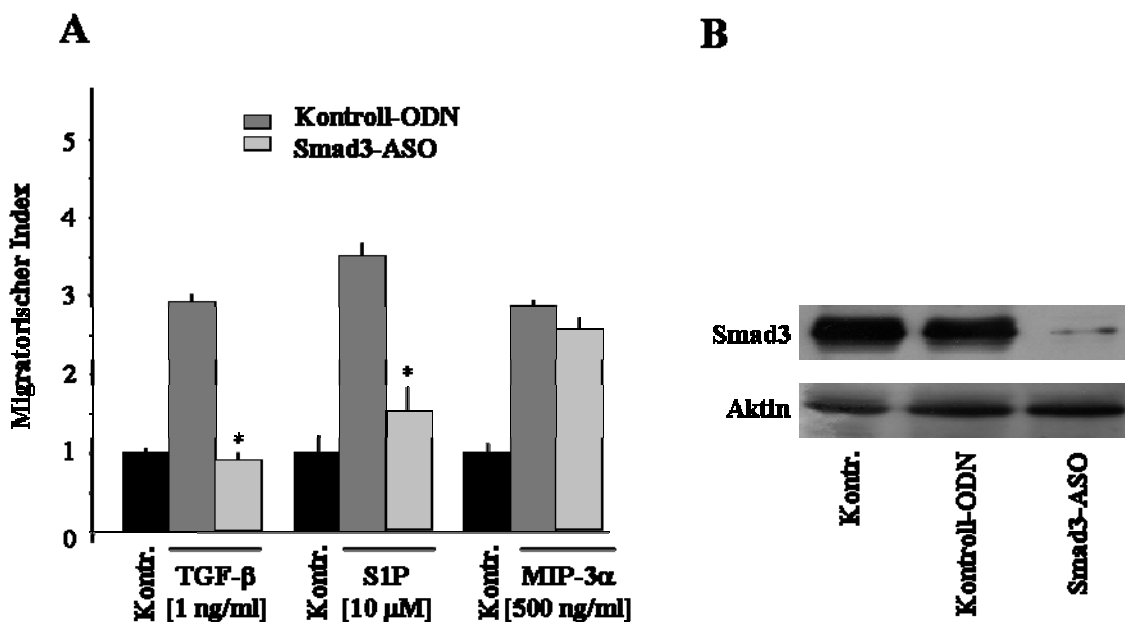


Abb. 3.1.4.4: Einfluss von Smad3-Antisense-ODN auf die TGF- β -, S1P- und MIP-3 α -induzierte Migration von XS52 Zellen. Zellen wurden zunächst für 3 d mit den entsprechenden ODN (100 nM) transfiziert und anschließend in einer Transwell-Kammer kultiviert. Die unteren Kammern wurden mit Kontrollvehikeln, TGF- β (1 ng/ml), S1P (10 μ M) oder MIP-3 α (500 ng/ml) supplementiert. Nach 5 h Inkubation erfolgte die Auszählung der durch die Membran gewanderten Zellen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SD von Zweifachbestimmungen (A). Der Versuch wurde zweimal wiederholt und führte zu vergleichbaren Ergebnissen. * $p \leq 0,05$. Zum Nachweis der Wirksamkeit der Antisense-Strategie wurde nach Inkubation der Zellen mit den angegebenen ODN eine Westernblot-Analyse mit Anti-Smad1/2/3-Antikörpern durchgeführt (B).

3.1.5 Beteiligung von T β R-I an der S1P-induzierten Migration von XS52 Zellen

Smad3-vermittelte zelluläre Effekte sind bisher ausschließlich durch Aktivierung von T β R-I beschrieben worden, so dass im Folgenden der Einfluss von T β R-I auf die S1P-induzierte Migration untersucht werden sollte. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurde die Migration an XS52 Zellen gemessen, deren T β R-I durch Vorinkubation mit SB-431542 inaktiviert wurde. SB-431542 blockiert gezielt die ATP-Bindungsdomäne von T β R-I und verhindert dadurch die Phosphorylierung von den Rezeptor-regulierten Smad-Proteinen Smad2 und Smad3. XS52 Zellen wurden im Vorfeld mit SB-431542 (10 μ M) für 30 min zur Inaktivierung von T β R-I behandelt und anschließend in die Migrationskammer zur Analyse des chemotaktischen Signals von TGF- β und S1P eingesetzt. In Anwesenheit eines funktionell aktiven T β R-I migrierten XS52 Zellen auf einen TGF- β -Stimulus, während die Inaktivierung von T β R-I durch Vorinkubation der Zellen mit SB-431542 eine nahezu vollständige Hemmung der TGF- β -induzierten Migration auslöste. Interessant ist, dass auch für die migratorischen Effekte von S1P ein funktionell aktiver T β R-I vorhanden sein muss, da die vorgeschaltete Behandlung von XS52 Zellen mit SB-431542 zu einer Reduktion der S1P-vermittelten Migration führte. Um einen generellen Hemmeffekt von SB-431542 bei migratorischen Prozessen auszuschließen, wurde das chemotaktische Verhalten von SB-431542 vorinkubierten XS52 Zellen zusätzlich in Gegenwart von MIP-3 α gemessen. Wie an den Ergebnissen des Migrationsexperimentes zu erkennen ist, hatte die Vorinkubation mit SB-431542 keinen Einfluss auf die Migration von XS52 Zellen in Gegenwart von MIP-3 α , so dass SB-431542 per se keine hemmende Wirkung auf migratorische Prozesse besitzt (Abb. 3.1.5). Die migratorischen Experimente in Gegenwart von SB-431542 zeigten deutlich, dass T β R-I nicht ausschließlich an der Transduktion migratorischer Effekte von TGF- β , sondern auch an der zur Migration führenden Signaltransduktion von S1P beteiligt ist.

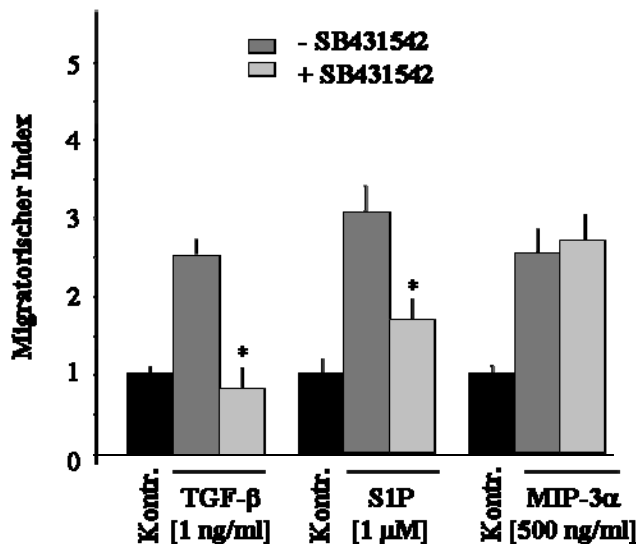


Abb. 3.1.5: Migratorische Wirkung von TGF- β , S1P und MIP-3 α auf XS52 Zellen in Gegenwart eines funktionell inaktiven T β R-I. Die Zellen wurden zunächst mit Kontrollvehikel oder dem T β R-I-Inhibitor SB-431542 (10 μ M) für 30 min inkubiert und anschließend in einer Transwell-Kammer kultiviert. Die unteren Kammern wurden mit Kontrollvehikeln, TGF- β (1 ng/ml), S1P (1 μ M) oder MIP-3 α (500 ng/ml) supplementiert. Nach 5 h Inkubation erfolgte die Auszählung der durch die Membran gewanderten Zellen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SD von Zweifachbestimmungen. Der Versuch wurde zweimal wiederholt und führte zu vergleichbaren Ergebnissen. * $p \leq 0,05$.

3.1.6 Additive migratorische Effekte von S1P und TGF- β

Da TGF- β und S1P die Migration von XS52 Zellen durch Aktivierung von Smad-Proteinen vermitteln, sollte im Hinblick auf den gemeinsamen Signalweg ein möglicher additiver Effekt in Ko-Stimulationsexperimenten untersucht werden. Um den additiven Effekt messen zu können, erfolgten die Migrationsexperimente in Gegenwart von geringen TGF- β - bzw. S1P-Konzentrationen. XS52 Zellen wurden mit 0,01 ng/ml TGF- β und S1P-Konzentrationen von 0,01 μ M bis 1,0 μ M zeitgleich stimuliert. Die Präsenz von 0,01 ng/ml TGF- β und 0,01 μ M S1P zeigte keine erhöhte Migration von XS52 Zellen im Vergleich zu den Testsubstanzen alleine. Erst die Stimulation mit 0,01 ng/ml TGF- β und 0,1 μ M S1P führte zu einer stärkeren Zellbewegung als die Monostimulation. Keine weitere Erhöhung der Migration war bei 0,01 ng/ml TGF- β und 1,0 μ M S1P erkennbar. Eine mögliche Ursache für den nicht mehr messbaren additiven Effekt bei simultaner Stimulation mit 0,01 ng/ml TGF- β und 1,0 μ M S1P könnte die bereits sehr starke Migration bei einer S1P-Konzentration von 1,0 μ M S1P sein, so dass kein zusätzlicher migratorischer Effekt in diesem Testsystem mehr detektierbar ist (Abb. 3.1.6A).

In Bezug auf die additiven migratorischen Wirkungen von S1P und TGF- β war es interessant, ob dieser Effekt auch auf Ebene der Smad-Aktivierung zu messen ist, da

die Migration von S1P und TGF- β über diese Signalkaskade vermittelt wird. XS52 Zellen wurden für 30 min mit 0,01 ng/ml TGF- β und S1P-Konzentrationen von 0,1 μ M bis 10,0 μ M zeitgleich stimuliert und anschließend einer Westernblot-Analyse gegen phosphoryliertes Smad2 als Nachweis der Smad-Aktivierung unterzogen. In Korrelation mit den Ergebnissen aus den Migrationsexperimenten war ein additiver Effekt bei simultaner Stimulation mit 0,01 ng/ml TGF- β und 0,1 μ M S1P nachweisbar, was die erhöhten Proteinspiegel an phosphoryliertem Smad2 zeigten. S1P-Konzentrationen von 1,0 μ M und 10 μ M führten im Gegensatz zu den migratorischen Effekten in Ko-Stimulation mit 0,01 ng/ml TGF- β zu einem weiteren Anstieg der Smad2-Phosphorylierung (Abb. 3.1.6B). Dieser sichtbare additive Effekt bei 1 μ M beziehungsweise 10 μ M S1P könnte durch den größeren Messbereich der Westernblot-Analyse im Vergleich zum Migrationsassay begründet sein.

