

Aus der Arbeitsgruppe Gastroenterologische Immuntherapie

Leiter: PD Dr. med. A. Eigler

Medizinische Klinik Innenstadt

Klinikum der Universität

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Die Rolle von Sphingosin-1-phosphat und Sphingosinkinase  
bei der Migration von dendritischen Zellen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Veronika Jakl

aus München

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. A. Eigler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. M.-C. Jung  
PD Dr. med. P. Kufer

Mitbetreuung durch die  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. M. Dauer  
Dr. med. S. Eigenbrod

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.2009

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Das humane Immunsystem.....	1
1.1.1 Die zwei Komponenten des humanen Immunsystems .....	1
1.1.2 Die verschiedenen Erkennungsmechanismen der adaptiven und der angeborenen Immunantwort .....	2
1.2 Dendritische Zellen als Mittler zwischen angeborener und adaptiver Immunität ..	3
1.2.1 Die verschiedenen Entwicklungsstadien dendritischer Zellen und ihre jeweilige Funktion.....	3
1.2.2 Die Migration von dendritischen Zellen.....	5
1.2.3 Überblick über die Charakterisierung und Gewinnung dendritischer Zellen ..	7
1.2.4 Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen .....	10
1.3 Antigenpräsentation und T-Zell-vermittelte Immunität .....	13
1.3.1 Antigenpräsentation auf MHC-I-Molekülen .....	13
1.3.2 Antigenpräsentation auf MHC-II-Molekülen .....	15
1.3.4 Präsentation von Lipid-Antigenen auf CD1-Molekülen.....	16
1.3.5 T-Zell-Aktivierung .....	16
1.3.6 T-Zell-Toleranz.....	17
1.4 Tumorimmuntherapie mit dendritischen Zellen.....	18
1.5 Sphingosin-1-phosphat und Sphingosinkinase.....	21
1.5.1 Aufbau und Abbau von Sphingosin-1-phosphat.....	21
1.5.2 Signalvermittlung durch S1P .....	22
1.6 Fragestellung der Arbeit.....	23
2. Material und Methoden .....	25
2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	25
2.1.1 Geräte .....	25
2.1.2 Chemikalien .....	25
2.1.3 Material für Zellisolation, Zellkultur und Zellmigration .....	26
2.1.4 Medien und Lösungen für Zellkultur und Zellmigration .....	28
2.1.5 Puffer .....	28
2.1.6 Reagenzienansätze.....	29
2.2 Isolation und Kultur von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen.....	29
2.2.1 Isolation von Monozyten.....	29
2.2.2 Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität .....	31
2.2.3 Kultur von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen.....	31
2.3 Durchflusszytometrie.....	32

2.3.1 Grundlagen der Durchflusszytometrie .....	32
2.3.2 Bestimmung der zellulären Oberflächenmoleküle.....	34
2.3.3 Messung der intrazellulären Calciumkonzentration.....	34
2.4 Migrationsversuche .....	36
2.4.1 <i>Transwell assay</i> .....	36
2.4.2 Bestimmung der Anzahl der migrierten Zellen .....	36
2.4.3 Verwendete Chemokine und Inhibitoren.....	37
2.5 Reverse-Transkription-Polymerase-Ketten-Reaktion.....	37
2.5.1 Allgemeines Funktionsprinzip .....	37
2.5.2 RNA-Isolierung.....	38
2.5.3 Durchführung der Reverse-Transkription-Polymerase-Ketten-Reaktion .....	38
2.5.4 Gelelektrophorese .....	40
2.5.5 Semiquantitative Auswertung .....	41
2.6 Western Blot .....	41
2.6.1 Allgemeines Funktionsprinzip.....	41
2.6.2 Probenvorbereitung.....	42
2.6.3 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	42
2.6.3 Durchführung der <i>Sodium-dodecyl-sulfate</i> -Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	43
2.6.4 Proteintransfer.....	43
2.6.5 Proteindetektion .....	44
2.6.6 Strippen von Membranen .....	45
2.6.7 Auswertung .....	45
2.7 Statistische Auswertung .....	45
3. Ergebnisse.....	47
3.1 Durchflusszytometrische Charakterisierung der Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen.....	47
3.2 Expression der Sphingosinkinase in unreifen und reifen dendritischen Zellen...	48
3.3 Einfluss der Sphingosinkinase auf die Migration dendritischer Zellen.....	50
3.3.1 Abhängigkeit der Migration unreifer dendritischer Zellen von der Sphingosinkinase.....	50
3.3.2 Unabhängigkeit der Migration reifer dendritischer Zellen von der Sphingosinkinase.....	51
3.4 Abhängigkeit der Migration unreifer dendritischer Zellen auf S1P von der Rho-Kinase.....	52
3.5 Expression der S1P-Rezeptoren bei dendritischen Zellen.....	53

