

5 ZUSAMMENFASSUNG

5 Zusammenfassung

DCs wurden bereits im Jahre 1864 aufgrund ihrer ungewöhnlichen Morphologie durch den Medizinstudenten Paul Langerhans entdeckt, jedoch erkannte man ihre immunologische Funktion erst ein Jahrhundert später, so dass die DCs letztendlich 1973 durch Steinman und Cohn als letzte Immunzellpopulation identifiziert wurden. Mittlerweile ist bekannt, dass DCs über die Verbindung von Phagozytose und Antigenpräsentation als Schaltstelle zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem fungieren. Im Gegensatz zu den B-Zellen und den Makrophagen sind DCs die APCs, welche die meisten T-Zell-Antworten induzieren. Sie sind die einzigen Zellen, die in Abwesenheit von aktivierten T-Zellen professionell Antigen präsentieren und gleichzeitig T-Zellen ko-stimulieren können. DCs gelten als Initiatoren spezifischer Immunantworten, besitzen aber auch eine zentrale Bedeutung in der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz gegenüber Autoantigenen. Einen essentiellen Schritt in der Ausübung dieser Funktionen stellt die Migration in die Lymphknoten dar, weil erst durch den Kontakt mit T-Zellen eine immunologische Antwort induziert werden kann. Eine derart zentrale Funktion in der Regulation der Migration zwischen dem Blut- und dem Lymphsystem konnte für Lymphozyten dem Lipidmediator S1P zugeordnet werden. S1P vermittelt ein Großteil seiner Effekte durch GPCRs der EDG-Familie, die auch als S1P-Rezeptoren bezeichnet werden. Eine Real-Time PCR Analyse bestätigte erstmals die Anwesenheit von mRNA-Transkripten der S1P-Rezeptoren S1P₁, S1P₂, S1P₃ und S1P₄ in imLCs. Im Unterschied zu den mLCs sind die Stimuli für die Migration von mLCs aus der Dermis in die Lymphknoten bisher nur unzureichend charakterisiert. Tatsächlich konnte eine konzentrationsabhängige chemotaktische Wirkung des Lipidmediators S1P auf imLCs nachgewiesen werden. Obwohl LPA, ein weiterer Vertreter aus der Gruppe der LPL, der wie S1P Rezeptoren der EDG-Familie aktiviert, in verschiedenen Zellen eine chemotaktische Wirkung besitzt, war LPA nicht in der Lage eine migratorische Wirkung in imLCs zu induzieren. Diese Daten stehen in Einklang mit der marginalen Anwesenheit von mRNA-Transkripten sämtlicher LPA-Rezeptoren in imLCs. Weiterführende Untersuchungen in Gegenwart von Antisense-ODN identifizierten die Subtypen S1P₁ und S1P₃ als migrationsauslösende Rezeptoren, während über S1P₂ die S1P-induzierte Migration gehemmt wurde. Auch führte die Stimulation von imLCs

mit S1P zu einer mit TGF- β vergleichbar starken Migration. Der von Keratinozyten in hohen Konzentrationen sezernierte Wachstumsfaktor besitzt eine essentielle Funktion in der Rekrutierung von LCs in die Dermis, da Mäusen mit ausgeschaltetem TGF- β 1-Gen selektiv LCs in der Dermis fehlten.

TGF- β stellt einen Wachstumsfaktor dar, der ähnlich wie das Lysophospholipid S1P von aktivierten Thrombozyten sekretiert wird und in erhöhten Konzentrationen im Wundareal vorliegt. Beide Mediatoren zeichnen sich durch analoge Eigenschaften bezüglich der Migration und Proliferation von epidermalen Zellen aus. Im Gegensatz zu S1P konnten die intrazellulären Signalwege von TGF- β bereits identifiziert werden. In der bedeutendsten Signalkaskade führt die Bindung des Wachstumsfaktors an TGF- β Typ-I und Typ-II-Rezeptoren zu einer Phosphorylierung von R-Smads, die nun in ihrem aktivierten Zustand mit dem Ko-Smad4 heteromerisieren und nach der Translokation in den Zellkern direkt oder durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren Genaktivitäten regulieren. In unserem Arbeitskreis konnte erstmals an Keratinozyten nachgewiesen werden, dass S1P in Analogie zu TGF- β den Smad-Signalweg auf allen Stufen aktiviert und auch seine migratorischen und antiproliferativen Eigenschaften durch Aktivierung von Smad3 entfaltet. Ferner zeigten Studien an Smad3^{-/-} Mäusen, dass die TGF- β -induzierte Infiltration von Monozyten und Granulozyten ins Wundareal ebenfalls Smad3-abhängig ist. Dahingehend sollte geprüft werden, ob dieses Signalprotein eine essentielle Bedeutung für die chemotaktischen Wirkungen von TGF- β und S1P in imLCs besitzt. Interessant ist, dass sowohl die chemotaktische Wirkung von TGF- β als auch die von S1P an Smad3-defizienten imLCs nahezu vollständig aufgehoben wurde. Untersuchungen an imLCs nach Stimulation mit S1P zeigten ebenfalls eine Aktivierung von Smad3, die eine mit dem Wachstumsfaktor vergleichbare Kinetik aufwies. In weiterführenden Experimenten konnten additive Effekte von TGF- β und S1P bei gleichzeitiger Gabe auf Ebene der Migration und Smad2-Phosphorylierung nachgewiesen werden. Eine Besonderheit trat allerdings auf, wenn imLCs zunächst mit S1P für 30 min stimuliert wurden und anschließend die Migration in einem TGF- β Gradienten gemessen wurde. Unter diesen Bedingungen zeigten imLCs keine erhöhte Migration in Antwort auf TGF- β und waren nicht mehr in der Lage, eine Smad2-Phosphorylierung zu induzieren. Durch den Einsatz von S1P₁-Antisense konnte dieser Rezeptorsubtyp als essentiell für die S1P-induzierte Hemmung der TGF- β -Effekte in imLCs ausgewiesen werden. Da die vorgeschaltete Stimulation mit

