

4 DISKUSSION

4 Diskussion

4.1 Bedeutung der LPL und TGF- β in der Migration von XS52 Zellen

4.1.1 Migratorische Effekte von S1P in XS52 Zellen

Aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen im Serum und in den Lymphorganen besitzt S1P eine zentrale Position in der Steuerung der Zirkulation von T- und B-Lymphozyten zwischen dem Blut und dem Lymphsystem (Matloubian et al., 2004). Eine derart basale Migration ist auch für DCs anzunehmen, die von der Peripherie in die Lymphknoten wandern und über ihr funktionelles Rezeptorrepertoire mit T-Zellen interagieren um immunologische Effekte auszulösen. In der murinen Langerhanszelllinie XS52 konnten migratorische Wirkungen von S1P in einem Konzentrationsbereich von 0,1 μ M bis 10 μ M nachgewiesen werden, die vor allem chemotaktischer Natur waren und nur zu einem geringen Teil durch ungerichtete Zellbewegung verursacht wurden (Radeke et al., 2005). XS52 Zellen befinden sich unter den verwendeten Kulturbedingungen in einem unreifen Differenzierungsgrad und symbolisieren den in der Dermis residierenden LC-Phänotyp. Diesem imDC-Subtyp wird eine große Bedeutung in der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz gegenüber Autoantigenen zugeschrieben. Die migratorischen Stimuli für die Entkopplung aus der Peripherie mit anschließender Einwanderung in die Lymphknoten sind jedoch weitestgehend ungeklärt. In Analogie zu den Lymphozyten wirkt S1P chemotaktisch auf DCs und könnte eine solche Schlüsselfunktion neben dem CCR2/MCP1 Chemokinsystem (Sato et al., 2000) in der Rekrutierung von peripheren imDCs in die Lymphknoten einnehmen. Auch für humane *in vitro* aus Monozyten generierte DCs konnte eine migratorische Wirkung von S1P auf imDCs gezeigt werden. Hingegen übte S1P in dieser Studie auf LPS-differenzierte mDCs keine chemotaktischen Effekte mehr aus. Vielmehr beeinflusste S1P in mDCs die Zytokinsekretion und erhöhte die Sekretion von IL-10, während die Freisetzung von TNF- α und IL-12 gesenkt wurde. Ein derartiges Zytokinprofil deutet auf eine TH2-basierte Immunantwort durch S1P hin und unterstreicht die pleiotrope Wirkung des LPL in DCs in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad (Idzko et al., 2002; Renkl et

al., 2004). Kontroverse Effekte findet dieselbe Arbeitsgruppe in murinen DCs, in denen S1P sowohl in imDCs als auch in mDCs chemotaktische Effekte ausübte und keinerlei Wirkungen auf die Zytokinsekretion zeigte (Renkl et al., 2004). Interessant ist, dass ähnliche speziesabhängige Wirkungen auch für LPA, einem LPL, dessen Rezeptoren eine hohe Sequenzhomologie mit den S1P-Rezeptoren aufweisen, beschrieben wurden. Auf humane DCs wirkt LPA stark chemotaktisch, während in murinen DC keine migratorischen Effekte durch LPA induziert werden konnten (Panther et al., 2002; Renkl et al., 2004). In Einklang mit diesen Daten steht die fehlende Migration von XS52 Zellen auf einen LPA-Stimulus, die im Wesentlichen auf die nur marginal exprimierten LPA-Rezeptoren in XS52 Zellen zurückzuführen ist (Radeke et al., 2005).

4.1.1.1 Beteiligung der S1P-Rezeptoren an der S1P-evozierten Migration

Die fast vollständige Hemmung der S1P-induzierten Migration in Anwesenheit von PTX deutete auf eine Beteiligung von funktionell aktiven $G_{\alpha i}$ -gekoppelten GPCRs hin und konnte auch von anderen Arbeitsgruppen für humane DCs nachgewiesen werden (Idzko et al., 2002); hingegen wurden die migrationsauslösenden S1P-Rezeptorsubtypen noch nicht identifiziert. Eine Real-Time PCR Analyse bestätigte die Expression von S1P₁, S1P₂, S1P₃ und S1P₄ in XS52 Zellen und war Basis für die anschließenden Untersuchungen in Gegenwart von spezifischen Antisense-ODN. Der Einsatz von S1P₁-Antisense-ODN induzierte eine fast vollständige Hemmung der Migration von XS52 Zellen in Antwort auf S1P, eine verringerte Expression von S1P₃ äußerte sich lediglich in einer Inhibierung der Migration um ca. 30% (Radeke et al., 2005). Die funktionelle Bedeutung von S1P₁ an den migratorischen Effekten von S1P konnte ferner an S1P₁^{-/-} Mäusen demonstriert werden, die aufgrund unvollständig ausgebildeter Gefäße infolge einer verringerten Migration glatter Muskelzellen in der Embryonalphase sterben (Liu et al., 2000b). Nicht nur in Endothelzellen sondern auch in Lymphozyten werden migratorische Effekte des LPL über S1P₁ vermittelt. Mäuse, die mit S1P₁^{-/-} Lymphozyten-Vorläuferzellen rekonstituiert wurden, sind durch den fehlenden Übertritt von reifen CD4⁺CD8⁻ bzw. CD8⁺CD4⁻ Thymozyten ins Blut und durch den fehlenden Austritt von Lymphozyten aus den sekundären Lymphorganen charakterisiert (Matloubian et al., 2004). Interessant ist, dass die Lymphozytenzirkulation aufgrund des konstanten S1P-Serumspiegels hauptsächlich

durch die Oberflächenexpression von S1P₁ reguliert wird (Lo et al., 2005). Im Zuge der T-Zell-Aktivierung wird der Verbleib der T-Zelle im Lymphknoten durch die Downregulation von S1P₁ evoziert, während ausdifferenzierte T-Effektorzellen S1P₁ wieder auf der Oberfläche exprimieren und den Lymphknoten infolge des S1P-Gradienten in den efferenten Lymphgefäßen verlassen können (Matloubian et al., 2004).

Ferner zeigten Experimente in Gegenwart von S1P₁- und S1P₃-Antisense-ODN die migrationsfördernde Wirkung dieser Rezeptoren auch in Keratinozyten und in Endothelzellen (Sauer et al., 2004a; Wang et al., 1999). Eine kürzlich publizierte Studie an murinen aus Knochenmarkszellen *in vitro* differenzierten DCs koppelte migratorische Effekte auf S1P eng an die Expression von S1P₁ und S1P₃. Erst mDCs exprimieren S1P₁ und S1P₃ und migrieren auf S1P, während in imDCs keine Migration durch S1P induziert werden konnte (Czeloth et al., 2005). Obwohl auf Rezeptorebene die Daten mit den Effekten in XS52 Zellen übereinstimmen, existieren Widersprüche hinsichtlich des Differenzierungsgrades, in dem S1P seine migratorischen Effekte auf DCs ausübt. Unterschiede in der Art der Progenitorzelle (Knochenmarkszelle oder Monozyt), der Differenzierungsprotokolle sowie der Spezies sind als Gründe für diese kontroversen Effekte anzunehmen. Die erste *in vivo* Studie in C57BL/1 Mäusen zeigte eine deutlich erhöhte Anzahl an zirkulierenden DCs im Blut in Anwesenheit des selektiven S1P₁-Agonisten SEW 2871 und bestätigte die physiologische Relevanz der S1P-S1P₁-Achse in DCs (Lan et al., 2005).