3.5.1 Untersuchung der S1P-Rezeptor-Expression mittels semiquantitativer PCR .....	53
3.5.2 Untersuchung der S1P-Rezeptor-Expression mittels Western Blot.....	54
3.6 Abhängigkeit der Migration unreifer dendritischer Zellen auf S1P vom Rezeptor S1P <sub>3</sub> .....	56
3.7 Untersuchung der Calciumkonzentration in unreifen dendritischen Zellen bei Stimulation mit Chemokinen und S1P .....	57
3.7.1 Erhöhung der Calciumkonzentration in unreifen dendritischen Zellen durch Stimulation mit S1P.....	57
3.7.2 Unabhängigkeit des Chemokin-vermittelten Calciumkonzentrationsanstiegs in unreifen dendritischen Zellen von der Sphingosinkinase .....	57
4. Diskussion .....	62
4.1 Übersicht über die Ergebnisse .....	62
4.2 Methodendiskussion .....	63
4.3 Diskussion der Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur.....	64
4.3.1 Vergleich der Sphingosinkinase-Expression bei dendritischen Zellen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien .....	65
4.3.2 Der Einfluss von S1P auf die Migration dendritischer Zellen.....	66
4.3.3 Vergleich der Expression der S1P-Rezeptoren bei dendritischen Zellen in verschiedenen Entwicklungsstadien.....	67
4.3.4 Rolle der S1P-Rezeptoren bei der Migration unreifer dendritischer Zellen auf S1P.....	68
4.3.5 Rolle der Proteine der Rho-Familie bei der Migration unreifer dendritischer Zellen auf S1P .....	68
4.3.6 Rolle der Sphingosinkinase bei der Migration unreifer und reifer dendritischer Zellen.....	70
4.3.7 Einfluss von S1P und Sphingosinkinase auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration.....	73
4.4 Klinische Relevanz.....	76
5. Zusammenfassung .....	80
6. Literaturverzeichnis.....	82
8. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme.....	94
9. Danksagung.....	96
10. Veröffentlichungen.....	97
11. Lebenslauf .....	98

# 1. Einleitung

## 1.1 Das humane Immunsystem

Der menschliche Körper ist ständig sowohl durch eindringende Mikroorganismen als auch durch pathologisch veränderte eigene Zellen in seiner Unversehrtheit bedroht. Die Zellen und Mechanismen, die den Menschen vor diesen Angriffen von außen und innen schützen, werden unter dem Begriff Immunsystem zusammengefasst. Es ist die zentrale Aufgabe des Immunsystems gesundes „Selbst“ von pathologischem „Fremd“ zu unterscheiden. Unter „Fremd“ werden neben Mikroorganismen auch pathologisch umgewandelte körpereigene Zellen, wie Tumorzellen und virusinfizierte Zellen subsumiert. Bei der Erkennung und Zerstörung fremder Substanzen und Zellen durch das Immunsystem muss gleichzeitig Schutz und Toleranz gegenüber den gesunden Bestandteilen des eigenen Körpers bestehen. [Chaplin, 2003; Chaplin, 2006; Janeway et al., 2002].

### 1.1.1 Die zwei Komponenten des humanen Immunsystems

Das Immunsystem wird traditionell in die zwei Komponenten adaptive und angeborene Immunität eingeteilt.

Das adaptive Immunsystem wird durch zwei Klassen spezialisierter Zellen repräsentiert, die B- und T-Lymphozyten. Diese Zellen sind Träger Antigen-spezifischer T- und B-Zellrezeptoren. Durch die somatische Rekombination von Rezeptorkodierenden Genelementen während der Lymphozytenreifung entstehen Millionen von verschiedenen Rezeptoren, so dass jeder Lymphozyt mit einem individuell einzigartigen Antigen-spezifischen Rezeptor ausgestattet ist. Falls die passenden Antigene an diese spezifischen Rezeptoren binden, werden die Lymphozyten aktiviert. Über die Expression bestimmter Gene kommt es zur klonalen Expansion, also der Vermehrung des Lymphozyten mit diesem Rezeptor, und zur Differenzierung zu Effektorzellen, die Strukturen und Zellen mit diesem Antigen wirkungsvoll bekämpfen. Die klonale Expansion und Differenzierung der Lymphozyten sind für eine effiziente Immunantwort notwendig, allerdings nehmen diese Prozesse einige Tage in Anspruch.

Neben dieser zeitlich verzögerten, Antigen-spezifischen adaptiven Immunantwort existiert die sofort wirksame, unspezifische angeborene Immunität. Zu den Bestandteilen dieser evolutionsgeschichtlich älteren Komponente des Immunsystems

werden unter anderem epitheliale Barriere, mukoziliäres System, Lysozym, Komplementsystem und bestimmte Phagozytose-fähige Zellen gezählt. Das angeborene Immunsystem kann eingedrungene Mikroorganismen erkennen und sofort bekämpfen. Außerdem aktiviert es über die Präsentation von Antigenen und über die Sekretion von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen das adaptive Immunsystem. Das adaptive Immunsystem nutzt wiederum Effektormechanismen der angeborenen Immunität, um die spezifische Immunantwort zu verstärken. Insgesamt sind die beiden Komponenten des Immunsystems eng vernetzt und wirken synergistisch.