S1P bereits die Smad2-Phosphorylierung in Antwort auf TGF- β hemmte, und R-Smads direkt durch aktivierte TGF- β -Rezeptoren phosphoryliert werden, erschien eine Interaktion auf Ebene der Rezeptoren als wahrscheinlich. Eine solche Wechselwirkung wurde bereits für S1P₁ und PDGFR beschrieben. Im nächsten Schritt war es wichtig, die Funktionalität der TGF- β -Rezeptoren nach Stimulation mit S1P zu überprüfen. Dahingehend wurden imLCs mit einem HA-Epitop markierten T β R-I transfiziert und anschließend durchflusszytometrisch und fluoreszenzmikroskopisch auf die Oberflächenexpression von T β R-I hin untersucht. Beide Versuche bestätigten eine nahezu vollständige Internalisierung des T β R-I infolge einer S1P-Stimulation, aber nicht in Antwort auf den natürlichen Liganden TGF- β . Von S1P₁ ist bekannt, dass dieser Rezeptor in Lymphozyten nach dem Kontakt mit S1P einen transienten Internalisierungsprozess durchläuft. Ferner nehmen die Oberflächenexpression des S1P₁ und der steigende Konzentrationsgradient von S1P zwischen den Lymphknoten und dem Blutsystem eine zentrale Bedeutung in der Regulation der Lymphozytenmigration zwischen diesen Kompartimenten ein. Anhand durchflusszytometrischer und fluoreszenzmikroskopischer Analysen an HA-Epitop markierten S1P₁ transfizierten imLCs konnte erstmals die Internalisierung des S1P₁ infolge einer S1P-Stimulation auch für DCs nachgewiesen werden. Um zu prüfen, ob ein direkter Crosstalk zwischen S1P₁ und T β R-I die S1P-induzierte Hemmung des Smad-Signalweges vermittelt, wurde eine Immunpräzipitation des exogenen T β R-I gefolgt von einer Westernblot-Analyse gegen S1P₁ durchgeführt. Die Ergebnisse ergaben, dass die Stimulation mit S1P eine Dimerisierung des S1P₁ und T β R-I induzierte und verifizierten die direkte Wechselwirkung dieser Rezeptoren.

Auch die Stimulation mit FTY720, einem S1P-Struktur analogon, welches zurzeit als Immunsuppressivum in klinischen Studien der Phase III zur Behandlung der schubförmigen Multiplen Sklerose getestet wird und seine Wirkung durch die langanhaltende Internalisierung des S1P₁ mit einhergehender Retention sämtlicher Lymphozytenpopulationen in den Lymphknoten vermittelt, führte zu einer Internalisierung des T β R-I und zu einer Hemmung der TGF- β induzierten Migration in imLCs. Somit konnte erstmalig eine Beteiligung des TGF- β -Signalweges in dem Wirkmechanismus von FTY720 nachgewiesen werden und DCs neben den Lymphozyten als Zielzellen von FTY720 identifiziert werden.