Im Gegensatz zu S1P₁ und S1P₃ zeigte der Einsatz von S1P₂-Antisense-ODN eine Steigerung der Migration und steht im Einklang mit den bereits publizierten migrationshemmenden Effekten dieses Subtyps in S1P₂ überexprimierenden Ovarialzellen des Hamsters (Kon et al., 1999) und der B16F10 Melanomzelllinie (Yamaguchi et al., 2003). Zusätzlich konnte in B16F10 Zellen eine Hemmung der migrationsauslösenden GTPase RAC nachgewiesen werden. Auch in der Physiologie der Mastzelle nimmt S1P eine zentrale Rolle ein und fördert die Migration auf geringe Antigenkonzentrationen über S1P₁, während in Gegenwart von hohen Antigenkonzentrationen über S1P₂ die Migration gebremst und die Mastzelldegranulation ausgelöst wird (Jolly et al., 2004; Olivera and Rivera, 2005). Die Behandlung von XS52 Zellen mit S1P₄-Antisense-ODN beeinflusste nicht die Motilität dieser Zellen und korrelierte mit den S1P-Wirkungen in T-Zellen, in denen

S1P₄ keine migratorischen Effekte auslöst, sondern hauptsächlich zytokinmodulierend wirkt (Wang et al., 2005).

4.1.2 Migratorische Effekte von TGF- β in XS52 Zellen

Die Bedeutung von TGF- β in der Biologie von DCs wurde erstmalig an dem Fehlen von LCs in TGF- β 1^{-/-} Mäusen demonstriert (Borkowski et al., 1996; Borkowski et al., 1997). LCs in der Haut besitzen eine sehr geringe Proliferationsrate, deren Zellpopulation in der Dermis durch die Rekrutierung von LCs beziehungsweise Precursor-LCs aus dem Blut aufrechterhalten wird (Valladeau and Saeland, 2005). Migrationsexperimente an XS52 Zellen in Gegenwart von TGF- β bestätigten chemotaktische Effekte dieses Zytokins in LCs und deuten auf eine Beteiligung in der epidermalen Lokalisierung hin (Radeke et al., 2005). Aus der TGF- β 1^{-/-} Maus in den Wildtyp transferierte Knochenmark Progenitor Zellen bildeten einen normalen LC-Phänotyp und lokalisierten in der Dermis, so dass Defekte der LC-Precursor in der TGF- β 1^{-/-} Maus ausgeschlossen werden können und parakrine TGF- β -Effekte für die Entwicklung von LCs zu vermuten sind (Borkowski et al., 1997). Die *in vitro* Generierung von LCs aus hämatopoetischen Vorläuferzellen in GM-CSF und IL-4 enthaltenen Medium ist nur möglich in der Präsenz von TGF- β ; hingegen bewirkt das Fehlen des Zytokins die Differenzierung zu Monozyten (Strobl et al., 1996). Auch werden die LC-spezifischen Marker CD1a und E-Cadherin nur in Anwesenheit von TGF- β gebildet (Geissmann et al., 1998). E-Cadherin stellt ein transmembranäres Protein dar, welches die Bildung von Zell-Zell-Clustern induziert und in der Dermis den Kontakt zwischen Keratinozyten und LCs herstellt (Jakob et al., 1999). Sowohl Keratinozyten als auch LCs sind in der Lage TGF- β zu produzieren und generieren hohe TGF- β -Konzentrationen in der dermalen Umgebung (Glick et al., 1993; Gruschwitz and Hornstein, 1992), so dass eine konstitutive Rekrutierung von LCs in die Haut durch TGF- β anzunehmen ist.

Ein den TGF- β 1^{-/-} Mäusen sehr ähnlichen Phänotyp weisen ID2^{-/-} Mäuse auf, die in Analogie zu den TGF- β 1^{-/-} Mäusen keine LCs in der Haut exprimieren (Hacker et al., 2003). ID2 stellt ein direktes Zielgen von TGF- β in DCs dar und erfährt durch TGF- β eine transiente Hochregulation (Hacker et al., 2003). ID Proteine zählen zur Gruppe der HLH (helix loop helix) -Proteine, die durch Bildung von Homo- oder Heterodimeren mit der DNA interagieren und die Transkription von Genen regulieren

(Ruzinova and Benezra, 2003). Die transkriptionelle Aktivität der HLH-Proteine wird durch ID-Proteine antagonisiert, die keine DNA-Bindungsdomäne besitzen und durch Heteromerisierung mit den HLH-Proteinen deren Bindung an die DNA verhindern (Ruzinova and Benezra, 2003). Neben der Regulation von Differenzierungsvorgängen in epithelialen und hämopoetischen Zellen sind ID-Proteine auch wichtige intrazelluläre Signalproteine von TGF- β . So werden die antiproliferativen und differenzierungsfördernden Effekte von TGF- β in Epithelzellen durch eine Downregulation von Id2 und Id3 ausgelöst (Kowanetz et al., 2004). Hingegen erhöht TGF- β die Expression von Id1 in Endothelzellen. Interessant ist, dass die TGF- β -induzierte Migration in Gegenwart von Id1-siRNA vollständig gehemmt wurde (Goumans et al., 2002). Dies deutet auf eine zellspezifische Regulation der Id-Proteinexpression durch TGF- β hin und erweitert die funktionelle Bedeutung der Id-Proteine in der TGF- β -Signalkaskade von Differenzierungsprozessen auf migratorische Effekte, so dass eine Beteiligung von Id2 an der Motilität von LCs in Gegenwart von TGF- β möglich ist.