### **1.1.2 Die verschiedenen Erkennungsmechanismen der adaptiven und der angeborenen Immunantwort**

Die T- und B-Lymphozyten der adaptiven Immunität erkennen Antigene über ihre spezifischen T- und B-Zellrezeptoren (TZR bzw. BZR) auf ihrer Oberfläche. Wie bereits beschrieben, entstehen die variablen Antigen-bindenden Regionen der TZR und BZR durch somatische Rekombination zufällig während der Lymphozytenreifung. Bei der somatischen Rekombination kommt es zu einer Genumlagerung bei der verschiedene Genelemente jeweils aus einer Vielzahl von Keimbahn-kodierten Genelementen selektiert und miteinander verbunden werden. Zusammen kodieren diese zufällig ausgewählten Genelemente die variable Region der Antigenrezeptoren. Die Rezeptoren selbst werden also nicht in der Keimbahn kodiert, sondern entstehen in jeder Generation neu. Aus diesem riesigen Repertoire an Lymphozyten mit verschiedenen TZR und BZR eines Menschen werden diejenigen selektiert, die zur Antigenerkennung fähig sind und dabei keine Autoreaktivität besitzen. Die Bindung eines für seinen einzigartigen Rezeptor spezifischen Antigens führt dann zur klonalen Expansion und Differenzierung des Lymphozyten und somit zu einer effizienten Immunantwort.

Im Gegensatz zu den TZR und BZR der adaptiven Immunität werden die Rezeptoren der angeborenen Immunität in der Keimbahn kodiert. Diese Rezeptoren haben sich während der Evolution zu spezifischen Rezeptoren für Mikroorganismen herausgebildet und können von einer Generation zur nächsten weitergegeben werden. Es handelt sich dabei um sogenannte *pattern recognition receptors* (PRRs). Diese Rezeptoren erkennen bestimmte molekulare Strukturen, die gemeinsamer Bestandteil zahlreicher Mikroorganismen sind und im Laufe der Evolution konserviert wurden, jedoch nicht im Wirtsorganismus vorkommen [Akira et al., 2006; Medzhitov et al., 2000]. Zu diesen molekularen Strukturen, die *pathogen-associated molecular patterns*

(PAMPs) genannt werden, zählt beispielsweise Lipopolysaccharid (LPS). Die PRRs werden von zahlreichen Effektorzellen der angeborenen Immunität exprimiert, vor allem von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) wie Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen [Aliprantis et al., 1999; Brightbill et al., 1999; Hornung et al., 2002; Muzio et al., 2000; Peiser et al., 2002]. Im Gegensatz zu den BZR und TZR der adaptiven Immunantwort exprimieren dabei alle Zellen einer Subpopulation die PRRs einer identischen Spezifität und nach Stimulation der PRRs erfolgt eine unmittelbare Reaktion der Rezeptor-tragenden Zelle. Zur Familie der PRRs gehören unter anderem die *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) [Akira et al., 2006].

## **1.2 Dendritische Zellen als Mittler zwischen angeborener und adaptiver Immunität**

### **1.2.1 Die verschiedenen Entwicklungsstadien dendritischer Zellen und ihre jeweilige Funktion**

Dendritische Zellen (DCs) gehören zur Gruppe der Antigen-präsentierenden Zellen und besitzen einzigartige Eigenschaften, die es ihnen ermöglichen, primäre Immunantworten gegen eindringende Pathogene zu induzieren und die Bildung des immunologischen Gedächtnisses zu initiieren [Banchereau et al., 1998; Hart, 1997; Steinman, 1991]. Dabei können DCs die Abwehrmechanismen sowohl der angeborenen Immunität als auch der adaptiven Immunität aktivieren [Banchereau et al., 2000].

Unreife DCs entstehen aus myeloiden Vorläuferzellen des Knochenmarks und verteilen sich über das Blut in den peripheren Geweben. Sie kontrollieren als Wächter des Immunsystems ihre Umgebung, indem sie ständig extrazelluläre Bestandteile aufnehmen, um eindringende Pathogene zu erkennen und gegebenenfalls eine Immunantwort zu induzieren. Unreife DCs akkumulieren unter dem Einfluss von Chemokinen schnell an den Stellen im Körper, wo Entzündungsprozesse stattfinden oder Krankheitserreger eingedrungen sind [McWilliam et al., 1994].

Für eine effiziente Antigenaufnahme nutzen sie verschiedene Mechanismen, wie die Phagozytose, die Makropinozytose und die rezeptorvermittelte Endozytose [Albert et al., 1998; Engering et al., 1997; Fanger et al., 1996; Jiang et al., 1995; Reis e Sousa et al., 1993; Sallusto et al., 1995]. Bei der Makropinozytose werden große pinozytotische Vesikel gebildet, um extrazelluläre Flüssigkeit mit darin gelösten Antigenen aufzunehmen. Bei der rezeptorvermittelten Endozytose tragen die bereits beschriebenen PRRs dazu bei, Mikroorganismen zu erkennen. DCs exprimieren eine

Vielzahl an PRRs, wie TLRs, Scavenger-Rezeptoren und Lektin-Rezeptoren [Gordon, 2002; Krug et al., 2001].

Die DCs prozessieren die aufgenommenen Antigene und präsentieren sie als Peptide auf ihrer Zelloberfläche auf sogenannten MHC-Molekülen (*major histocompatibility complex*). T-Lymphozyten sind dann in der Lage, mit ihrem TZR spezifische Antigene, die auf MHC-Molekülen präsentiert werden, zu erkennen [Svensson et al., 1997].