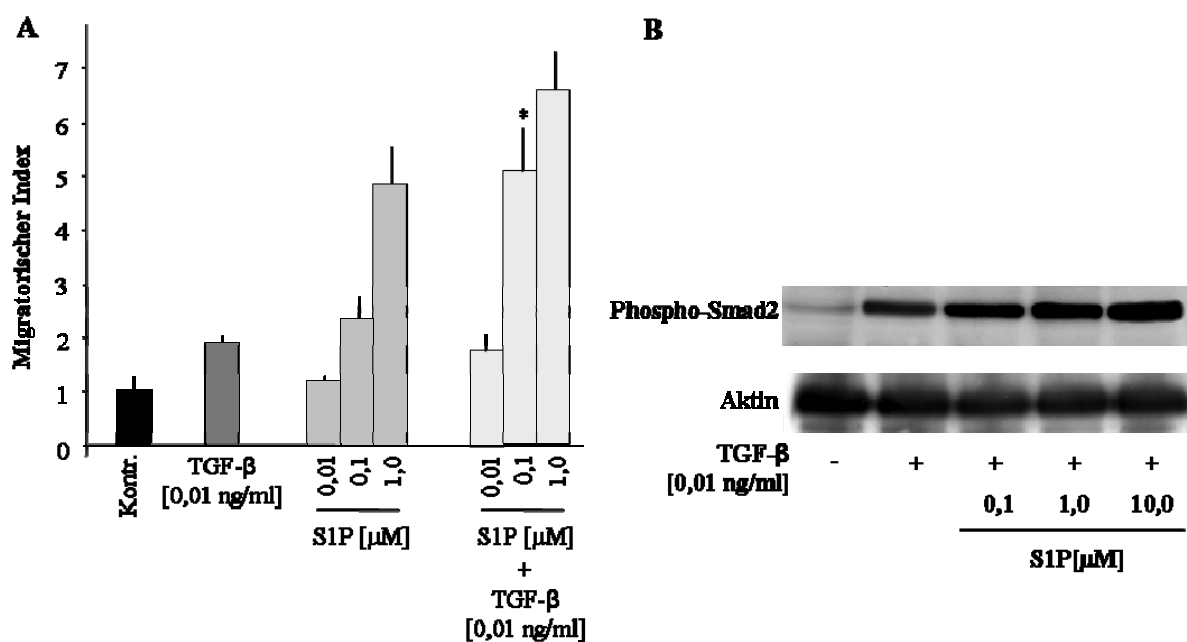


Abb. 3.1.6: Additive Effekte von S1P auf die TGF- β -induzierte Migration (A) und Smad2-Phosphorylierung (B). Für die migratorischen Untersuchungen wurden die Zellen in einer Transwell-Kammer kultiviert. Die unteren Kammern wurden mit S1P, TGF- β oder S1P und TGF- β in den angegebenen Konzentrationen supplementiert. Nach 5 h Inkubation erfolgte die Auszählung der durch die Membran gewanderten Zellen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SD von Zweifachbestimmungen (A). Der Versuch wurde zweimal wiederholt und führte zu vergleichbaren Ergebnissen. * $p \leq 0,05$.

Zusätzlich wurden die Expression an phosphorylierten Smad2 über eine Westernblot-Analyse detektiert. Dahingehend wurden die Zellen mit S1P, TGF- β oder S1P und TGF- β in den angegebenen Konzentrationen für 30 min stimuliert. Anschließend erfolgte die Westernblot-Analyse mit Anti-Phospho-Smad2 Antikörpern (B). Der Versuch wurde zweimal wiederholt und führte zu vergleichbaren Ergebnissen.

3.1.7 Untersuchung zur Migration nach Desensitivierung der TGF- β - bzw. S1P-Rezeptoren

3.1.7.1 Untersuchung der migratorischen Wirkung von S1P nach der Vorinkubation von XS52 Zellen mit S1P bzw. TGF- β

GPCRs, die nach Bindung Ihrer Liganden an der Auslösung von migratorischen Prozessen beteiligt sind, können durch Rezeptor-Phosphorylierung oder Rezeptor-Internalisierung desensitiviert werden. S1P vermittelt seine migratorische Wirkung an XS52 Zellen über die GPCRs S1P₁ und S1P₃. Im Rahmen eines Desensitivierungsexperiments sollte nun geprüft werden, ob die an der S1P-induzierten Migration beteiligten Rezeptoren S1P₁ und S1P₃ durch eine Vorinkubation mit S1P inaktiviert werden und anschließend noch in der Lage sind, auf einen erneuten S1P-Stimulus ein chemotaktisches Signal weiterzuleiten. Ferner wird der migratorische Effekt von S1P durch Aktivierung des TGF- β -spezifischen Signalwegs der Smad-Proteine vermittelt. In Gegenwart des spezifischen T β R-I-Inhibitors SB-431542 konnte die migratorische Wirkung von S1P fast vollständig gehemmt werden. Dieses Ergebnis bestätigte die Beteiligung von T β R-I an den migratorischen Effekten von S1P und weist auf eine Interaktion der Rezeptoren hin. Dahingehend war es zusätzlich von Bedeutung, die Desensitivierung der S1P-Rezeptoren nach Stimulation mit TGF- β zu untersuchen, indem die Migration auf S1P nach Inkubation der XS52 Zellen mit TGF- β gemessen wurde. Im Hinblick auf eine denkbare Wechselwirkung der Rezeptoren wurde im Umkehrschluss auch der Einfluss von S1P und TGF- β auf die funktionelle Aktivität der TGF- β -Rezeptoren in Migrationsexperimenten näher bestimmt.

Zur Desensitivierung der Rezeptoren wurden XS52 Zellen für 30 min mit S1P (1 μ M) bzw. TGF- β (0,1 ng/ml) inkubiert. Um eine Kontamination während der Migration mit der entsprechenden Inkubationssubstanz zu vermeiden, wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, bevor sie für den Einsatz in die Migrationskammer durch Behandlung mit Trypsin/EDTA und Stop-Medium gelöst und anschließend in Medium zur Herstellung der Zellsuspension aufgenommen wurden. Die Migration erfolgte wie in Punkt 2.2.9 beschrieben.

Eine Vorinkubation der XS52 Zellen mit 1 μ M S1P zeigte keinen Effekt auf die chemotaktische Wirkung von S1P (1 μ M). Sowohl die Kontrollzellen als auch die mit

S1P (1 μ M) vorbehandelten Zellen migrierten im gleichen Verhältnis auf einen erneuten S1P-Stimulus. Auch die Vorinkubation mit TGF- β zeigte keinen Einfluss auf die migratorische Wirkung von S1P, so dass eine Inaktivierung der S1P-Rezeptoren durch die 30-minütige Vorbehandlung der Zellen mit S1P beziehungsweise TGF- β nach den Ergebnissen aus den Migrationsexperimenten nicht bestätigt werden konnte (Abb. 3.1.7.1A).

3.1.7.2 Untersuchung der migratorischen Wirkung von TGF- β nach der Vorinkubation von XS52 Zellen mit S1P bzw. TGF- β

Die chemotaktische Wirkung auf einen TGF- β -Stimulus wurde an XS52 Zellen gemessen, denen eine 30-minütige Vorinkubation mit TGF- β oder S1P zur Desensitivierung der Rezeptoren vorgeschaltet war. Mit TGF- β (0,1 ng/ml) vorinkubierte XS52 Zellen zeigten keine Veränderung der Migration in einem TGF- β -Konzentrationsgradienten. Hingegen führte die kurzzeitige Stimulation mit 1 μ M S1P zu einer vollständigen Reduktion der TGF- β -induzierten Migration.

Um einen generellen Hemmeffekt von S1P an migratorischen Prozessen auszuschließen, wurde das chemotaktische Verhalten von XS52 Zellen nach Vorinkubation mit S1P auf einen MIP-3 α -Stimulus getestet. Die Behandlung mit S1P zeigte keinen Einfluss auf die migratorische Wirkung von MIP-3 α , was auf eine spezifische Inhibierung des LPL S1P auf die TGF- β -induzierte Migration hinweist (Abb. 3.1.7.1A).

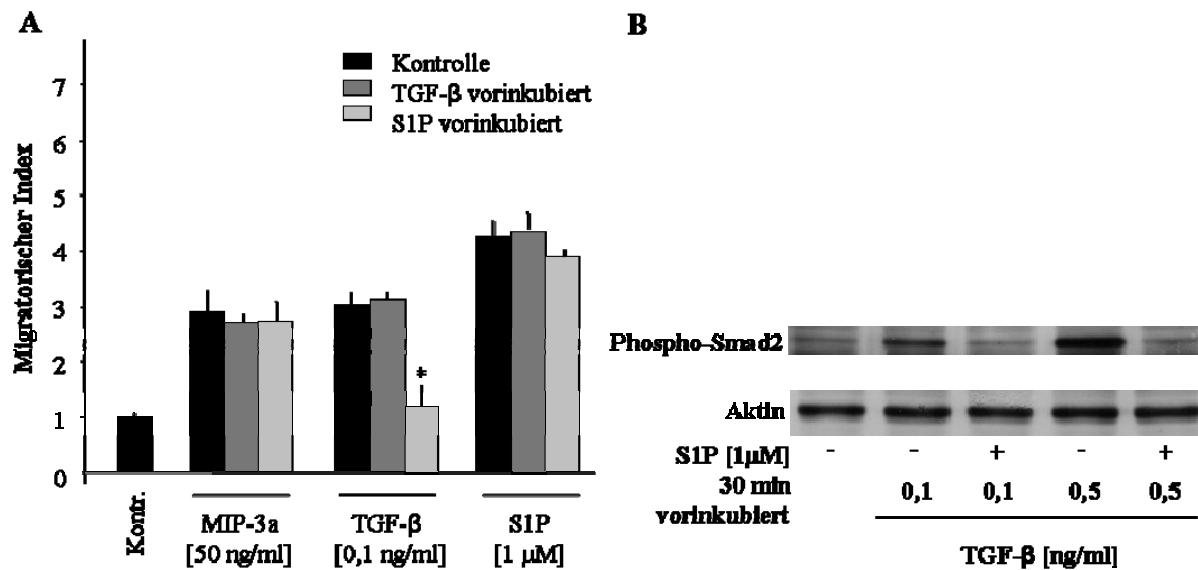


Abb. 3.1.7.1: Untersuchungen der Migration von XS52 Zellen nach Vorbehandlung der Zellen mit TGF- β bzw. S1P. Die Zellen wurden zunächst mit Kontrollvehikel, TGF- β (1 ng/ml) oder S1P (1 μ M) für 30 min vorinkubiert und anschließend in einer Transwell-Kammer kultiviert. Die unteren Kammern wurden mit Kontrollvehikel, S1P, TGF- β oder MIP-3a in den angegebenen Konzentrationen supplementiert. Nach 5 h Inkubation erfolgte die Auszählung der durch die Membran gewanderten Zellen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SD von Zweifachbestimmungen (A). Der Versuch wurde zweimal wiederholt und führte zu vergleichbaren Ergebnissen. * $p \leq 0,05$. Für die Detektion der Expression an phosphorylierten Smad2 wurden die Zellen zunächst mit Kontrollvehikel oder S1P (1 μ M) für 30 min vorinkubiert und anschließend mit Kontrollvehikel oder TGF- β in den angegebenen Konzentrationen für 30 min stimuliert. Anschließend erfolgte die Westernblot-Analyse mit Anti-Phospho-Smad2 Antikörpern (B). Der Versuch wurde zweimal wiederholt und führte zu vergleichbaren Ergebnissen.