Außer ihrer Rolle als Initiatoren der adaptiven Immunität zählen DCs zu den Mediatoren zellulärer unspezifischer Abwehrmechanismen und sind in der Lage, durch die Sekretion von Zytokinen parakrine Effekte am Infektionsherd auszuüben (Mellman and Steinman, 2001). Eine zentrale Funktion im Entzündungsgewebe wird dem Zytokin TGF- β zugeschrieben, welches im inflammatorischen Gewebe in erhöhten Konzentrationen vorliegt und die Rekrutierung von mehreren Leukozytenpopulationen bewirkt (Rastellini et al., 1995). So wirkt TGF- β stark chemotaktisch auf Monozyten und erhöht die Expression des Adhäsionsproteins LFA-1 und dem Fibronectinrezeptor auf der Monozytenmembran (Bauvois et al., 1992; Turner et al., 1990; Wahl et al., 1993). Auch für Mastzellen konnte eine chemotaktische Wirkung von TGF- β nachgewiesen werden, die unter anderem durch die vermehrte Bildung von Integrin- $\alpha 7$ induziert wird (Olsson et al., 2000; Rosbottom et al., 2002). Im Hinblick auf die erhöhten TGF- β -Spiegel im entzündeten Gewebe und den chemotaktischen Wirkungen von TGF- β in XS52 wäre eine gerichtete Bewegung von LCs in Analogie zu den Monozyten ins Entzündungsareal denkbar, was die Bedeutung von TGF- β in sowohl adaptiven als auch unspezifischen Immunantworten widerspiegelt.

4.1.3 Beteiligung des Smad-Signalweges an der TGF- β -induzierten Migration in XS52 Zellen

Eine Vielzahl der TGF- β -Effekte wird durch Aktivierung von Smad-Proteinen vermittelt, von denen die Wirkung von Smad3 bisher am besten charakterisiert wurde. Der Phänotyp von Smad3^{-/-} Mäusen ist durch immunologische Störungen mit starker Abszess- und Fistelbildung im Intestinum gekennzeichnet, die aufgrund einer verminderten Anzahl an Neutrophilen im Darm und der damit verbundenen Immunschwäche hervorgerufen werden (Yang et al., 1999c). Ferner zeigen Wundareale in Smad3^{-/-} Mäusen eine verringerte Infiltration an Monozyten und deuteten auf eine Beteiligung von Smad3 als intrazellulären Mediator der TGF- β -induzierten Migration hin (Ashcroft et al., 1999). Die Relevanz von Smad3 in migratorischen Prozessen des Zytokins TGF- β konnte *in vitro* durch Migrationsexperimente an Smad3^{-/-} Monozyten und Neutrophilen bestätigt werden, die im Vergleich zu den Wildtyp Zellen kein chemotaktisches Signal auf TGF- β mehr lieferten (Ashcroft et al., 1999; Yang et al., 1999c). Im Hinblick auf die Funktion von Smad3 als Signalprotein der motogenen Effekte von TGF- β mehrerer Leukozytenpopulationen war eine Beteiligung von Smad3 in der TGF- β -induzierten Migration von XS52 Zellen denkbar. Eine PCR-Analyse bestätigte die Expression von Smad2, Smad3 und Smad4 mRNA-Transkripten in XS52 Zellen. Weiterhin konnte ein funktionell aktives Smad3 auf mehreren Ebenen von der Heteromerisierung mit Smad4 bis zur Bindung an Smad3-spezifischen Promotoreregionen der DNA nachgewiesen werden und lässt Smad3-abhängige biologische Effekte auch in XS52 Zellen vermuten. Durch Einsatz von Antisense-ODN wurden Smad3-defiziente XS52 Zellen generiert, deren Migration auf TGF- β im Vergleich zu den mit Kontroll-ODN behandelten XS52 Zellen um etwa 90 % reduziert wurde, so dass Smad-unabhängige Mechanismen ausgeschlossen werden können und Smad3 eine zentrale Rolle in der Transduktion TGF- β -induzierter migratorischer Prozesse in LCs zuzuordnen ist.

4.1.4 Aktivierung von Smad3 durch S1P und deren Bedeutung in der S1P-induzierten Migration

S1P besitzt dem TGF- β analoge Eigenschaften in der Proliferation und Migration epidermaler Zellen (Vogler et al., 2003). Interessant ist, dass neben TGF- β auch die proliferationsenkende und migrationsfördernde Wirkung von S1P in Smad3^{-/-} Keratinozyten nahezu vollständig aufgehoben wurde und S1P eine transiente Phosphorylierung von Smad3 vergleichbar mit der von TGF- β induzierte (Sauer et al., 2004a). Diese Daten zeigen, dass Smad-Proteine nicht ausschließlich durch TGF- β aktiviert werden und biologische Effekte unabhängig von der Präsenz des nativen Liganden TGF- β transduzieren können. Indirekte Effekte, wie eine S1P-vermittelte TGF- β -Freisetzung, konnten durch Experimente in Gegenwart von TGF- β -Antikörpern ausgeschlossen werden. Darüber hinaus ergaben Messungen der TGF- β -Spiegel im Medium S1P-stimulierter Zellen keine Erhöhung der TGF- β -Konzentration, so dass direkte Mechanismen für die Aktivierung von Smad-Proteinen durch S1P anzunehmen sind (Sauer et al., 2004a). Auch für LPA, welches wie S1P seine Wirkung durch Stimulation von Rezeptoren der LPL-Familie vermittelt, konnte eine Aktivierung von Smad-Proteinen und eine Beteiligung von Smad3 an den chemotaktischen und antiproliferativen Wirkungen nachgewiesen werden (Sauer et al., 2004b).

Nicht nur in epithelialen Zellen, sondern auch in Mesangiumzellen der Niere führt die Stimulation mit S1P zu einer Aktivierung von Smad-Proteinen, die vergleichbar mit der von TGF- β IL-1 β -induzierte inflammatorische Prozesse wie NO-Synthese, Phospholipase A₂ (PLA₂)-Sekretion und MMP9-Synthese inhibiert (Xin et al., 2004). Diese Daten verdeutlichen, dass neben migratorischen und proliferativen Prozessen in Epithelzellen auch antientzündliche Wirkungen von S1P in renalen Mesangiumzellen über die Smad-Protein-Signalkaskade reguliert werden und erweitern die Relevanz von Smad-Proteinen als intrazelluläre Mediatoren von S1P auf mehrere organspezifische Prozesse. In diesem Sinne erschien eine Beteiligung von Smad-Proteinen an S1P-induzierten immunologischen Prozessen als sehr wahrscheinlich und sollte an den migratorischen Effekten von S1P in XS52 Zellen näher charakterisiert werden.

In Analogie zu TGF- β führte die Stimulation mit S1P zur Bildung eines heteromeren Smad3/Smad4-Komplexes und zu einer nachgeschalteten Bindung von Smad3 an

Smad3-spezifischen Promotorsequenzen, so dass von einer funktionellen Aktivierung des Signalproteins auf allen Stufen auszugehen ist und Smad3-vermittelte zelluläre Prozesse auch für S1P zu erwarten sind. Migrationsexperimente in Gegenwart von Smad3-Antisense-ODN zeigten eine fast vollständige Hemmung der S1P-induzierten Migration und deuteten erstmals auf eine Beteiligung von Smad3 an den immunregulierenden Wirkungen von S1P hin.