Die Differenzierung der unreifen Antigen-aufnehmenden DC zur reifen Antigen-präsentierenden DC wird durch die Antigenerkennung, dem Verhältnis zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen und der Interaktion mit T-Lymphozyten gesteuert. Pathogen-assoziierte Moleküle wie Lipopolysaccharid (LPS) oder bakterielle DNA, proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-6 und die Wechselwirkung zwischen DC und T-Zelle über CD40 führen zur Reifung der DC [Caux et al., 1994; Hartmann et al., 1999; Jonuleit et al., 1997; Rescigno et al., 1999; Sparwasser et al., 1998]. Außerdem können auch endogene Gefahrensignale wie Proteine aus nekrotischen Zellen DCs aktivieren und zu ihrer Reifung beitragen [Gallucci et al., 1999].

Der Prozess der Ausreifung der DCs führt zu zahlreichen Veränderungen bezüglich Phänotyp und Funktion. Es kommt zum Verlust der ausgeprägten Fähigkeit zur Endozytose und Phagozytose und zu einer verstärkten Präsentation von Antigenen auf MHC-II-Molekülen auf der Zelloberfläche. Zusätzlich wird die Expression des DC-Aktivierungsmarkers CD83 und die Expression kostimulatorischer Proteine wie CD40, CD80 und CD86 auf der Zelloberfläche hochreguliert. Kostimulatorische Proteine spielen bei der Aktivierung von T-Zellen eine entscheidende Rolle. Außerdem kommt es zur Sekretion immunregulativer Zytokine wie IL-12 [Caux et al., 1994; Cella et al., 1997; Cella et al., 1996].

Nach Aktivierung und Induktion des Ausreifungsprozesses durch z.B. Bestandteile von Mikroorganismen oder proinflammatorischen Zytokinen verlassen die DCs die peripheren Gewebe und wandern in die drainierenden Lymphknoten, wo sie in den T-Zell-Arealen mit T-Lymphozyten interagieren können [Sallusto et al., 1998]. Reife DCs sind die potentesten Antigen-präsentierenden Zellen des Immunsystems, da sie unter anderem mehr MHC-Komplexe und zusätzliche kostimulatorische Moleküle für T-Lymphozyten im Vergleich zu anderen APCs exprimieren [Inaba et al., 1997].

### 1.2.2 Die Migration von dendritischen Zellen

Die Migration von DCs ist essentiell, um eine optimale Immunantwort zu generieren. Dabei weisen DCs abhängig von ihrem jeweiligen Aktivierungsgrad verschiedene migratorische Verhaltensmuster auf und erfüllen dabei jeweils unterschiedliche Funktionen im Rahmen der Immunantwort. Die Migration von DCs erfolgt als Antwort auf Chemokine und chemotaktische Agonisten, die nicht der Klasse der Chemokine angehören. Chemokine sind eine bestimmte Gruppe von Cytokinen, die als Chemoattraktoren die Wanderung von Zellen mit den dazu passenden Rezeptoren zur Quelle dieser Chemokine bewirken [Sozzani et al., 1999].

DCs reagieren abhängig von ihrem Reifegrad auf verschiedene Chemokine (siehe Tabelle 1) [Banchereau et al., 2000; Sozzani, 2005]. Vorläuferzellen aus dem Knochenmark wandern über die Blutbahn in die peripheren nicht-lymphatischen Gewebe aus und differenzieren dort zu unreifen DCs. Die Lokalisierung der unreifen DCs in den peripheren Geweben wird über bestimmte Chemokine vermittelt. Im Falle einer Entzündung oder dem Eindringen von Mikroorganismen kommt es durch dort ansässige Zellen zur Sekretion von inflammatorischen Chemokinen, wie *macrophage inflammatory protein (MIP-) 1 $\alpha$*  und *monocyte chemotactic protein (MCP-) 1*, durch die unreife DCs angelockt werden, die die passenden Rezeptoren exprimieren [Allavena et al., 2000; Sallusto et al., 1998]. So akkumulieren DCs schnell an Orten, an denen sich Antigene befinden. Diese Akkumulation wurde beispielsweise in der Lunge für die Inhalation von Antigenen nachgewiesen [McWilliam et al., 1996; McWilliam et al., 1994]. Im peripheren Gewebe nehmen unreife DCs dann wie bereits beschrieben Antigene auf. Zusätzlich können DCs nach Aktivierung durch pathogene Stimuli selbst Chemokine sezernieren und auf diese Weise weitere DCs und andere Immunzellen zum Ort der Entzündung locken [Sallusto et al., 1999].

Die Aktivierung von DCs beispielsweise durch Bestandteile von Mikroorganismen oder proinflammatorischen Zytokinen führt zu weitreichenden phänotypischen Veränderungen, unter anderem auch zur Veränderung der Funktion und Expression der verschiedenen Chemokinrezeptoren (siehe Tabelle 1). Die Chemokinrezeptoren der unreifen DCs, die vor allem auf inflammatorische Chemokine ansprechen, werden desensitiviert und ihre Expression wird herunterreguliert. Gleichzeitig wird der Chemokinrezeptor CCR7 vermehrt exprimiert. CCR7 stellt den Rezeptor für die Chemokine MIP-3 $\beta$  und 6CKine (= SLC, *secondary lymphoid tissue chemokine*) dar. MIP-3 $\beta$  und 6CKine vermitteln die Migration der DCs über die lymphatischen Gefäße in die T-Zell-Regionen der sekundären lymphatischen Organe wie Lymphknoten und Milz.