DCs had first been discovered by the medical student Paul Langerhans because of their remarkable morphology. However, the immunological functions of DCs had not been clarified until 1973 when Steinman and Cohn identified them as the last immune cell type. Recently it's known that DCs act as an interface between the inherent and specific immune system due to their capability to present antigens and to induce phagocytosis. In comparison to B-cells and macrophages DCs provoke most of the T-cell responses. They are the only APCs which are able to contemporaneously present antigens and to costimulate naive T-cells in the absence of activated T-cells. Furthermore, they are not only considered as inducers of immune responses but additionally take a central role in maintaining immune tolerance towards self antigens. In order to fulfil their function they have to migrate from peripheral sites into the lymph nodes because their immune responses are primarily mediated through the interaction with T-cells. The lipid mediator S1P has been identified as a key regulator in guiding T-cells between the blood and the lymphatic system. S1P mediates most of its effects through GPCRs of the EDG-family which have been renamed as S1P₁₋₅. In this study a Real-Time PCR analysis revealed for the first time the presence of mRNA transcripts of S1P₁, S1P₂, S1P₃ and S1P₄ in imLCs. In contrast to mLCs the migratory stimuli which recruit mLCs from the dermis into the lymph nodes have not been clarified in detail. Indeed, a chemotactic activity of S1P in a concentration dependent manner was proofed on imLCs. Although LPA, which in analogy to S1P signals through receptors of the EDG-family, has been identified to promote migration in a variety of cells, this lysophospholipid failed to induce chemotaxis of imLCs. These data correlate to the marginal expression of mRNA-transcripts of all LPA-receptor subtypes in imLCs. To further elucidate which of the expressed S1P receptor subtypes are involved in the migration process, Antisense experiments were performed. The results revealed that S1P₁ and S1P₃ were responsible for the S1P-induced migration whereas S1P₂ possessed antimigratory properties. The chemotactic response of imLCs towards S1P was comparable to the migratory behavior induced by TGF- β . This growth factor is highly produced by keratinocytes and seems to be crucial for the recruitment of imLCs into the dermis since TGF- β 1^{-/-} mice completely lack LCs in the dermis. TGF- β is in analogy to S1P secreted by activated platelets and is found at high concentrations in the wound area. Both mediators exert similar effects on migratory and proliferative responses of epidermal cells. In contradiction to S1P the signaling

pathways of TGF- β are well characterized. In the most important signaling cascade the binding of TGF- β on TGF- β type I- and type II-receptors leads to a phosphorylation of R-smads which in turn heteromerize with Smad4 and translocalize into the nucleus to regulate gene transcription. In our research group it was first demonstrated that S1P in analogy to TGF- β activates the Smad-protein-cascade on every particular stage in keratinocytes and mediates its migratory and antiproliferative effects on these cells through an activation of Smad3. Furthermore, studies on Smad3^{-/-} mice revealed that the infiltration of monocytes and granulocytes into the wound area is also mediated by Smad3. In order to proof the importance of this intracellular mediator in S1P- and TGF- β -evoked chemotaxis of imLCs migratory experiments were performed. Indeed, the migratory behavior of both substances was abrogated in Smad3-deficient imLCs. It is of interest, that stimulation of imLCs with S1P also induced an activation of Smad3 which exhibited a similar kinetic as TGF- β . Further analysis revealed additive effects of TGF- β and S1P on the level of migration and Smad2-phosphorylation when imLCs were stimulated simultaneously with both substances. An unexpected result occurred when imLCs were first preincubated with S1P for 30 min and then analyzed according to their migratory behavior in response to TGF- β . Under these circumstances imLCs were not able to migrate towards TGF- β and failed to induce a Smad2-phosphorylation after stimulation with this cytokine. The use of Antisense-ODN identified S1P₁ as the crucial receptor subtype responsible for the S1P-induced inhibition of TGF- β -effects in imLCs. Since preincubation of imLCs with S1P already abrogates the TGF- β -evoked Smad2-phosphorylation and Smad-proteins are directly phosphorylated by activated TGF- β -receptors, an interaction of TGF- β - and S1P-receptors was conceivable. Such a crosstalk had already been published for S1P₁ and PDGFR. Therefore it was important to analyze the functionality of TGF- β -receptors after stimulation of imLCs with S1P. To address this topic imLCs were transfected with a HA-epitop tagged T β R-I receptor and subsequently analyzed according to their surface expression of T β R-I by flow cytometry and immunofluorescence microscopy. Both experiments revealed a complete internalization of T β R-I in response to S1P, whereas the natural ligand TGF- β did not promote an internalization of T β R-I. In the S1P-receptor system it has been known that S1P₁ undergoes an internalization process following S1P-stimulation. The surface expression of S1P₁ and the rising concentration gradient of S1P between the lymph nodes and the blood take a central role in regulating the

movement of lymphocytes between these compartments. In order to proof if a direct receptor interaction provokes the S1P-induced inhibition of TGF- β -signaling an immunoprecipitation of the exogenous T β R-I followed by westernblot analysis for S1P₁ was performed. The results show that stimulation of imLCs with S1P induced a dimerization of S1P₁ and T β R-I which substantiates the direct interaction of these receptors.

It is of interest that the structural analog of S1P, FTY720, also induced an internalization of T β R-I and inhibited TGF- β -signaling in imLCs comparable to S1P. FTY720 is a new immunosuppressive agent which is currently undergoing clinical phase III studies for the treatment of patients with relapsing multiple sclerosis. This novel immunomodulator promotes its immunosuppressive effect through a prolonged internalization of S1P₁ which results in a retention of lymphocytes in the lymph nodes. These data indicate an involvement of the TGF- β -signaling-cascade in the mechanism of FTY720 and identified imLCs as target cells of this new immunosuppressive agent.