4.1.4.1 Bedeutung der S1P-Rezeptoren in der Aktivierung von Smad-Proteinen durch S1P

Die Relevanz von Smad3 als intrazellulärer Mediator biologischer Effekte von S1P wurde an unterschiedlichen zellulären Wirkungen bereits hinreichend durchleuchtet, jedoch besteht weiterhin Unklarheit hinsichtlich der genauen Interaktion von S1P in der Smad-Protein-Signalkaskade. Neben der intrazellulären Wirkung vermittelt S1P einen großen Teil seiner Effekte über GPCRs. In humanen Keratinozyten konnte eine PTX-Sensitivität der Smad-Aktivierung identifiziert werden (Sauer et al., 2004a), was auf die Beteiligung von membranständigen Gi-gekoppelten GPCRs deutet und intrazelluläre Wege weitestgehend ausschließt. Es ist zu erwähnen, dass die Behandlung von renalen Mesangiumzellen mit PTX gegensätzliche Effekte zeigte und eine Erhöhung der Smad2-Phosphorylierung bewirkte (Xin et al., 2004). Detaillierte Untersuchungen in Gegenwart von Rezeptorspezifischen Antisense-ODN verifizierten die mit PTX gewonnenen Ergebnisse in Keratinozyten und ergaben eine Beteiligung von S1P₁ und S1P₃, während in Mesangiumzellen durch den Einsatz des S1P₃-Inhibitors Suramin ausschließlich S1P₃ als relevanter Rezeptor identifiziert wurde (Xin et al., 2004). Diese Daten lassen vermuten, dass wahrscheinlich mehrere S1P-Rezeptoren mit Smad-Proteinen interagieren und sowohl hemmende als auch aktivierende Effekte vermitteln.

4.1.4.2 Bedeutung der TGF- β -Rezeptoren in der Aktivierung von Smad-Proteinen durch S1P

Obwohl die Aktivierung von Smad-Proteinen auch TGF- β unabhängig erfolgen kann, sind Smad-Protein-vermittelte zelluläre Effekte bisher ausschließlich in der Präsenz von funktionell aktiven TGF- β Rezeptoren beschrieben wurden. Dies konnte auch für

das IGF-Bindungsprotein (insuline like growth factor binding protein, IGFBP)-3 festgestellt werden, welches eine Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 nur in Gegenwart eines funktionell aktiven T β R-II und nach vorausgeschalteter Aktivierung des T β R-I induziert. In verschiedenen Krebszelllinien evoziert IGFBP-3 sowohl eine TGF- β -unabhängige transiente Phosphorylierung von Smad2 und Smad3, ist aber auch in der Lage, die Wirkung von TGF- β zu verstärken und Smad3-spezifische Promotoren zu aktivieren (Fanayan et al., 2002; Fanayan et al., 2000). Es bleibt weiterhin zu klären, ob IGFBP-3 als direkter Ligand am TGF- β -Rezeptor agiert, intrazellulär den TGF- β -Rezeptor aktiviert oder ein Crosstalk zwischen den IGFBP-3-Rezeptoren und den TGF- β -Rezeptoren existiert. Auch für S1P konnte eine Notwendigkeit von funktionell aktiven TGF- β -Rezeptoren nachgewiesen werden, da XS52 Zellen in Anwesenheit eines inaktiven T β R-II, dessen ATP-Bindungsdomäne durch den Einsatz von SB-431542 blockiert wurde, kein migratorisches Signal auf einen S1P-Gradienten mehr lieferten. Diese Daten sind kongruent mit dem chemotaktischen Verhalten von Keratinozyten in Gegenwart von SB-431542 (Sauer et al., 2004a) und unterstreichen die Bedeutung funktioneller TGF- β -Rezeptoren in S1P-induzierten Smad-abhängigen Wirkungen.

4.2 Interaktion der S1P- und TGF- β -Rezeptoren

4.2.1 Interaktion von GPCRs und Wachstumsfaktorrezeptoren

Die PTX-sensitive Smad-Aktivierung in Keratinozyten und die fehlenden Effekte in Anwesenheit eines inaktiven T β R-II in Keratinozyten und DCs vermuten auf eine direkte Wechselwirkung der S1P- und der TGF- β -Rezeptoren. Interaktionen von GPCRs mit Wachstumsfaktorrezeptoren konnten bereits für S1P- und LPA-Rezeptoren mit Tyrosinkinaserzeptoren beschrieben werden und demonstrieren die Relevanz dieser Kreuzreaktion in der Signaltransduktion von Wachstumsfaktor- und LPL-induzierten Effekten (Pyne et al., 2003). So konnte an mehreren Zelltypen nachgewiesen werden, dass LPA ein Teil seiner Wirkungen durch Aktivierung des EGFR vermittelt, obgleich der LPA-Rezeptorsubtyp noch nicht identifiziert wurde (Liu and Armant, 2004; Noguchi et al., 2006). In humanen Bronchialepithelzellen induziert LPA durch Aktivierung der PKC- δ eine Phosphorylierung des EGFR. Interessant ist, dass die LPA-induzierte IL-3-Sekretion in diesen Zellen in Gegenwart von EGFR-

siRNA oder spezifischen EGFR-Antagonisten reduziert werden konnte (Zhao et al., 2006), was die funktionelle Bedeutung dieser Rezeptorinteraktion in biologischen Prozessen unterstreicht.

Ein solcher Crosstalk existiert auch zwischen aktivierten S1P₁ und PDGFR, da S1P₁^{-/-} Fibroblasten auf einen PDGF-Stimulus keine Aktivierung der FAK und Umordnung des Zytoskeletts einleiteten und dadurch nicht mehr in Antwort auf PDGF migrierten (Rosenfeldt et al., 2001). Weiterhin führt die Stimulation von S1P₁- und PDGFR-überexprimierenden HEK293 Zellen mit sowohl PDGF als auch S1P zu einer Dimerisierung beider Rezeptoren und anschließender Formierung von S1P₁/PDGFR-Komplex-beladenen endozytotischen Vesikeln. Eine indirekte Beteiligung von intrazellulär freigesetztem S1P durch Aktivierung der SPHK in Antwort auf PDGF kann ausgeschlossen werden, da die Anwesenheit von selektiven SPHK-Inhibitoren sowie die Expression einer dominant negativen SPHK keinen Einfluss auf die Effekte des thrombozytären Wachstumsfaktors ausübte (Waters et al., 2003). Die Endozytose von Rezeptoren stellt einen essentiellen Schritt in der Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden dar, so dass die Assoziierung von S1P₁/PDGFR-Komplexen mit phosphorylierter p42/44 MAPK auf funktionell aktive S1P₁/PDGFR-Komplexe hinweist. Ferner löste die simultane Stimulation mit PDGF und S1P eine verstärkte Internalisierung des Rezeptorkomplexes aus und erhöhte die Level an phosphorylierten p42/44 MAPK (Waters et al., 2003).