3.1.7.3 Inhibierung der TGF- β -Wirkung auf Ebene der Smad-Aktivierung durch S1P

Da S1P-vorbehandelte Zellen resistent gegen die migratorische Wirkung von TGF- β sind, wurde im Folgenden der zur Migration führende Signalweg näher untersucht. Experimente an Smad3-defizienten Zellen zeigten bereits, dass der migratorische Effekt von TGF- β durch Aktivierung des Smad-Signalweges vermittelt wird. Um dieser Problematik nachzugehen, wurde eine Westernblot-Analyse gegen phosphoryliertes Smad2 als Nachweis der Smad-Aktivierung an TGF- β -stimulierten Zellen durchgeführt, die im Vorfeld für 30 min mit S1P behandelt wurden. Nach 30-minütiger Inkubation der XS52 Zellen mit S1P (1 μ M) wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in frischem Medium mit TGF- β für 30 min stimuliert. Anschließend erfolgte die Zelllyse und Detektion von phosphorylierten Smad2. Wie anhand der Westernblot Analyse eindeutig zu erkennen ist, führte die Stimulation unbehandelter Zellen mit 0,1 ng/ml TGF- β zu einer Phosphorylierung von Smad2.

Hingegen zeigten XS52 Zellen, denen eine Inkubation mit S1P (1 μ M) für 30 min vorgeschaltet war, keine erhöhte Proteinexpression an phosphorylierten Smad2 auf einen TGF- β -Stimulus. Die Stärke der Banden reduzierte sich auf das Niveau der Negativkontrollen (Abb. 3.1.7.1B). Zusätzlich wurde der Einfluss von S1P auf die TGF- β -induzierte Smad-Aktivierung an höheren TGF- β -Konzentrationen gemessen. Die Westernblot-Analyse zeigte, dass auch die Phosphorylierung von Smad2 durch Stimulation mit 0,5 ng/ml TGF- β durch Vorinkubation mit 1 μ M S1P vollständig inhibiert werden konnte (Abb. 3.1.7.1B). Diese Ergebnisse zeigen, dass die gleichzeitige Gabe von S1P und TGF- β einen additiven Effekt auf die Aktivierung von Smad-Proteinen bewirkt, während die Vorinkubation von XS52 Zellen mit S1P die TGF- β -induzierte Smad-Aktivierung inhibiert.

3.1.7.4 Rezeptorabhängigkeit der Hemmeffekte von S1P auf die TGF- β -Wirkungen

Die Wirkung von S1P wird hauptsächlich durch Aktivierung von GPCRs vermittelt, während intrazelluläre Effekte in der Literatur weitaus weniger beschrieben wurden. Durch den Einsatz von PTX sollte geprüft werden, ob die S1P-vermittelte Hemmung der TGF- β -induzierten Migration und Smad-Phosphorylierung über Rezeptoren transduziert wird. Zunächst wurden XS52 Zellen für 2 h mit 200 ng/ml PTX vorbehandelt gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation mit S1P. Nach einem doppelten Waschschrift mit PBS wurde die PTX-Abhängigkeit der inhibierenden Wirkung von S1P bezüglich der TGF- β Effekte anhand von Migrationsexperimenten und auf Ebene der Smad-Aktivierung über eine Westernblot-Analyse gegen phosphoryliertes Smad2 bestimmt. XS52 Zellen, deren GPCRs durch Behandlung mit PTX inaktiviert wurden, migrierten wieder nach kurzzeitiger Inkubation mit S1P auf einen TGF- β -Stimulus (Abb. 3.1.7.4A). Auch die Westernblot-Analyse zur Untersuchung der Smad-Aktivierung von TGF- β -stimulierten XS52 Zellen, denen eine Vorinkubation mit S1P für 30 min vorgeschaltet war, zeigte eine mit der Positivkontrolle vergleichbar starke Smad2-Phosphorylierung bei PTX-behandelten XS52 Zellen (Abb. 3.1.7.4B). Die Ergebnisse demonstrieren, dass sowohl bei der Migration als auch bei der Smad-Aktivierung die inhibierende Wirkung von S1P auf die TGF- β -Effekte durch PTX nahezu vollständig aufgehoben wird, was auf eine

Beteiligung von $G_{\alpha i}$ -Protein gekoppelten Rezeptoren hindeutet und intrazelluläre Effekte weitestgehend ausschließt.

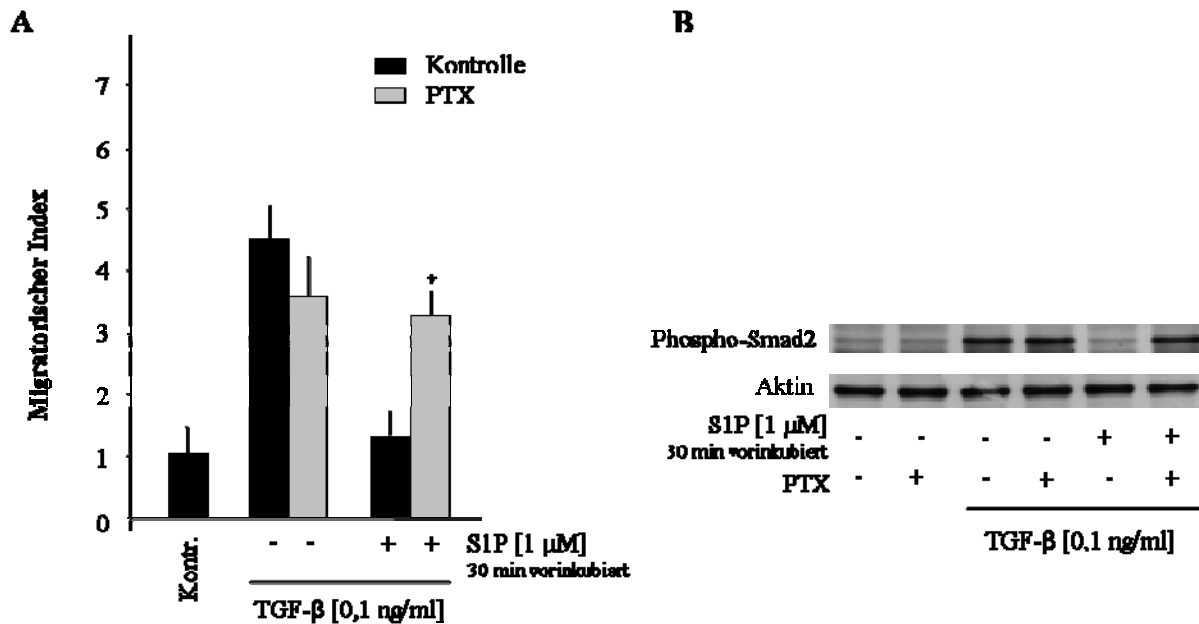


Abb. 3.1.7.4: Einfluss von PTX auf die hemmende Wirkung von S1P auf die TGF- β -induzierte Migration (A) und Smad2-Phosphorylierung (B). Zunächst wurden die Zellen mit PTX (200 ng/ml) für 2h vorbehandelt und anschließend mit Kontrollvehikel bzw. S1P (1 μ M) für 30 min vorinkubiert, bevor sie in die Transwell-Kammer eingesetzt wurden. Die unteren Kammern wurden mit Kontrollvehikel oder S1P (1 μ M) supplementiert. Nach 5 h Inkubation erfolgte die Auszählung der durch die Membran migrierten Zellen (A). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SD von Zweifachbestimmungen (A). Der Versuch wurde zweimal wiederholt und führte zu vergleichbaren Ergebnissen. * $p \leq 0,05$.

Für die Detektion der Expression an phosphorylierten Smad2 wurden die Zellen zunächst mit PTX (200 ng/ml) für 2 h behandelt, bevor sie mit S1P (1 μ M) für 30 min vorinkubiert und anschließend mit Kontrollvehikel oder TGF- β für 30 min stimuliert wurden. Anschließend erfolgte die Westernblot-Analyse mit Anti-Phospho-Smad2 Antikörpern (B). Der Versuch wurde zweimal wiederholt und führte zu vergleichbaren Ergebnissen.

3.1.7.5 Bedeutung von S1P₁ an den Hemmeffekten von S1P auf die TGF- β -Wirkungen

Im Hinblick auf die PTX-Abhängigkeit der inhibierenden Effekte von S1P war es von Interesse, die Beteiligung einzelner Rezeptorsubtypen näher zu charakterisieren. Da S1P₁ ausschließlich inhibitorische G-Proteine aktiviert und S1P₂, S1P₃, S1P₄ und S1P₅ ihre Signale neben G_{ai}-Proteinen auch über G_q- beziehungsweise G_{12/13}-Proteine weiterleiten, sollte zunächst der Einfluss von S1P₁ untersucht werden. XS52 Zellen wurden mit Antisense-ODN zur gezielten Ausschaltung der S1P₁-Proteinbiosynthese inkubiert. Im Anschluss an die Behandlung mit Antisense-ODN wurde das chemotaktische Verhalten von S1P₁-defizienten XS52 Zellen auf einen TGF- β -Stimulus nach 30-minütiger Vorinkubation mit S1P untersucht. Migrationsexperimente zeigten, dass der inhibierende Effekt von S1P nach Behandlung von XS52 Zellen mit S1P₁-Antisense-ODN nahezu vollständig aufgehoben wurde (Abb. 3.1.7.5A). Die Stimulation mit TGF- β führte an S1P₁-defizienten Zellen nach Vorinkubation mit S1P zu einer erhöhten Chemotaxis, welche mit der von XS52 Zellen ohne vorgeschalteter Behandlung mit S1P vergleichbar war. Anhand einer Westernblot-Analyse gegen phosphoryliertes Smad2 sollte im nächsten Schritt überprüft werden, ob die zur Migration führende Aktivierung von Smad-Proteinen nach Vorinkubation von S1P₁-defizienten XS52 Zellen mit S1P wieder auf einen TGF- β -Stimulus sichtbar ist. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den Migrationsexperimenten war in Gegenwart von S1P₁-Antisense-ODN phosphoryliertes Smad2 nach vorgeschalteter Inkubation mit S1P detektierbar, während die Behandlung von XS52 Zellen mit Kontroll-ODN keine Reduktion des Hemmeffekts von S1P auf die TGF- β -induzierte Smad2-Phosphorylierung bewirkte (Abb. 3.1.7.5B).