Dort sind die eingewanderten DCs vermutlich an der Sekretion von MIP-3 $\beta$  und 6CKine beteiligt und tragen so dazu bei, dieses chemotaktische Signal aufrecht zu erhalten [Banchereau et al., 2000]. Neben den DCs werden durch die Expression von MIP-3 $\beta$  und 6CKine in den Lymphknoten auch naive T-Lymphozyten angelockt [Campbell et al., 1998; Gunn et al., 1998]. Auf diese Weise wird das Zusammentreffen von DCs und T-Zellen zur Antigenpräsentation in den lymphatischen Organen erleichtert.

**Tabelle 1 Expression der Chemokinrezeptoren auf unreifen und reifen dendritischen Zellen**

<b>Chemokinrezeptor</b>	<b>Ligand</b>
<b>Unreife DC</b>	
CCR1	MIP-1 $\alpha$ , RANTES, MCP-3, MIP-5
CCR2	MCP-1, MCP-2, MCP-4
CCR4	TARC, MDC
CCR5	MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES
CCR6	MIP-3 $\alpha$
CCR8	I-309
CXCR1	IL-8
CXCR4	SDF-1
<b>Reife DC</b>	
CCR7	MIP-3 $\beta$ , 6CKine
CXCR4	SDF-1

Nach Banchereau und Sozzani [Banchereau et al., 2000; Sozzani, 2005].

I-309 = CCL1; MCP (= *monocyte chemotactic protein*) -1 = CCL2; MIP (= *macrophage inflammatory protein*) -1 $\alpha$  = CCL3; MIP-1 $\beta$  = CCL4; RANTES (*regulated on activation, normal T expressed and secreted*) = CCL5; MCP-3 = CCL7; MCP-2 = CCL8; MCP-4 = CCL-13; MIP-5 = CCL15; TARC (*thymus and activation regulated chemokine*) = CCL17; MIP-3 $\beta$  = CCL-19; MIP-3 $\alpha$  = CCL20; 6CKine = SLC (= *secondary lymphoid tissue chemokine*) = CCL21; MDC (*monophage derived chemokine*) = CCL22; IL-8 = CXCL8; SDF-1 (= *stromal cell-derived factor 1*) = CXCL12

Die Chemokinrezeptoren gehören zur Familie der GPCRs (*G protein-coupled receptors*). Dabei dienen heterotrimere G-Proteine den Rezeptoren als Signalvermittler. Bei der Bindung der Chemokine an die Rezeptoren wird eine Untereinheit der G-Proteine durch die Beladung mit GTP (Guanosintri-phosphat) aktiviert. Dies ermöglicht die Bindung von verschiedenen Liganden an die Untereinheiten der G-Proteine und führt anschließend zur Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege. Zu den wichtigsten bekannten Signaltransduktoren gehören die Adenylatzyklase und die Phospholipase C. Die Phospholipase C spaltet Phosphatidylinositolbisphosphat in Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin (DAG).

IP<sub>3</sub> führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration. Zusammen mit DAG werden dadurch bestimmte Isoformen der Proteinkinase C aktiviert [Kehrl, 2006]. Diese aktivieren wiederum weitere Signaltransduktionsketten und beeinflussen dabei unter anderem die Morphologie des Zytoskeletts [Larsson, 2006].

DCs exprimieren neben den Chemokinrezeptoren auch eine Reihe an Rezeptoren für chemotaktische Agonisten, die sich von Chemokinen unterscheiden. Dazu gehören beispielsweise Rezeptoren für bakterielle Bestandteile, für bioaktive Lipide und für Gefahrensignale wie Hitzeschockproteine. Außerdem gibt es zahlreiche Faktoren wie verschiedene Prostaglandine, die die Migration von DCs fördern oder hemmen können. Die Expression der Chemokinrezeptoren ist also nicht allein entscheidend für das Migrationsverhalten der DCs, da es in vivo zahlreiche Faktoren gibt, die die DC-Migration modulieren [Sozzani, 2005].

### **1.2.3 Überblick über die Charakterisierung und Gewinnung dendritischer Zellen**

Langerhans beschrieb 1868 erstmals die DCs der Haut, die Langerhans-Zellen (LCs). Steinman und Cohn entdeckten 1973 DCs in der Milz von Mäusen. Charakteristisch für die DC ist ihr mikroskopisches Erscheinungsbild. Sie weist eine irreguläre Form mit zahlreichen Ausläufern der Zellmembran auf [Steinman et al., 1973]. Im Laufe der achtziger Jahre wurde erkannt, dass DCs und LCs ein gemeinsames System von Immunzellen bilden [Schuler et al., 1985].