Es ist zu erwähnen, dass neben den LPL auch andere Agonisten von GPCRs mit Wachstumsfaktorrezeptoren interagieren und ihre Wirkungen durch Transaktivierung dieser Rezeptoren vermitteln. So induzieren AT1 (Angiotensin II Rezeptor Typ 1)-Agonisten in C9-Hepatozyten eine Phosphorylierung der Proteinkinase B (PKB) durch Transaktivierung des EGFR (Shah et al., 2006). In einer weiteren Publikation konnte eine Phosphorylierung des EGFR auch für aktivierte β_2 -Adrenozeptoren beschrieben werden (Kim et al., 2003). Ferner konnte gezeigt werden, dass Wachstumsfaktoren intrazelluläre Signalwege durch Aktivierung von einzelnen G-Proteinen aktivieren. Ein solcher Mechanismus konnte für IGF-1 (insulin-like growth factor-1) nachgewiesen werden, der in Fibroblasten keine Aktivierung der p42/p44 MAPK in Gegenwart von funktionell inaktiven G_i-Proteinen mehr auslöste (Luttrell et al., 1995). Weiterführende Studien ergaben, dass der aktivierte IGF-Rezeptor (IGFR) einen Komplex mit dem G_i-Protein formiert und durch die Abspaltung der $\beta\gamma$ -

Untereinheiten des G_i-Proteins die Aktivierung der p42/p44 MAPK induziert (Hallak et al., 2000).

In Anbetracht der bestehenden Interaktionen von GPCRs und Wachstumsfaktorrezeptoren, insbesondere des S1P₁ und des PDGFR, erschien eine Kreuzreaktion der S1P-Rezeptoren mit TGF-β-Rezeptoren sehr wahrscheinlich und konnte durch die Dimerisierung von TβR-I mit S1P₁ nach 30-minütiger Stimulation mit S1P an HA-Epitop markierten TβR-I überexprimierten XS52 Zellen anhand einer Immunpräzipitation gegen HA mit nachgeschalteter Westernblot-Analyse auf S1P₁ nachgewiesen werden. Diese Daten bestätigen erstmals das direkte Zusammenspiel von TGF-β- und S1P-Rezeptoren und erweitern das Rezeptorinteraktionspotential der LPL-Rezeptoren von Tyrosinkinase- auch auf Wachstumsfaktorrezeptoren mit einer Ser/Thr-kinase-Domäne.

4.2.2 Gegensätzliche Effekte von S1P auf die TGF-β-induzierten Wirkungen in XS52 Zellen

In Analogie zu den beschriebenen synergistischen Effekten von PDGF und S1P in HEK293 Zellen waren additive Wirkungen auch für TGF-β und S1P denkbar und konnten auf Ebene der Smad-Aktivierung und der Migration in XS52 Zellen bei gleichzeitiger Stimulation mit S1P und TGF-β nachgewiesen werden. In Anbetracht der bereits gemessenen Interaktion von S1P- und TGF-β-Rezeptoren erschien es nun als interessant zu prüfen, inwieweit durch eine vorgeschaltete Inkubation der Zellen mit TGF-β beziehungsweise S1P eine Cross-Desensitivierung der Rezeptoren verursacht wird.

In der Biologie von Immunzellen sind chemotaktische Signale von transienter Natur, da ihre Rezeptoren durch mehrere Mechanismen inaktiviert werden können (Rot and von Andrian, 2004). Zum einen können die G_α-Untereinheiten von GPCRs auch als GTPase agieren und lösen die Wiederherstellung der Ausgangskonformation des inaktiven Heterotrimers aus, zum anderen kann die Aktivierung der G-Proteine durch Phosphorylierung des Rezeptors über GPCRkinasen verhindert werden (Aragay et al., 1998). Auch eine Desensitivierung der Rezeptoren durch Internalisierungsprozesse ist möglich (Barlic et al., 1999; Fan et al., 2001).

Eine 30-minütige Vorinkubation mit TGF- β zeigte keinen Effekt auf die S1P-induzierte Migration, hingegen inhibierte die vorgeschaltete Stimulation von XS52 mit S1P das motogene Verhalten in Antwort auf TGF- β vollständig. Dieses Ergebnis war unerwartet, da bisher keine hemmende Wirkung von S1P auf Wachstumsfaktor-induzierte migratorische Prozesse beschrieben wurde und S1P neben PDGF auch an der Auslösung der EGF-induzierten Migration beteiligt ist (Hait et al., 2005; Sarkar et al., 2005). Bekannt ist, dass S1P-Konzentrationen im mikromolaren Bereich auf noch ungeklärte Weise die Migration von T-Zellen auf die Chemokine CCL5 und CCL21 inhibieren, während S1P im nanomolaren Bereich deren Migration fördert (Dorsam et al., 2003; Graeler et al., 2002). Jedoch scheint der Hemmeffekt von S1P in XS52 Zellen exklusiv für TGF- β zu bestehen, da S1P keinen Einfluss auf die MIP-3 α -evozierte Migration ausübt. Ferner ist die Beteiligung von posttranslationalen Prozessen aufgrund der geringen Inkubationszeit von 30 min äußerst unwahrscheinlich und konnte von einer anderen Arbeitsgruppe anhand einer mRNA Expressionsstudie für die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR5, CCR6 und CCR7 nach Stimulation mit S1P in *in vitro* generierten imDCs ausgeschlossen werden (Lan et al., 2005).

4.2.2.1 Beteiligung von ERK an den inhibierenden Effekten von S1P auf den TGF- β -Signalweg

Da eine Hemmung übergreifender migratorischer Mechanismen wie die Aktivierung von RAC aufgrund der unbeeinflussten Migration in Antwort auf MIP-3 α nicht involviert ist, war eine Inhibierung der zur Migration führenden Aktivierung von Smad-Proteinen in XS52 Zellen denkbar und konnte über eine Westernblot-Analyse bestätigt werden. Neben der Induktion von iSmads wird die Aktivität der rSmads auch durch Kinasen reguliert. Ein solcher Effekt wurde für die aktivierte MAPK Kaskade Erk beschrieben, die RSmads im Bereich der Linkerregion zwischen DNA-Bindungs- und der Transkriptionsaktivierungsdomäne phosphoryliert und die Translokation des heteromeren Smad-Komplexes in den Nukleus verhindert (Kretzschmar et al., 1997; Kretzschmar et al., 1999). Die Aktivierung der mit Transkriptionsfaktoren interagierenden ERK wird durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und deren Bindung an Rezeptoren mit einer Kinase-Aktivität initiiert und ist an der Regulation von proliferativen und antiapoptotischen Prozessen beteiligt (Massague, 1998). So