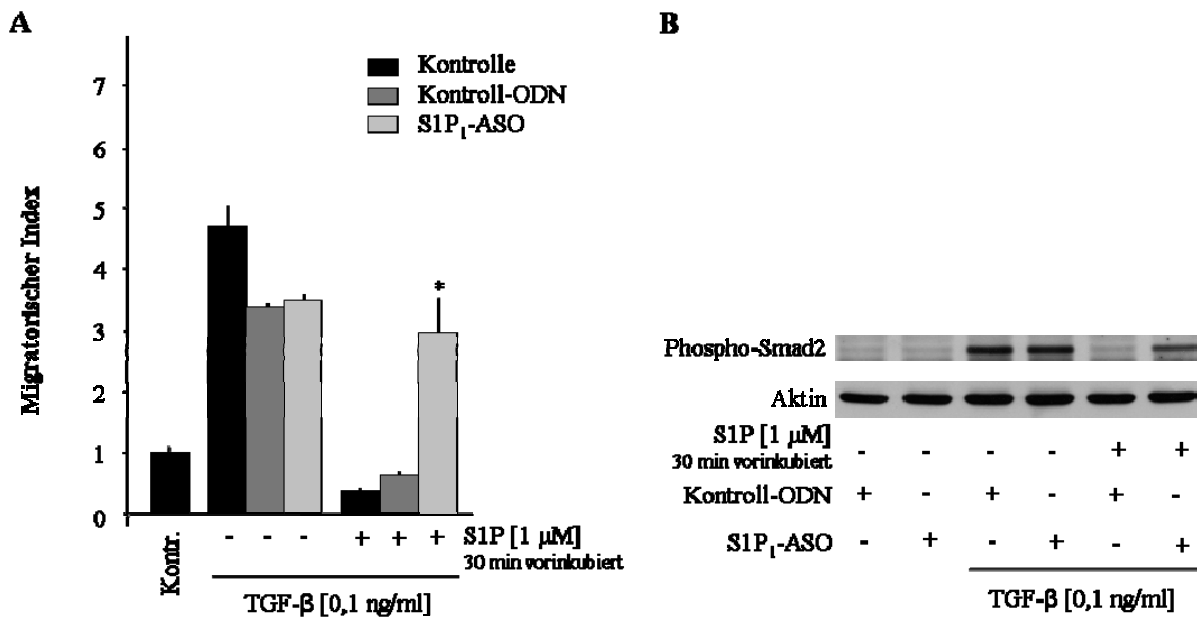


Abb. 3.1.7.5: Einfluss von S1P₁-Antisense-ODN auf die hemmende Wirkung von S1P auf die TGF- β -induzierte Migration (A) und Smad2-Phosphorylierung (B). Zunächst wurden die Zellen mit den entsprechenden ODN (100 nM) für 3 d vorbehandelt und anschließend mit Kontrollvehikel bzw. S1P (1 μ M) für 30 min vorinkubiert, bevor sie in die Transwell-Kammer eingesetzt wurden. Die unteren Kammern wurden mit Kontrollvehikel oder S1P (1 μ M) supplementiert. Nach 5 h Inkubation erfolgte die Auszählung der durch die Membran migrierten Zellen (A). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SD von Zweifachbestimmungen (A). Der Versuch wurde zweimal wiederholt und führte zu vergleichbaren Ergebnissen. * $p \leq 0,05$.

Für die Detektion der Expression an phosphorylierten Smad2 wurden die Zellen zunächst mit den entsprechenden ODN (100 ng/ml) für 3 d behandelt, bevor sie mit S1P (1 μ M) für 30 min vorinkubiert und anschließend mit Kontrollvehikel oder TGF- β für 30 min stimuliert wurden. Anschließend erfolgte die Westernblot-Analyse mit Anti-Phospho-Smad2 Antikörpern (B). Der Versuch wurde zweimal wiederholt und führte zu vergleichbaren Ergebnissen.

3.1.7.6 Einfluss von ERK auf die S1P-induzierte Hemmung der TGF- β -Effekte

Neben den inhibierenden Smad-Proteinen Smad6 und Smad7 kann die Wirkung von Smad2 und Smad3 auch durch die zur Familie der MAPKinase zählenden Signalproteine ERK2 und ERK4 reduziert werden. Die Aktivierung von ERK führt zwar auch zu einer Phosphorylierung von R-Smads, jedoch im Bereich der Linkerregion und nicht an der für die Wirkung essentiellen MH2-Domäne. Die Phosphorylierung von Smad-Proteinen in der Linkerregion durch ERK beeinflusst nicht die rezeptorassoziierte Smad-Phosphorylierung und deren Oligomerisierung mit Smad4, sondern verhindert die Translokation des Smad2/3/4-Heterokomplexes in den Nukleus.

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass S1P ERK2 und ERK4 phosphoryliert (Xin et al., 2004). Deshalb sollte durch Einsatz des spezifischen ERK-Inhibitors PD 059098 überprüft werden, ob die S1P-induzierte Hemmung der TGF- β -Effekte durch Inaktivierung der Smad-Proteine infolge einer ERK-Phosphorylierung ausgelöst wird. Nach Vorinkubation von XS52 Zellen für 90 min mit dem ERK-Inhibitor PD 059098 wurde die TGF- β -induzierte Chemotaxis nach kurzzeitiger Stimulation mit S1P gemessen und eine Westernblot-Analyse zur Bestimmung der Smad2-Phosphorylierung durchgeführt. Kein Unterschied des migratorischen Verhaltens von XS52 Zellen auf einen TGF- β -Stimulus nach vorgeschalteter Inkubation mit S1P konnte zwischen den Kontroll-Zellen und den PD 098059 behandelten Zellen erkannt werden (Abb. 3.1.7.6A). Auch die Westernblot-Analyse zur Detektion an phosphorylierten Smad2 bestätigte, dass die Vorinkubation mit PD 098059 keinen Einfluss auf die S1P-induzierte Hemmung der Smad2-Phosphorylierung in Antwort auf TGF- β ausübte (Abb. 3.1.7.6B). Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der inhibierenden migratorischen Wirkung von S1P und deutet auf einen anderen Mechanismus als die Phosphorylierung von Smad-Proteinen in der Linkerregion durch Aktivierung von ERK hin.

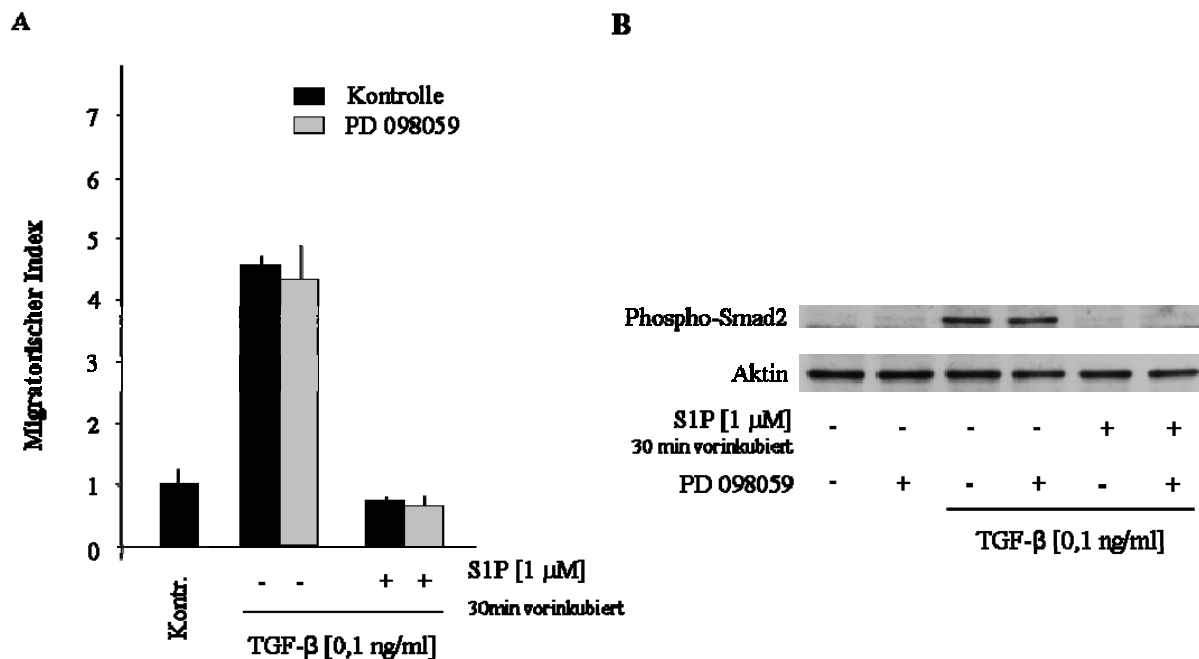


Abb. 3.1.7.6: Beteiligung von ERK an der hemmenden Wirkung von S1P auf die TGF- β -induzierte Migration (A) und Smad2-Phosphorylierung (B). Zunächst wurden die Zellen mit dem ERK-Inhibitor PD 098059 (50 μ M) für 90 min vorbehandelt und anschließend mit Kontrollvehikel bzw. S1P (1 μ M) für 30 min vorinkubiert, bevor sie in die Transwell-Kammer eingesetzt wurden. Die unteren Kammern wurden mit Kontrollvehikel oder S1P (1 μ M) supplementiert. Nach 5 h Inkubation erfolgte die Auszählung der durch die Membran migrierten Zellen (A). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SD von Zweifachbestimmungen (A). Der Versuch wurde zweimal wiederholt und führte zu vergleichbaren Ergebnissen. * $p \leq 0,05$. Für die Detektion der Expression an phosphorylierten Smad2 wurden die Zellen zunächst mit dem ERK-Inhibitor PD 098059 (50 μ M) für 90 min behandelt, bevor sie mit S1P (1 μ M) für 30 min vorinkubiert und anschließend mit Kontrollvehikel oder TGF- β für 30 min stimuliert wurden. Anschließend erfolgte die Westernblot-Analyse mit Anti-Phospho-Smad2 Antikörpern (B). Der Versuch wurde zweimal wiederholt und führte zu vergleichbaren Ergebnissen.