DCs konnten anfangs nur anhand mikroskopisch-morphologischer oder funktioneller Kriterien von anderen Immunzellen wie Monozyten und Makrophagen unterschieden werden, wodurch sich ihre Isolierung problematisch gestaltete. Im Laufe der Zeit konnten jedoch Oberflächenmoleküle identifiziert werden, in deren Expression sich DCs charakteristischerweise von anderen APCs unterscheiden. Mit Hilfe monoklonaler Antikörper gegen diese Oberflächenmoleküle konnte die Isolierung von DCs entscheidend verbessert werden [Hart, 1997]. DCs wurden nach verschiedenen Protokollen über Adhärenz [Steinman, 1991], Dichtegradientenzentrifugation oder Depletion anderer Zellen gewonnen. Für die Methode der Dichtegradientenzentrifugation ist die Tatsache entscheidend, dass die mehrtägige Kultur von PBMCs in vitro zu einer Aktivierung der darin enthaltenen DCs mit einer Größenzunahme und einer Verringerung ihrer Dichte führt. So können die DCs auf Grund ihrer geringeren Dichte über Zentrifugation mit speziellen Dichtegradient-Medien isoliert werden. Die Depletionsmethode beruht darauf, dass die nicht-dendritischen Zellen entfernt werden. Dabei werden verschiedene Mischungen aus monoklonalen Antikörpern verwendet, die an die spezifischen Oberflächenmarker bestimmter anderer

Leukozytenpopulationen wie B-Lymphozyten oder Monozyten binden. Auf diese Weise werden die DCs als sogenannte lineage negative Zellpopulation negativ selektiert. Seit der Entdeckung von Oberflächenmolekülen, die für DCs charakteristisch sind, können DCs mit den entsprechenden monoklonalen Antikörpern auch positiv selektiert werden [Hart, 1997]. So erleichterte beispielsweise die Entdeckung des Oberflächenmoleküls CD83 [Zhou et al., 1992] auf DCs deren Isolation und durchflusszytometrische Charakterisierung [Zhou et al., 1995].

In den letzten Jahren sind immer mehr DC-Subtypen in lymphatischen und nicht lymphatischen Geweben sowie im Blut bei Menschen und Mäusen beschrieben worden, die sich in der Expression von Oberflächenmolekülen unterscheiden. So finden sich in menschlichen Lymphknoten zumindest drei verschiedene Arten von DCs [Wan et al., 2005]. Dabei können die verschiedenen Subtypen von DCs verschiedene Immunantworten wie  $T_H1$ - oder  $T_H2$ -Antworten oder sogar Toleranz gegenüber Antigenen induzieren. Bei der Entwicklung der DC-Subtypen spielen unterschiedliche Vorstufen und die Plastizität von DCs unter dem Einfluss von lokalen externen Faktoren wie Zytokinen eine entscheidende Rolle [Shortman et al., 2002].

Aus dem menschlichen peripheren Blut lassen sich zirkulierende DCs isolieren, die als HLA-DR<sup>+</sup>lineage<sup>-</sup> definiert sind, wobei die Bezeichnung lineage alle Zellen einschließt, die Oberflächenmarker für Lymphozyten, Granulozyten oder Monozyten exprimieren [Bonasio et al., 2006]. Dabei können zwei Untergruppen unterschieden werden, die CD11c<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup> sogenannten plasmazytoiden DCs (pDCs), die lymphoide Marker exprimieren, und die CD11c<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup> sogenannten myeloiden DCs (myDCs), die myeloide Marker exprimieren [MacDonald et al., 2002; Robinson et al., 1999]. Auf Grund der Expression der verschiedenen Oberflächenmarker wird vermutet, dass pDCs von lymphoiden und myDCs von myeloiden Vorläuferzellen abstammen. Für diese Hypothese sprechen ferner, dass unterschiedliche Wachstumsfaktoren und Transkriptionsfaktoren für die Entwicklung dieser beiden Subtypen nötig sind [Spits et al., 2000] und dass sie bezüglich Zytokinsekretion und PRR-Expression unterschiedliche Profile aufweisen [Hornung et al., 2002; Kadowaki et al., 2001; Krug et al., 2001]. Die unterschiedliche Expression von PRRs hat zur Annahme geführt, dass sich die plasmazytoiden und die myeloiden DCs im Laufe der Evolution auf die Erkennung von verschiedenen Pathogenen spezialisiert haben könnten [Shortman et al., 2002].

Neben der direkten Isolierung von DCs aus dem peripheren Blut des Menschen können auch DC-Vorläuferzellen aus dem Blut gewonnen und in vitro zu DCs differenziert werden.

Ein großer Nachteil der direkten Gewinnung von DCs besteht darin, dass die Fraktion der DCs weniger als ein Prozent der mononukleären Zellen im peripheren Blut des Menschen darstellt, und daher nur eine geringe Anzahl an DCs direkt isoliert werden kann. Allerdings kann durch die Gabe von Wachstumsfaktoren wie Flt3-Ligand die Menge der in der Blutbahn zirkulierenden CD11c<sup>+</sup> und CD11c<sup>-</sup> DC-Subpopulationen erhöht werden, und somit eine höhere Ausbeute bei der direkten Isolierung aus dem peripheren Blut erzielt werden [Maraskovsky et al., 2000; Pulendran et al., 2000]. Die Vorteile bei der Generierung von DCs aus Vorläuferzellen in vitro bestehen unter anderem darin, dass die Differenzierung unter kontrollierten Bedingungen stattfindet, und dass eine größere Anzahl an DCs gewonnen wird.