leitet TGF- β über Erk Smad-unabhängige Prozesse ein, kann aber auch den Smad-Signalweg inhibieren (Kretzschmar et al., 1999; Yu et al., 2002). Auch S1P führt zu einer transienten Aktivierung von Erk in mehreren Zelltypen (Cuvillier et al., 1996; Kranenburg and Moolenaar, 2001), die in Mesangiumzellen eine etwas schnellere Kinetik als die Smad-Phosphorylierung zeigte (Xin et al., 2004). Jedoch führte die Anwesenheit des selektiven Erk-Inhibitors PD 098059 zu keiner Aufhebung des S1P-induzierten Hemmeffekts der TGF- β -Wirkungen in XS52 Zellen, weder auf Ebene der Smad-Aktivierung noch bei den migratorischen Effekten. Dieses Ergebnis war zu vermuten, da die Rezeptor-assoziierte Smad-Phosphorylierung im SSXS Motiv am carboxyterminalen Ende der R-Smads nicht durch die Erk-induzierte Phosphorylierung in der Linkerregion behindert wird (Kretzschmar et al., 1999) und S1P bereits eine vollständige Hemmung der TGF- β -vermittelten Smad-Phosphorylierung in XS52 Zellen erzielt.

4.2.3 Internalisierung von S1P-Rezeptoren

Experimente in Anwesenheit von PTX lassen vermuten, dass $G_{\alpha i}$ -gekoppelte GPCRs die inhibierende Wirkung von S1P vermitteln. Weiterhin konnte durch Einsatz von Antisense-ODN S1P₁ als relevanter Rezeptor identifiziert werden. Somit scheint S1P₁ sowohl für die Aktivierung Smad-abhängiger Prozesse bei alleiniger Stimulation mit S1P und in Ko-stimulation mit TGF- β als auch für die hemmende Wirkung bei vorgeschalteter Gabe verantwortlich zu sein. Eine derart gegensätzliche Wirkung eines GPCRs in der Interaktion mit Wachstumsfaktorrezeptoren war bisher in der Literatur nicht beschrieben und sollte hinsichtlich des Mechanismus näher charakterisiert werden.

Es wird immer deutlicher, dass Rezeptoren nach Stimulation ihrer Liganden Signale nicht einfach durch Rekrutierung und Aktivierung von intrazellulären Signalproteinen weiterleiten, sondern von der Membran delokalisieren und über Internalisierungsprozesse unterschiedliche intrazelluläre Kompartimente ansteuern, um in Abhängigkeit der enthaltenen Signalmoleküle die Aktivierung oder Hemmung von Signalkaskaden beziehungsweise durch reduzierte Oberflächenexpression eine verringerte Sensitivität des Rezeptors zu induzieren. Mehrere Internalisierungsrouten für Rezeptoren konnten bisher beschrieben werden. Über die Clathrin-vermittelte Endozytose gelangen Rezeptoren hauptsächlich in die „early endosomes“. In diesen

Bereichen sind hohe Konzentrationen an Ubiquitin-bindenden Proteinen enthalten, so dass die Clathrin-abhängige Endozytose den Abbau einer Vielzahl von Rezeptoren über den Ubiquitin-Proteasomen-Signalweg induziert (Katzmann et al., 2001). Neben der Clathrin-vermittelten Endozytose können Rezeptoren über „lipid rafts“ internalisieren (Sharma et al., 2002). Ein Teil dieser „lipid rafts“ formiert Membraninvaginationen, die hohe Spiegel an Caveolin enthalten und demzufolge als „Caveolae“ bezeichnet werden (Anderson and Jacobson, 2002; Simons and Toomre, 2000).

Die Bedeutung der Rezeptorinternalisierung wird durch die Rolle der S1P₁-Expression und der S1P₁-S1P-Achse in der Regulation der Lymphozytenmigration zwischen dem Lymphsystem und dem Blut widergespiegelt, indem migratorische Effekte eng an die Oberflächenexpression von S1P₁ gekoppelt sind (Lo et al., 2005). So induziert S1P über eine Phosphorylierung von S1P₁ die Assoziierung des Rezeptors mit Caveolin-1 in der Membran und leitet die Translokation zur Kernmembran ein. Die Modifikation von S1P₁ mit einer zweiten Phosphatgruppe durch die Proteinkinase C-ε (PKC-ε) initiiert die Rückkehr des Rezeptors an die Zellmembran (Graeler et al., 2003; Rosen and Goetzl, 2005), ein Prozess, der in HEK293 Zellen bereits nach 2 h eine 80 %ige Wiederherstellung der Membranständigkeit von S1P₁ bewirkte (Liu et al., 1999). Dieser transiente Internalisierungsprozess demonstriert, dass Oberflächenrezeptor-induzierte Effekte nicht ausschließlich durch die Konzentration des Liganden, sondern auch durch die Membranständigkeit des Rezeptors reguliert werden, insbesondere bei Liganden mit sehr hohen und konstanten Konzentrationen wie S1P. Ein solcher Mechanismus konnte erstmals auch für LCs bestätigt werden, da durchflusszytometrische Untersuchungen an HA-Epitop markierten S1P₁ transfizierten XS52 Zellen eine vollständige Internalisierung von S1P₁ nach 30-minütiger Stimulation mit S1P ergaben. Weiterführende Fluoreszenzanalysen eines GFP-S1P₁-Konstrukts am konfokalen Mikroskop zeigten eine komplette Membrandelocalisierung und Anreicherung von S1P₁ in definierten zytosolischen Kompartimenten, was an der herdförmigen Assoziierung des Rezeptors im Zytosol erkennbar war.

4.2.4 Internalisierung von TGF- β -Rezeptoren

Analog zu S1P₁ sind auch für TGF- β -Rezeptoren Internalisierungsprozesse beschrieben wurden, jedoch scheinen TGF- β -Rezeptoren konstitutiv von der Membran zu delokalisieren, unabhängig von der Anwesenheit des nativen Liganden TGF- β (Di Guglielmo et al., 2003). Ferner internalisieren TGF- β -Rezeptoren über verschiedene endozytotische Routen und regulieren in Abhängigkeit des Internalisierungsweges den Smad-Signalweg. Zum einen internalisieren TGF- β -Rezeptoren über Clathrin-enthaltende Vesikel und akkumulieren bevorzugt in den „early endosomes“. In diesen Regionen sind hohe Konzentrationen des Smad2 und Smad3 Ankerproteins SARA enthalten, so dass aktivierte TGF- β -Rezeptoren durch Assoziation mit Clathrin-positiven Vesikeln eine Aktivierung des Smad-Signalweg induzieren. TGF- β -Rezeptoren können aber auch über Caveolae in die Zelle internalisieren. Da in den Caveolae vorwiegend Smad7 und Smurf2 angereichert sind, wird durch Bindung an Caveolin-reiche Vesikel die Inhibierung des Smad-Signalweges eingeleitet (Di Guglielmo et al., 2003; Hayes et al., 2002). In Einklang mit diesen Publikationen zeigten Oberflächenexpressionsstudien von T β R-I an exogen T β R-I exprimierenden XS52 Zellen keine Internalisierung des Rezeptors in Gegenwart von TGF- β , so dass auch in DCs von einem konstitutiven Internalisierungsprozess unabhängig von der Anwesenheit des nativen Liganden auszugehen ist.