3.1.8 Internalisierung des T β R-I

3.1.8.1 FACS-Analyse zur Bestimmung der Oberflächenexpression des HA-markierten T β R-I

Da S1P die migratorische Wirkung von TGF- β durch Hemmung der Smad-Aktivierung inhibiert und eine Beteiligung von S1P₁ nachgewiesen werden konnte, ist eine Interaktion auf Ebene der Rezeptoren denkbar. Im Folgenden sollte der Einfluss von S1P auf die Funktionalität der TGF- β -Rezeptoren untersucht werden. Für Rezeptoren sind zwei Arten der Inaktivierung beschrieben. Entweder werden Rezeptoren an einer anderen als zur Aktivierung nötigen Region phosphoryliert, so dass eine Transduktion des Signals verhindert wird, oder Rezeptoren translokalisieren von der Zellmembran in das Zytosol.

In der Literatur wurde mehrfach belegt, dass GPCRs mit Wachstumsfaktor-Rezeptoren, die eine Kinase-Domäne besitzen, wechselwirken und deren Internalisierung auslösen (Hobson et al., 2001; Pyne et al., 2003). Für LPA, ein LPL, welches wie S1P an Rezeptoren der EDG-Familie bindet, konnte eine Interaktion mit dem EGF-Rezeptor (EGFR) nachgewiesen werden. So führte die Stimulation mit LPA zu einer Internalisierung des EGFR (Kim et al., 2003). Dahingehend war es von Interesse zu prüfen, ob die S1P-induzierte Hemmung der TGF- β -Effekte durch Internalisierung des T β R-I verursacht wird.

Die Oberflächenexpression von T β R-I sollte durchflusszytometrisch durch Inkubation mit einem FITC-konjugierten Antikörper bestimmt werden. Jedoch gestaltet sich die Detektion von endogenen Rezeptoren als schwierig, da membranständige Rezeptoren im Vergleich zu Signalproteinen sehr schwach exprimiert werden und die spezifische Bindung des Antikörpers nur schwer von der unspezifischen Bindung getrennt werden kann. Aus diesem Grund wurden Studien zur Bestimmung der Oberflächenexpression von membranständigen Rezeptoren bisher nur an exogen exprimierten Epitop-markierten Rezeptoren durchgeführt, so dass für die folgenden Internalisierungsexperimente XS52 Zellen mit einem Fusionsprotein bestehend aus dem nativen T β R-I und Hämagglutinin (HA) transfiziert wurden. Da Epitop-markierte Rezeptoren eine veränderte sterische Anordnung aufweisen, sollte im Vorfeld sichergestellt werden, dass der exogen exprimierte HA-Epitop markierte T β R-I an der Zellmembran lokalisiert ist. Um dies zu prüfen, wurden die Zellen im Anschluss an die Transfektion mit einem FITC-konjugierten Anti-HA-Antikörper inkubiert und durchflusszytometrisch auf die Oberflächenexpression des HA-T β R-I hin untersucht. Die Ergebnisse der FACS-Analyse zeigten einen deutlich erkennbaren zweiten Peak der transfizierten Zellen im Vergleich zu der unspezifischen Bindung des Antikörpers bei den Kontroll-Zellen, was die Membranständigkeit des Rezeptors bestätigte (Abb. 3.1.8.1B).

3.1.8.2 FACS-Analyse zur Bestimmung der Internalisierung von T β R-I durch S1P

Zur Analyse der T β R-I-Internalisierung durch S1P wurden die HA-Epitop markierten T β R-I transfizierten Zellen für 30 min mit S1P stimuliert. Eine Inkubationszeit von 30 min erschien als angemessen, da die 30-minütige Vorinkubation mit S1P die TGF- β -

induzierte Smad-Aktivierung nahezu vollständig hemmte. Nach der Immunfärbung mit dem FITC-konjugierten Anti-HA-Antikörper erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der Oberflächenexpression des HA-markierten T β R-I. Wie an den Histogrammen eindeutig zu erkennen ist, führte die Stimulation mit 1 μ M S1P zu einer fast vollständigen Reduktion der T β R-I-Oberflächenexpression. Bei einer S1P-Konzentration von 10 μ M wurde die T β R-I-Oberflächenexpression hingegen vollständig reduziert (Abb. 3.1.8.1D, E).

Die Ergebnisse der Internalisierungsstudien des T β R-I in Gegenwart von S1P weisen auf eine direkte Rezeptorinteraktion hin und stehen in Korrelation mit der S1P-induzierten Hemmung der TGF- β -Effekte.

3.1.8.3 FACS-Analyse zur Bestimmung der Internalisierung von T β R-I durch TGF- β

Da für S1P nach Stimulation der XS52 Zellen eine Internalisierung des T β R-I nachgewiesen werden konnte, sollte festgestellt werden, ob dieser Internalisierungsprozess auch für den nativen Liganden TGF- β zu beobachten ist. HA-Epitop markierte T β R-I transfizierte XS52 Zellen wurden für 30 min mit TGF- β (1 ng/ml) stimuliert und anschließend durchflusszytometrisch auf die Oberflächenexpression des T β R-I nach der Immunfärbung mit einem FITC-konjugierten Anti-HA-Antikörper hin untersucht. Die FACS-Analyse zeigte keine Veränderung der Oberflächenexpression des T β R-I im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen, so dass ein Internalisierungsprozess des T β R-I in Gegenwart von TGF- β nicht zu beobachten war (Abb. 3.1.8.1C).

Dieses Ergebnis steht in Einklang mit Arbeiten einer anderen Arbeitsgruppe (Di Guglielmo et al., 2003), die anhand von Immunfluoreszenzstudien ligandunabhängige Internalisierungsprozesse der TGF- β -Rezeptoren beschrieben hatten. Die Tatsache, dass die Stimulation mit TGF- β nicht zu einer Desensitivierung von T β R-I führt, korreliert mit den Daten aus den Migrationsexperimenten, in denen kein Einfluss einer TGF- β -Vorstimulation auf die chemotaktischen Effekte von TGF- β gemessen werden konnte.

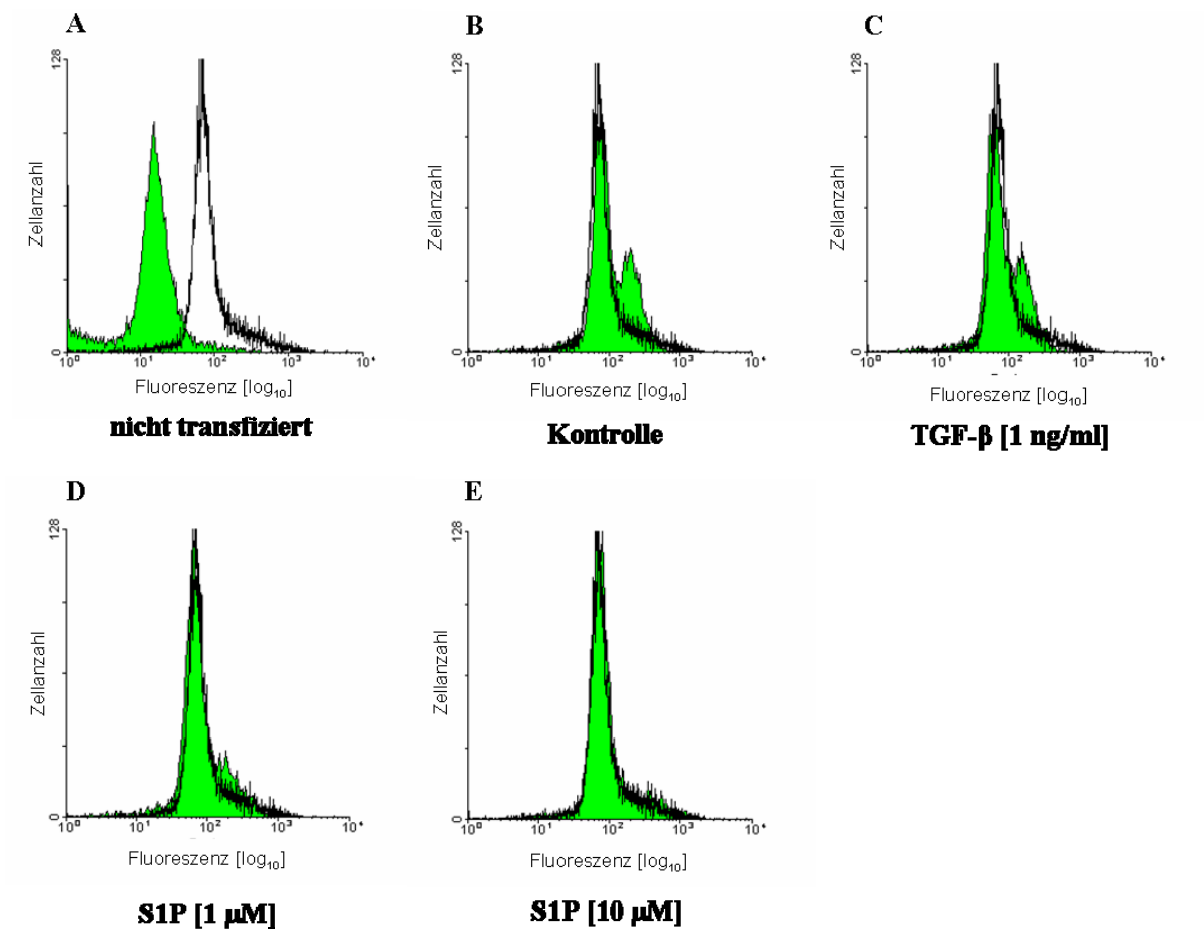


Abb. 3.1.8.1: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von T β R-I an HA-Epitop markierten T β R-I transfizierten XS52 Zellen. Die Zellen wurden mit einem HA-Epitop markierten T β R-I-Konstrukt (0,75 μ g/ml) für 3 d transfiziert und anschließend mit Kontrollvehikel, TGF- β und S1P in den angegebenen Konzentrationen für 30 min stimuliert. Nach Inkubation der Zellen mit FITC-konjugierten Anti-HA-Antikörpern für 1 h erfolgte die FACS-Analyse zur Bestimmung der Oberflächenexpression von T β R-I. In Abb. A ist die Eigenfluoreszenz der Zellen dargestellt, die unspezifische Bindung des FITC-konjugierten Anti-HA-Antikörpers ist in allen Histogrammen als schwarze Linie hinterlegt. Der Versuch wurde zweimal wiederholt und führte zu vergleichbaren Ergebnissen.