Es lassen sich mindestens vier DC-Subtypen unterscheiden, die mittels verschiedener Zytokine in vitro generiert werden können – plasmazytoide DCs und drei verschiedene Arten von myeloiden DCs, nämlich Langerhans-Zellen (LCs), sogenannte dermale oder interstitielle DCs und Monozyten-abgeleitete DCs [Rossi et al., 2005].

Aus dem menschlichen Blut lassen sich CD4<sup>+</sup>, IL-3-Rezeptor<sup>+</sup> und CD11c<sup>-</sup> plasmazytoide Interferon-produzierende Zellen isolieren, die Vorläuferzellen für reife plasmazytoide DCs darstellen. Unter dem Einfluss von IL-3 und CD-40-L entwickeln sich die pDC-Vorläufer zu reifen pDCs [Grouard et al., 1997; Siegal et al., 1999].

LCs befinden sich in vivo in der epithelialen Oberfläche von Haut und Schleimhaut, während dermale bzw. interstitielle DCs sich in den subepithelialen Hautschichten bzw. im interstitiellen Gewebe von Organen befinden. In vitro werden LCs und dermale bzw. interstitielle DCs aus CD34<sup>+</sup> hämatopoietischen Vorläuferzellen aus Knochenmark oder Nabelschnurblut unter dem Einfluss von GM-CSF und TNF- $\alpha$  über unterschiedliche Zwischenstufen generiert [Caux et al., 1992; Caux et al., 1996; Reid et al., 1992]. Mittlerweile ist es auch möglich beispielsweise mit G-CSF CD34<sup>+</sup> hämatopoetische Stammzellen zu mobilisieren und über Leukapherese aus dem peripheren Blut zu isolieren [Banchereau et al., 2001]. Die Differenzierung ist jeweils von verschiedenen Zytokinkombinationen abhängig. Die Entwicklung zu LCs erfolgt in Gegenwart von TGF (*transforming growth factor*) - $\beta$  [Strobl et al., 1996]. LCs enthalten Birbeck Granula und weisen charakteristische Oberflächenmarker wie Langerin auf. Dermale und interstitielle DCs besitzen hingegen keine Birbeck Granula und exprimieren CD9, CD68 und Gerinnungsfaktor XIIIa als charakteristische Oberflächenmoleküle [Rossi et al., 2005].

Die Hypothese, dass DCs von Monozyten abgeleitet werden können, wurde 1991 von Peters et al. aufgestellt [Peters et al., 1991]. Sallusto und Lanzavecchia gelang es

1994 zum ersten Mal, unter mehrtägiger Inkubation mit IL-4 und GM-CSF aus adhärennten PBMCs DCs zu generieren [Sallusto et al., 1994]. Dabei blieb ungeklärt, aus welcher Subpopulation der mononukleären Zellen die DCs entstehen. Romani et al. verwendeten ebenfalls PBMCs zur Generierung von DCs [Romani et al., 1994] und zeigten 1996, dass die Differenzierung dieser DCs in vitro aus CD34<sup>+</sup> nicht proliferierenden Vorläuferzellen des peripheren Bluts erfolgt [Romani et al., 1996]. Ebenfalls 1996 beobachteten Zhou et al. schließlich, dass DCs aus CD14<sup>+</sup> Monozyten des peripheren Bluts mit Hilfe bestimmter Zytokinkombinationen generiert werden können [Zhou et al., 1996].

Die unterschiedlichen DC-Subtypen können verschiedene Funktionen erfüllen. So können reife Monozyten-abgeleitete DCs IL-12 sezernieren, das naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen in T<sub>H</sub>1-Zellen polarisiert. T<sub>H</sub>1-Zellen produzieren unter anderem IFN- $\gamma$  und stimulieren vor allem die zellvermittelte Immunabwehr. Reife pDCs induzieren eher T<sub>H</sub>2-Antworten. T<sub>H</sub>2-Zellen regulieren vor allem die Antikörper-vermittelte Immunabwehr über die Produktion von IL-4, IL-5 und IL-10 [Rissoan et al., 1999]. Allerdings weisen die Subtypen abhängig von den äußeren Bedingungen ein hohes Maß an funktioneller Plastizität auf, was die genaue Zuordnung eines Subtyps zu einer bestimmten Funktion erschwert. Beispielsweise können Monozyten-abgeleitete DCs unter dem Einfluss von IL-10 oder PGE<sub>2</sub> auch T<sub>H</sub>2-Antworten induzieren [Liu et al., 2001].

DCs können also je nach Differenzierungsgrad, Subtyp und funktioneller Plastizität unter dem Einfluss von externen Stimuli verschiedene Funktionen im Immunsystem erfüllen. Die meisten Erkenntnisse über die verschiedenen DC-Subtypen und ihre jeweiligen Funktionen wurden jedoch nicht über ihre direkte Isolation aus den entsprechenden lymphatischen und nicht-lymphatischen Organen gewonnen, sondern über Experimente mit in vitro generierten DCs. Inwiefern die Ergebnisse dieser Experimente auf die Bedingungen in vivo übertragen werden können, ist noch nicht geklärt.