Im nächsten Schritt war es von großer Bedeutung, die Oberflächenexpression von T β R-I in Antwort auf eine Stimulation mit S1P zu messen, da aufgrund der Dimerisierung von S1P₁ und T β R-I und der vollständigen Internalisierung von S1P₁ nach 30-minütiger Stimulation mit S1P die Präsenz von formierten heteromeren S1P₁-T β R-I-Komplexen in endozytotischen Vesikeln anzunehmen war. FACS-Analysen und mikroskopische Immunofluoreszenzanalysen von HA-T β R-I transfizierten XS52 Zellen demonstrierten, dass S1P zu einer vollständigen Internalisierung von T β R-I führt und eine dem S1P₁ analoge Verteilung im Zytosol bewirkt. Dieses Ergebnis war von entscheidender Bedeutung, da somit eine direkte Rezeptorinteraktion von der Dimerisierung von S1P₁ und T β R-I bis zur Internalisierung nachgewiesen wurde, die mit der inhibierenden Wirkung von S1P auf die TGF- β -induzierte Migration korreliert.

Neben der Interaktion von S1P₁ und dem PDGFR sind auch Wechselwirkungen von LPA mit Wachstumsfaktorrezeptoren beschrieben wurden. So bewirkt LPA in Abhängigkeit von G_{βγ}-Untereinheiten die Internalisierung des EGFR, obgleich die zur Internalisierung führenden Mechanismen noch ungeklärt sind (Kim et al., 2003). Weiterhin besteht ein Crosstalk zwischen LPA₁ und dem Tyrosinkinase-Rezeptor TRK A, die in Anwesenheit von LPA oder NGF, dem Liganden von TRK A, als Komplex zur Kernmembran translokalisieren und eine Aktivierung der p42/p44 MAPK induzieren. Interessant ist, dass durch Einsatz von LPA₁-Antisense-ODN die NGF-vermittelte Aktivierung der p42/p44 MAPK reduziert ist (Moughal et al., 2004). Diese Studien demonstrieren, dass LPL mit mehreren Wachstumsfaktorrezeptoren interagieren und deren Signalwege beeinflussen. Allerdings unterscheiden sich die existierenden Interaktionen von LPL-Rezeptoren mit Wachstumsfaktoren von den Wechselwirkungen des S1P₁ und TβR-I, da nur die Stimulation mit S1P zu einer Dimerisierung der Rezeptoren führt und in Abhängigkeit von der zeitlichen Gabe sowohl eine Aktivierung als auch eine Hemmung der TGF-β-Effekte induzieren kann.

4.3 Physiologische Relevanz der S1P₁-Oberflächenexpression und des Crosstalks mit TGF-β-Rezeptoren in Immunzellen

Die Zirkulation von Lymphozyten zwischen dem Lymphsystem und dem Blut wird hauptsächlich durch die Expression von S1P₁ und dem Konzentrationsunterschied des LPL im Serum und den Lymphknoten reguliert. In Antwort auf hohe S1P-Serumspiegel migrieren Lymphozyten aus den Lymphorganen in afferente Lymphgefäße und treten in das Blutsystem ein (Lo et al., 2005). Demgegenüber stehen diverse Chemokine, die mit der motogenen Wirkung von S1P konkurrieren. Eine große Bedeutung wird den Chemokinen CCL19/CCL21 zugeschrieben, welche in den Endothelzellen der HEVs produziert werden und die Rekrutierung der Lymphozyten in die sekundären Lymphorgane induzieren (Forster et al., 1999; Miyasaka and Tanaka, 2004). In Folge der geringen S1P-Konzentration in den Lymphknoten regeneriert S1P₁ auf der Lymphozytenmembran und initiiert den Austritt der Lymphozyten in efferente Lymphgefäße (Lo et al., 2005). Ferner wird durch die Expression von S1P₁ in ausdifferenzierten Thymozyten deren Austritt ins Blut eingeleitet (Gill et al., 2003; Matloubian et al., 2004). In der Milz induziert S1P eine erhöhte humorale Immunantwort gegenüber löslichen Antigenen, indem B-

Lymphozyten in der Marginalzone zurückgehalten werden, einem Bereich, der stark durchblutet ist und hohen Kontakt zu Antigenen bewährt (Cinamon et al., 2004). Diese Prozesse unterstreichen die Relevanz des S1P₁ an der Homeostase der Lymphozytenmigration und vermuten analoge Mechanismen in LCs. So ist eine Beteiligung von S1P an der Rekrutierung von LCs aus der Dermis denkbar. Da die Verankerung von LCs in der Dermis von TGF- β abhängig ist, lässt sich vermuten, dass S1P durch die Internalisierung von T β R-I eine Mobilisierung von LCs aus der Haut mit anschließender Migration in afferente Lymphgefäße infolge des S1P-Gradienten einleitet.

Neben ihrer Bedeutung als APCs partizipieren DCs auch als Mediatoren der angeborenen Immunität und beeinflussen durch die Sekretion von Zytokinen entscheidend die Infektionsabwehr des betroffenen Areals. Da hohe Konzentrationen von TGF- β und S1P in Thrombozyten gespeichert sind und in der frühen Phase der Wundheilung sekretiert werden, könnten beide Substanzen einen additiven Effekt in der Rekrutierung von DCs ins Wundareal ausüben und dadurch die bakterielle Abwehr verstärken.

4.4 Bedeutung von FTY720 in der Biologie von LCs

Die Funktion des S1P-Signalweges in der Regulation der Lymphozytenmigration nahm mit der Entdeckung, dass die strukturanaloge Substanz FTY720 seine immunsuppressive Wirkung durch Interaktion mit S1P-Rezeptoren erzielt (Mandala et al., 2002), stark an Bedeutung zu. So induziert FTY720 eine langanhaltende Internalisierung von S1P₁ in Lymphozyten und verhindert die migratorische Antwort der Lymphozyten auf den S1P-Gradienten in den efferenten Lymphgefäßen. Ferner besitzen FTY720 behandelte Mäuse starke Ähnlichkeiten mit dem Phänotyp von Mäusen, in denen sämtliche Lymphozytenpopulationen vom S1P₁-Gen deletiert wurden, was die Relevanz von S1P₁ unterstreicht (Graeler and Goetzl, 2004; Matloubian et al., 2004). Dies offenbart einen völlig neuen Wirkmechanismus, da FTY720 seine immunsuppressive Wirkung im Vergleich zu den derzeitigen verwendeten therapeutischen Regimes nicht durch Inhibierung der IL-2-Signale oder Hemmung der DNA-Synthese, sondern durch Retention der Lymphozyten in den peripheren Lymphknoten mit einhergehender Lymphopenie entfaltet.