3.1.8.4 Fluoreszenzmikroskopische Analyse der T β R-I-Internalisierung

Zur weiteren Absicherung der durchflusszytometrischen Analysen wurde die Rezeptorständigkeit von T β R-I fluoreszenzmikroskopisch am konfokalen Mikroskop untersucht. Hierfür wurden XS52 Zellen auf Deckgläschen in 12-Loch-Platten kultiviert und mit dem HA-Epitop markierten T β R-I-Konstrukt transfiziert. Im Anschluss an die Transfektion wurden die Zellen mit TGF- β beziehungsweise S1P stimuliert und zur Präparation für die Mikroskopie auf den Deckgläschen mit Methanol fixiert. Da Methanol Lipide aus der Zellmembran löst, war eine zusätzliche Permeabilisierung der Zellen nicht notwendig. Nach Inkubation der Zellen mit dem

FITC-konjugierten Anti-HA-Antikörper erfolgte die Analyse der Proben am konfokalen Mikroskop.

Auch hier konnte eine Membranständigkeit des exogen exprimierten Rezeptors in den Kontrollen nachgewiesen werden, was auf einen funktionell aktiven T β R-I deutet. Weiterhin führte die Stimulation mit TGF- β zu keiner Veränderung der Rezeptorständigkeit, während die Behandlung mit S1P eine Membrandelokalisierung und punktförmige Anreicherung des Rezeptors im Zytosol bewirkte (Abb. 3.1.8.4). Somit konnten die bereits am FACS-Gerät gewonnenen Daten auch am konfokalen Mikroskop gemessen werden und bestätigten die Internalisierung von T β R-I in Antwort auf einen S1P-Stimulus.

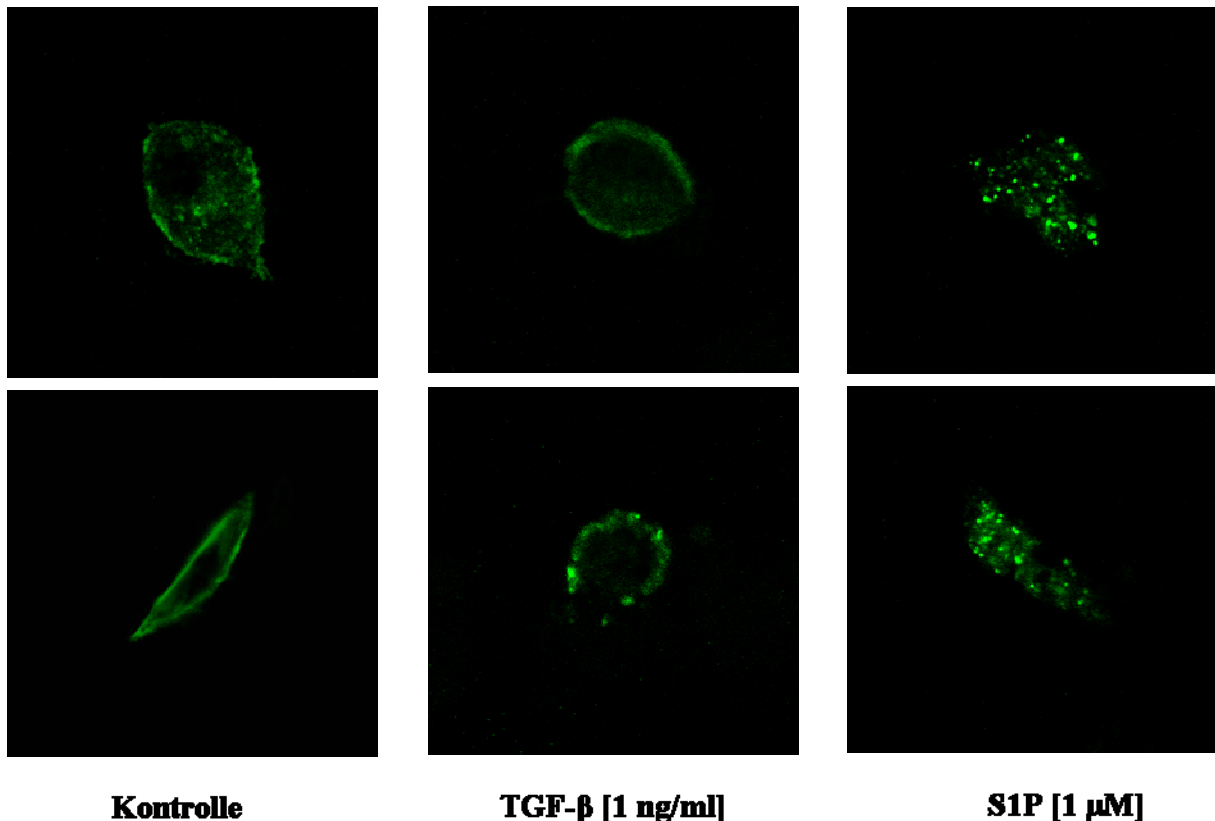


Abb. 3.1.8.4: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Lokalisation des T β R-I von HA-Epitop markierten T β R-I transfizierten XS52 Zellen. Die auf Deckgläschen kultivierten Zellen wurden zunächst mit einem HA-Epitop markierten T β R-I-Konstrukt (0,75 μ g/ml) für 3 d transfiziert und anschließend mit Kontrollvehikel, TGF- β (1 ng/ml) und S1P (1 μ M) für 30 min stimuliert. Nach Inkubation der Zellen mit FITC-konjugierten Anti-HA-Antikörpern für 1 h erfolgte die Analyse der einzelnen Proben am konfokalen Mikroskop. Der Versuch wurde zweimal wiederholt und führte zu vergleichbaren Ergebnissen.

3.1.9 Interaktion von S1P₁ und TβR-I

Anhand durchflusszytometrischer Untersuchungen zur Oberflächenexpression des TβR-I konnte eine Internalisierung des Rezeptors durch S1P nachgewiesen werden. Es ist jedoch nicht bekannt, ob diese Interaktion direkt auf Ebene der Rezeptoren durch Dimerisierung von S1P₁ und TβR-I stattfindet, oder nachgeschaltete Signalwege des S1P₁ die Internalisierung von TβR-I auslösen. In der Literatur wurde an mehreren Publikationen belegt, dass S1P₁ infolge einer S1P-Stimulation einem transienten Internalisierungsprozess unterliegt. Bereits Inkubationszeiten von 5 min bewirken eine fast vollständige Delokalisierung von S1P₁ in das Cytosol (Liu et al., 1999). Dahingehend sollte geprüft werden, ob die Stimulation mit S1P zu einer Dimerisierung von S1P₁ mit TβR-I führt und der formierte Rezeptorkomplex in das Zytosol translokalisiert. Die Zusammenlagerung der Rezeptoren sollte anhand von Immunpräzipitationsexperimenten gemessen werden, während als Nachweis der Internalisierung des S1P₁/TβR-I-Rezeptorkomplex zusätzlich die Oberflächenexpression von S1P₁ durchflusszytometrisch und fluoreszenzmikroskopisch bestimmt werden sollte.

3.1.9.1 Dimerisierung von TβR-I und S1P₁ infolge einer S1P-Stimulation

Die Dimerisierung der Rezeptoren wurde an HA-Epitop markierten TβR-I transfizierten XS52 Zellen durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen mit dem TβR-I-Konstrukt über 3 d transfiziert und anschließend mit S1P für 30 min stimuliert. Nach Lyse der behandelten XS52 Zellen erfolgte die Immunpräzipitation des exogen HA-Epitop markierten TβR-I durch Inkubation mit einem Anti-HA-Antikörper und nachgeschalteter Fällung des Immunkomplexes mit Protein-G-Agarose. Im Anschluss an die gelelektrophoretische Trennung der Proben wurde an HA-TβR-I gebundenes S1P₁-Protein über eine Westernblot-Analyse gegen S1P₁ detektiert. Zur Absicherung des einheitlichen Transfizierungsgrades der Proben wurde die Membran nach der Behandlung mit dem Anti-S1P₁-Antikörper gestriipt und nochmals einer Westernblot-Analyse auf HA unterzogen. Im Gegensatz zu den nicht transfizierten Zellen waren bei allen anderen Proben vergleichbar starke Intensitäten der HA-Bande erkennbar, so dass eine homogene Transfektion der Proben sichergestellt werden konnte. Bei der Detektion von S1P₁ zeigte die S1P-stimulierte Probe eine

deutlich stärkere Bande als die Kontrollzellen, was die Dimerisierung des S1P₁/TβR-I-Rezeptorkomplex nach Stimulation mit S1P bestätigt und auf eine direkte Interaktion der Rezeptoren hindeutet (Abb. 3.1.9.1).

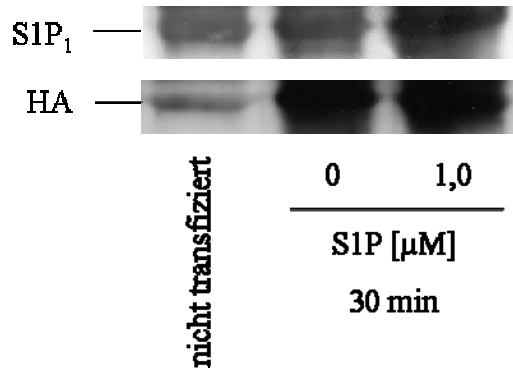


Abb. 3.1.9.1: Nachweis der Zusammenlagerung von S1P₁ und TβR-I. Die Zellen wurden zunächst mit einem HA-Epitop markierten TβR-I-Konstrukt (0,75 µg/ml) für 3 d transfiziert und anschließend mit Kontrollvehikel oder S1P (1 µM) für 30 min stimuliert. Danach erfolgte die Immunpräzipitation des HA-Epitop markierten TβR-I aus den Zelllysaten mit Anti-HA-Antikörpern und Protein-G-Agarose. Die Proteinexpression an TβR-I gebundenen S1P₁ wurden über eine Westernblot-Analyse mit Anti-S1P₁-Antikörpern bestimmt. Zur Kontrolle des einheitlichen Transfektionsgrades wurde zusätzlich eine Westernblot-Analyse mit Anti-HA-Antikörpern durchgeführt. Der Versuch wurde einmal wiederholt und führte zu vergleichbaren Ergebnissen.

3.1.9.2 FACS-Analyse zur Bestimmung der Internalisierung von S1P₁ nach Stimulation mit S1P

Die Internalisierungsstudien von S1P₁ in Gegenwart von S1P wurden durchflusszytometrisch an HA-Epitop markierten S1P₁ transfizierten XS52 Zellen durchgeführt. Nach 30-minütiger Stimulation mit S1P und einstündiger Inkubation mit einem FITC-konjugierten Anti-HA-Antikörper wurde die Oberflächenexpression von S1P₁ über eine FACS-Analyse bestimmt. Die Membranständigkeit des exogenen S1P₁ konnte durch einen zweiten Peak im Histogramm bestätigt werden. Wenn die transfizierten XS52 Zellen mit 1 µM S1P stimuliert wurden, war dieser zweite Peak im Histogramm nicht erkennbar, was einer nahezu vollständigen Internalisierung des S1P₁-Rezeptors durch die Aktivierung von S1P gleichzusetzen ist (Abb. 3.1.9.2).

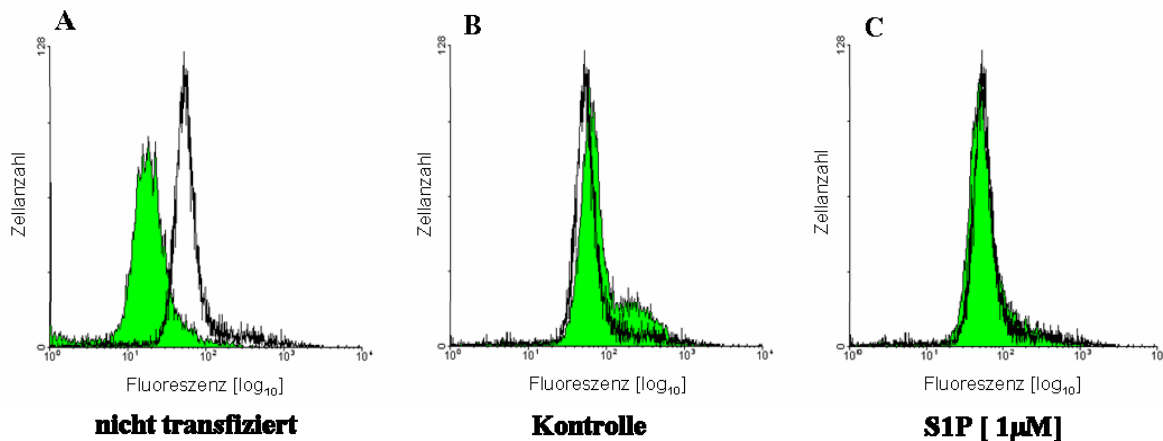


Abb. 3.1.9.2: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von S1P₁ an HA-Epitop markierten S1P₁ transfizierten XS52 Zellen. Die Zellen wurden mit einem HA-Epitop markierten S1P₁-Konstrukt (0,75 μg/ml) für 3 d transfiziert und anschließend mit Kontrollvehikel oder S1P (1 μM) für 30 min stimuliert. Nach Inkubation der Zellen mit FITC-konjugierten Anti-HA-Antikörpern für 1 h erfolgte die FACS-Analyse zur Bestimmung der Oberflächenexpression von S1P₁. In Abb. A ist die Eigenfluoreszenz der Zellen dargestellt, die unspezifische Bindung des FITC-konjugierten Anti-HA-Antikörpers ist in allen Histogrammen als schwarze Linie hinterlegt. Der Versuch wurde zweimal wiederholt und führte zu vergleichbaren Ergebnissen.

3.1.9.3 Fluoreszenzmikroskopische Analyse der S1P₁-Internalisierung

Zur Absicherung der durchflusszytometrisch ermittelten Daten wurde die Internalisierung von S1P₁ in Gegenwart von S1P über eine fluoreszenzmikroskopische Analyse am konfokalen Mikroskop verifiziert. Hierfür wurden XS52 Zellen mit einem GFP-S1P₁-Konstrukt transfiziert. Durch die Fusionierung von S1P₁ mit GFP, einem Protein welches durch Anregung mit Licht einer Wellenlänge von $\lambda = 488$ nm fluoresziert, war es möglich, den Rezeptor direkt ohne die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern zu lokalisieren. Die GFP-Epitop markierten S1P₁ transfizierten XS52 Zellen wurden mit 1 μM S1P für 30 min stimuliert und anschließend für die fluoreszenzmikroskopische Analyse wie in Punkt 2.2.11.1 beschrieben präpariert. Die Membranständigkeit des GFP-S1P₁-Konstrukts konnte durch die grüne Fluoreszenz der Zellmembran in den Kontrollzellen bestätigt werden. Hingegen führte die Stimulation mit S1P zu einer vollständigen Internalisierung von S1P₁, was an der punktförmigen Anreicherung des Fluoreszenzsignals im Zellinneren beobachtet werden konnte und auf eine Translokation von S1P₁ in definierte Zellkompartimente deutet (Abb. 3.1.9.3).

Die Ergebnisse aus den Immunpräzipitationen von TβR-I und S1P₁ sowie den durchflusszytometrischen und fluoreszenzmikroskopischen Analysen zur Bestimmung der Oberflächenexpression von S1P₁ weisen auf eine direkte

Rezeptorinteraktion von S1P₁ und TβR-I hin und verdeutlichen den Mechanismus der inhibierenden Wirkung von S1P auf die TGF-β-Effekte.

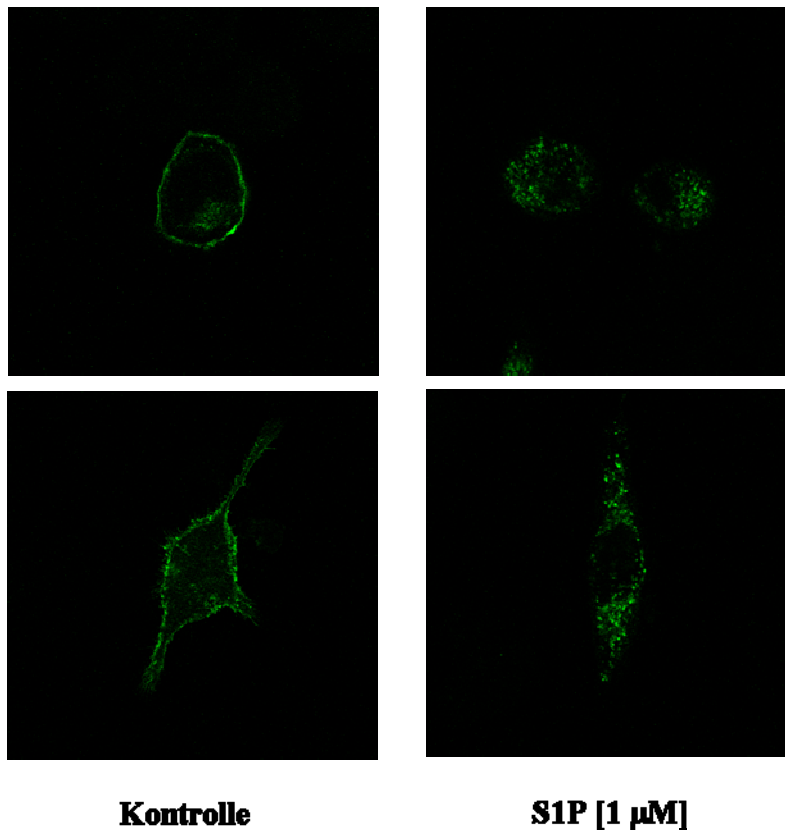


Abb. 3.1.9.3: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Lokalisation des S1P₁ von GFP-Epitop markierten S1P₁ transfizierten XS52 Zellen. Die auf Deckgläschen kultivierten Zellen wurden zunächst mit einem GFP-Epitop markierten S1P₁-Konstrukt (0,75 μg/ml) für 3 d transfiziert und anschließend mit Kontrollvehikel oder S1P (1 μM) für 30 min stimuliert. Danach erfolgte die Analyse der einzelnen Proben am konfokalen Mikroskop. Der Versuch wurde zweimal wiederholt und führte zu vergleichbaren Ergebnissen.

3.1.10 Einfluss von FTY720 auf die Wirkungen von S1P und TGF- β

3.1.10.1 FACS-Analyse zur Bestimmung der Internalisierung von S1P₁ in Gegenwart von FTY720

FTY720 ist ein Strukturanalogon von S1P und hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung als Immunsuppressivum erlangt, welches seine Wirkung nicht wie die klassischen Immunsuppressiva durch Hemmung der IL-2-Effekte vermittelt. Vielmehr beeinflusst FTY720 die Migration von Lymphozyten und bewirkt eine Reduktion der Lymphozytenzahl im Blut. Dieser Effekt wird durch eine langanhaltende Internalisierung des S1P₁ ausgelöst, der eine Schlüsselfunktion beim Austritt der Lymphozyten aus den sekundären Lymphorganen besitzt. Neben der agonistischen Wirkung an S1P₁ wirkt FTY720 in seiner phosphorylierten Form als Agonist an S1P₃, S1P₄ und S1P₅. Jedoch ist S1P₁ entscheidend für die migratorischen Prozesse von T- und B-Lymphozyten und somit verantwortlich für den immunsuppressiven Effekt von FTY720.

Da S1P an XS52 Zellen über eine direkte Rezeptorinteraktion von S1P₁ und T β R-I zu einer Internalisierung von T β R-I führt und über diesen Mechanismus die Wirkung von TGF- β inhibiert, sollte im Folgenden geprüft werden, ob dieser Prozess auch für FTY720 zu beobachten ist. In diesem Rahmen wurden Internalisierungsstudien von S1P₁ und T β R-I auf einen FTY720-Stimulus durchgeführt und anhand von Migrationsexperimenten ein möglicher Hemmeffekt von FTY720 auf die TGF- β -induzierte Chemotaxis näher untersucht.

In der Literatur konnte an mehreren T-Zell-Modellen belegt werden, dass FTY720 zu einer dauerhaften Internalisierung des S1P₁ führt. Dahingehend sollte die Oberflächenexpression von S1P₁ in Gegenwart von FTY720 durchflusszytometrisch bestimmt werden. Die Untersuchungen wurden an HA-Epitop markierten S1P₁ transfizierten XS52 Zellen durchgeführt. Wie in Abb. 3.1.10.1 dargestellt, bewirkt die 30-minütige Stimulation mit 1 μ M FTY720 eine nahezu vollständige Herunterregulierung der S1P₁-Oberflächenexpression. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass der Internalisierungsprozess von S1P₁ in Gegenwart von FTY nicht ausschließlich an der Oberfläche von T-Zellen stattfindet, sondern auch an DCs zu beobachten ist.