Die Mechanismen und Wirkungen von FTY720 in Lymphozyten wurden bereits vielfach untersucht, hingegen ist wenig bekannt über die Wirkungen auf DCs. In Anbetracht der Expression von S1P-Rezeptoren und der migratorischen Effekte nach Stimulation mit S1P sind zelluläre Effekte auch für das Analogon FTY720 anzunehmen. Erste *in vitro* Untersuchungen zeigten keine erhöhte Zellbewegung in einem FTY720-Gradienten und stehen in Einklang mit der fehlenden Migration von T-Zellen auf einen FTY720-Stimulus (Czeloth et al., 2005). Interessant ist, dass FTY720 nur marginal die S1P-induzierte Migration in DCs hemmte (Czeloth et al., 2005). Durchflusszytometrische Analysen zur Bestimmung der Oberflächenexpression von S1P₁ an XS52 Zellen bestätigten auch für DCs eine Internalisierung des Rezeptors in Gegenwart von FTY720. Da ein Teil der migratorischen Effekte in DCs über S1P₃ vermittelt wird (Czeloth et al., 2005; Radeke et al., 2005), könnte dieser Rezeptorsubtyp die fehlenden Signale von S1P₁ kompensieren. Ferner führte die Stimulation von Mäusen mit FTY720 zu einer Reduktion an DCs in den Lymphknoten und erhöhte deren Anzahl im Blut (Lan et al., 2005). Dieser Effekt wird begleitet durch eine Downregulation von CCR7, so dass die verringerte Migration wahrscheinlich indirekt durch eine reduzierte Wirkung der Lymphknotenassoziierten Chemokine CCL19/CCL21 hervorgerufen wird (Lan et al., 2005).

Es ist zu erwähnen, dass in einer weiteren Publikation FTY720 keine Veränderung der LC Anzahl in der Haut bewirkte (Czeloth et al., 2005). Dies war laut unseren Ergebnissen nicht zu erwarten, da FTY720 in XS52 Zellen die Oberflächenexpression von TβR-I nahezu vollständig reduzierte und auch die TGF-β-induzierte Migration inhibierte. Allerdings ist wenig bekannt über die Verweildauer von LCs in der Haut. Da TGF-β eher die Rekrutierung von DC-Vorläufern ins dermale Gewebe reguliert, lässt sich vermuten, dass erst die Anwendung von FTY720 über einen längeren Zeitraum eine Veränderung der LC-Population in der Dermis bewirkt. Trotz alledem konnte erstmals eine Beteiligung des TGF-β-Signalweges in dem Wirkmechanismus von FTY720 nachgewiesen werden und erweitert den Einfluss des Immunsuppressivums von Lymphozyten auf DCs, insbesondere im Hinblick auf den TGF-β1^{-/-} Phänotyp.

4.5 Ausblick

Es wird immer deutlicher, dass FTY720 seine immunsupprimierende Wirkung nicht ausschließlich durch Interaktion mit Lymphozyten erzielt, sondern vielmehr immunologische Prozesse in einer Reihe von Immunzellpopulationen reguliert. Ferner scheinen weitere Zelltypen an der FTY720-induzierten Immunsuppression beteiligt zu sein, von denen die Bedeutung der Lymphknotenassoziierten Endothelzellen bisher identifiziert werden konnte. Auch existieren Unterschiede in der Rezeptorinteraktion von FTY720 zwischen den einzelnen Zelltypen. Um ein umfassendes Verständnis über den Mechanismus dieser neuartigen Substanz zu erhalten, bedarf es der genauen Charakterisierung der Funktionen der einzelnen Rezeptorsubtypen, insbesondere der FTY720-Rezeptorinteraktion und dessen Internalisierungswege. Diese Studien sollten an mehreren organspezifischen Zellen durchgeführt werden, um das Nebenwirkungspotential auszuloten und als Basis für die Entwicklung und die Testung von selektiven S1P-Rezeptor-Agonisten beziehungsweise Antagonisten zu dienen. Weiterhin konnte erstmals in dieser Forschungsarbeit eine mögliche Beteiligung des TGF- β -Signalweges in der Transduktion der FTY-Effekte in DCs nachgewiesen werden. Um die *in vivo* Relevanz dieser Interaktion zu prüfen, sollte in Tiermodellen das migratorische Verhalten von markierten LC-Precursor näher untersucht werden. In der Literatur wurde bereits an mehreren Zelltypen die Bedeutung der Smad-Protein-Signalkaskade in der Vermittlung von S1P-induzierten zellulären Effekten beschrieben. Die Mechanismen dieser zugrunde liegenden Wechselwirkungen konnten in der vorliegenden Arbeit durch den Nachweis der S1P₁/T β R-I Interaktion näher charakterisiert werden. Aufgrund der Sequenzhomologie zwischen den S1P-Rezeptoren sind Wechselwirkungen nicht nur für S1P₁ anzunehmen, so dass im Rahmen weiterführender Studien die Rolle sämtlicher S1P-Rezeptoren untersucht werden sollte. Aktivierte TGF- β -Rezeptoren erreichen ihre intrazellulären Signalproteine durch Internalisierungsprozesse und sind in Abhängigkeit der angesteuerten Kompartimente in der Lage eine Aktivierung beziehungsweise eine Hemmung intrazellulärer Signalkaskaden auszulösen. Für S1P-Rezeptoren sind diese Routen weitaus weniger bekannt. Angesichts der gegensätzlichen Effekte von S1P auf die TGF- β -induzierte Smad-Aktivierung in DCs wäre es von großer Bedeutung, die Internalisierungswege der formierten Rezeptorkomplexe zu

charakterisieren. Darüber hinaus gilt es, die Interaktionen von S1P- und TGF- β -Rezeptoren auch in anderen Immunzellpopulationen, insbesondere der Lymphozyten, zu testen. So konnte eindrucksvoll an Tierexperimenten und in Zellkulturversuchen nachgewiesen werden, dass FTY720 seine immunsuppressive Wirkung durch Retention der Lymphozyten in den Lymphknoten infolge einer langanhaltenden Internalisierung von S1P₁ verursacht. Durch die Beobachtung, dass S1P in DCs die Internalisierung von T β R-I induziert, sind analoge Mechanismen auch in Lymphozyten zu vermuten, so dass eine mögliche Beteiligung der TGF- β -Rezeptoren in den FTY-induzierten Effekten in Lymphozyten untersucht werden sollte.