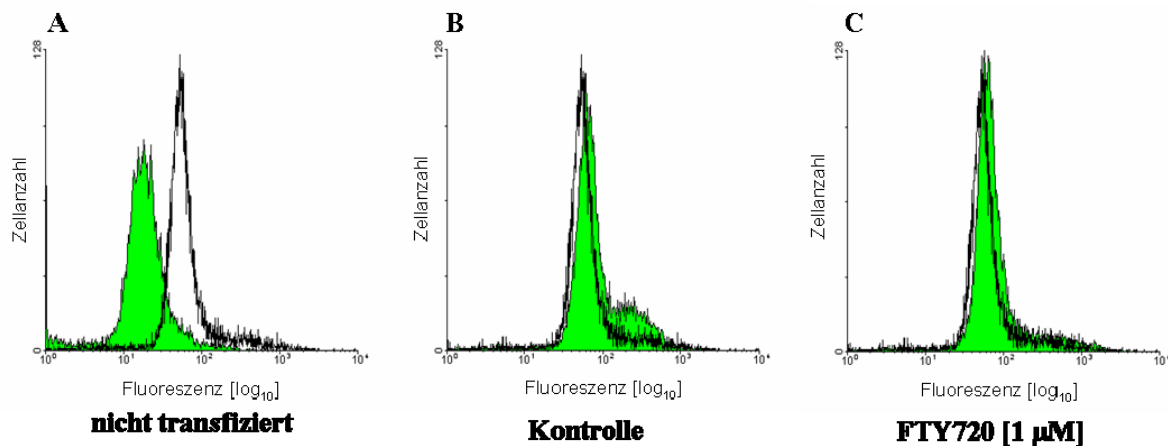


Abb. 3.1.10.1: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von $S1P_1$ an HA-Epitop markierten $S1P_1$ transfizierten XS52 Zellen. Die Zellen wurden mit einem HA-Epitop markierten $S1P_1$ -Konstrukt ($0,75 \mu\text{g/ml}$) für 3 d transfiziert und anschließend mit Kontrollvehikel oder FTY720 ($1 \mu\text{M}$) für 30 min stimuliert. Nach Inkubation der Zellen mit FITC-konjugierten Anti-HA-Antikörpern für 1 h erfolgte die FACS-Analyse zur Bestimmung der Oberflächenexpression von $S1P_1$. In Abb. A ist die Eigenfluoreszenz der Zellen dargestellt, die unspezifische Bindung des FITC-konjugierten Anti-HA-Antikörpers ist in allen Histogrammen als schwarze Linie hinterlegt. Der Versuch wurde zweimal wiederholt und führte zu vergleichbaren Ergebnissen.

3.1.10.2 FACS-Analyse zur Bestimmung der Internalisierung von $T\beta R-I$ in Gegenwart von FTY720

Im Hinblick auf die FTY720-induzierte Internalisierung von $S1P_1$ in XS52 Zellen war es von Bedeutung, ob FTY720 auch eine Membrandelokation von $T\beta R-I$ bewirkt. Um dies zu prüfen, wurden XS52 Zellen mit einem HA-Epitop markierten $T\beta R-I$ -Konstrukt transfiziert und anschließend mit $1 \mu\text{M}$ FTY720 für 30 min stimuliert. Nach der Immunfärbung mit FITC-konjugierten Anti-HA-Antikörpern erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der Oberflächenexpression von $T\beta R-I$. In Analogie zu $S1P$ führte die Stimulation mit FTY720 zu einer nahezu vollständigen Internalisierung des $T\beta R-I$ (Abb. 3.1.10.2).

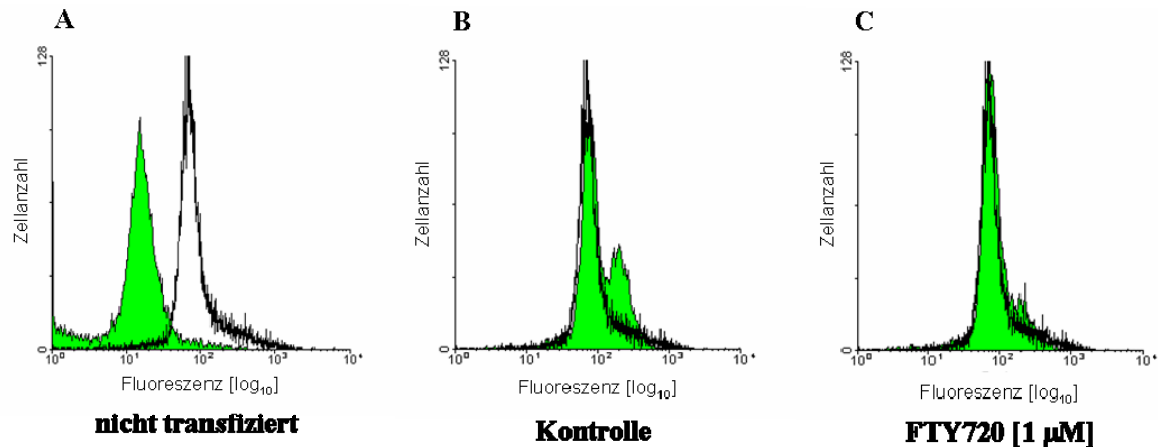


Abb. 3.1.10.2: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von $T\beta R-I$ an HA-Epitop markierten $T\beta R-I$ transfizierten XS52 Zellen. Die Zellen wurden mit einem HA-Epitop markierten $T\beta R-I$ -Konstrukt ($0,75 \mu\text{g/ml}$) für 3 d transfiziert und anschließend mit Kontrollvehikel oder FTY720 ($1 \mu\text{M}$) für 30 min stimuliert. Nach Inkubation der Zellen mit FITC-konjugierten Anti-HA-Antikörpern für 1 h erfolgte die FACS-Analyse zur Bestimmung der Oberflächenexpression von $T\beta R-I$. In Abb. A ist die Eigenfluoreszenz der Zellen dargestellt, die unspezifische Bindung des FITC-konjugierten Anti-HA-Antikörpers ist in allen Histogrammen als schwarze Linie hinterlegt. Der Versuch wurde zweimal wiederholt und führte zu vergleichbaren Ergebnissen.

3.1.10.3 Untersuchungen der migratorischen Wirkungen von S1P und TGF- β nach Inkubation mit FTY720

Da die Stimulation mit FTY720 die Internalisierung von $S1P_1$ und $T\beta R-I$ verursacht, sollte im Rahmen eines Migrationsassays untersucht werden, ob die Vorinkubation von XS52 Zellen mit FTY720 einen Einfluss auf die chemotaktischen Wirkungen von S1P und TGF- β ausübt. Die Migration auf einen TGF- β -Stimulus wurde an XS52 Zellen gemessen, denen eine 30-minütige Inkubation mit FTY720 vorgeschaltet war. Im Vergleich zu den Kontrollzellen führte die kurzzeitige Stimulation mit FTY720 zu einer vollständigen Hemmung der TGF- β -induzierten Migration, so dass die für S1P bereits gemessenen inhibitorischen Effekte auf den TGF- β -Signalweg auch für das S1P-Analogon FTY720 zu beobachten waren (Abb. 3.1.10.3A).

Hingegen zeigte die Vorinkubation von XS52 Zellen mit FTY720 nur eine geringe Hemmung der S1P-induzierten Migration (Abb. 3.1.10.3B).

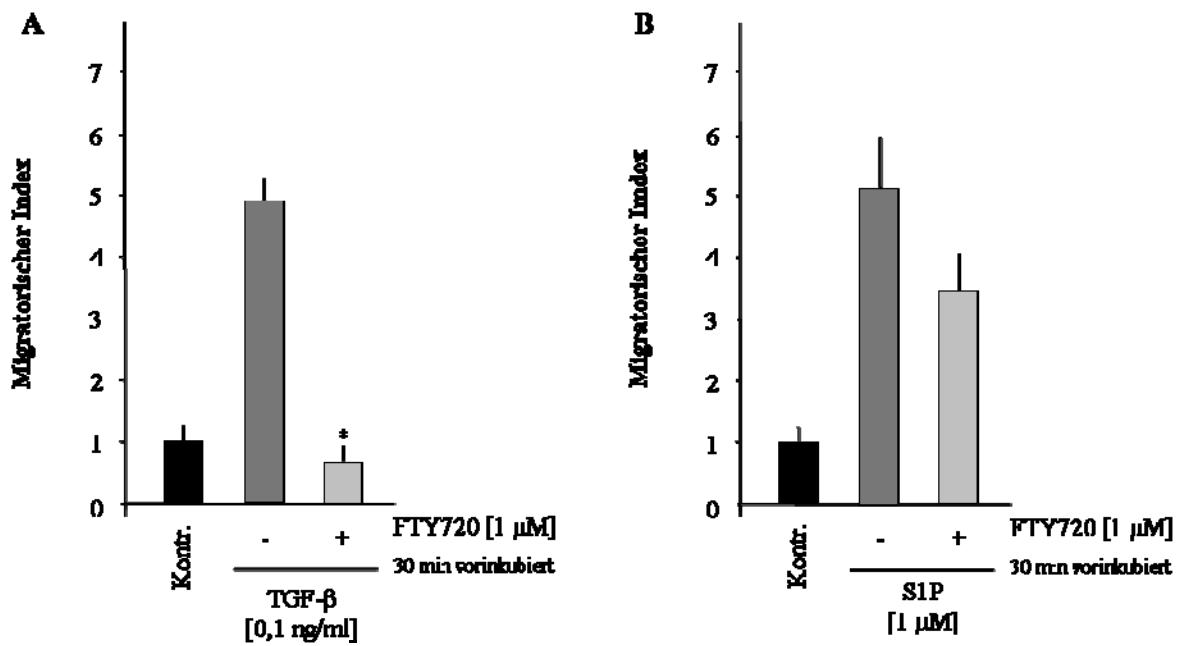


Abb. 3.1.10.3: Untersuchungen der TGF- β - und S1P-induzierten Migration von XS52 Zellen nach Vorbehandlung der Zellen mit FTY720. Die Zellen wurden zunächst mit Kontrollvehikel oder FTY720 (1 μ M) für 30 min vorinkubiert und anschließend in einer Transwell-Kammer kultiviert. Die unteren Kammern wurden mit Kontrollvehikel, TGF- β (0,1 ng/ml) oder S1P (1 μ M) supplementiert. Nach 5 h Inkubation erfolgte die Auszählung der durch die Membran gewanderten Zellen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SD von Zweifachbestimmungen. Der Versuch wurde zweimal wiederholt und führte zu vergleichbaren Ergebnissen. * $p \leq 0,05$.