### **1.2.4 Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen**

Die Experimente von Sallusto und Lanzavecchia von 1994 bilden die Grundlage der heutigen Protokolle zur Generierung von Monozyten-abgeleiteten DCs [Sallusto et al., 1994]. Unter der Inkubation mit IL-4 und GM-CSF wurde die Differenzierung von adhärennten PBMCs zu unreifen DCs beobachtet. Die Aktivierung dieser unreifen DCs erfolgte durch die Inkubation mit TNF- $\alpha$  oder CD40-Ligand für 24 Stunden.

Inzwischen gibt es neben der Adhärenzmethode auch die Möglichkeit Monozyten durch Leukapharese [Thurner et al., 1999] oder mittels immunomagnetischer Selektion [Babatz et al., 2003] zu isolieren. Bei der immunomagnetischen Isolierung wird eine positive oder negative Selektion einer bestimmten Zellpopulation durch monoklonale Antikörper, die gegen bestimmte Oberflächenmarker gerichtet und an magnetische Partikel gekoppelt sind, durchgeführt.

Die CD14<sup>+</sup> Monozyten wandeln sich *in vitro* unter dem Einfluss von M-CSF zu Makrophagen, in Gegenwart von GM-CSF und IL-4 entwickeln sie sich hingegen zu unreifen DCs. Die Aktivierung von unreifen Monozyten-abgeleiteten DCs kann durch zahlreiche Stimuli induziert werden. So führen Pathogen-assoziierte Moleküle wie LPS oder bakterielle DNA, proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und die Wechselwirkung zwischen DC und T-Zelle z.B. über CD40 zur Reifung der DC [Caux et al., 1994; Hartmann et al., 1999; Jonuleit et al., 1997; Rescigno et al., 1999; Sparwasser et al., 1998]. Zur Ausreifung der unreifen DCs wurde zuerst vor allem *monocyte conditioned medium* (MCM) verwendet [Reddy et al., 1997]. MCM entstand durch die Kultur von Monozyten in Kulturschalen, die mit IgG beschichtet waren. Es enthielt proinflammatorische Mediatoren wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN- $\alpha$ . Problematisch war die Tatsache, dass die Bestandteile des MCM nicht genau definiert waren und die proinflammatorischen Mediatoren in ihrer Konzentration variierten, wodurch der Reifeprozess der DCs von der individuellen Qualität des MCM abhing. Jonuleit et al. beobachteten 1997, dass der definierte Cocktail aus TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und PGE<sub>2</sub> dem MCM bezüglich der DC-Ausreifung überlegen war [Jonuleit et al., 1997]. Dieser Zytokincocktail wird seitdem häufig vor allem in der Tumormimmuntherapie zur Ausreifung von DCs verwendet, allerdings existieren zahlreiche weitere Protokolle, die beispielsweise nur TNF- $\alpha$  oder TNF- $\alpha$  in anderen Kombinationen benutzen. Auch IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , CD40-Ligand oder LPS werden verwendet. Reife Monozyten-abgeleitete DCs exprimieren in hohem Maß CD83, CD86 und MHC-II, jedoch kein CD14 mehr [Ardavin et al., 2001; Banchereau et al., 2005].

Ein entscheidender Nachteil bei dem Gebrauch von Monozyten-abgeleiteten DCs in klinischen und experimentellen Studien besteht darin, dass sie nicht einer bekannten humanen DC-Subpopulation *in vivo* entsprechen. Allerdings häufen sich in den letzten Jahren Hinweise dafür, dass Monozyten auch *in vivo* zu DCs differenzieren können.

Neben den zahlreichen Experimenten zur mehrtägigen DC-Entwicklung aus Monozyten mittels proinflammatorischen Mediatoren *in vitro*, wurden auch Studien mit Modellen durchgeführt, die sich möglichst weit an physiologische Abläufe im Menschen

annähern. Außerdem wurde die Differenzierung von Monozyten zu DCs in vivo an Mäusen untersucht.

Randolph et al. beschrieben ein neues Kultursystem, in dem Monozyten innerhalb von zwei Tagen zu DCs differenzierten [Randolph et al., 1998]. Dabei wurden keine Zytokine verwendet, sondern die Differenzierung der Monozyten erfolgte bei deren Migration durch Endothelzellschichten und zwar in der Richtung von extraluminal nach intraluminal. Es ist denkbar, dass ein zu der reversen Transmigration in diesem Modell äquivalenter migratorischer Prozess in vivo stattfindet, nämlich die Migration von Monozyten aus dem peripheren Gewebe in die Lymphgefäße. Dieser migratorische Prozess in vivo könnte dann ähnlich wie im Modell zur Differenzierung von Monozyten zu DCs beitragen. Weitere Experimente von Randolph et al. zeigten, dass sich humane CD16<sup>+</sup> Monozyten bei der reversen Transmigration häufiger zu DCs entwickelten als Monozyten, die kein CD16 exprimierten [Randolph et al., 2002]. Diese Ergebnisse liefern Hinweise dafür, dass die CD16<sup>+</sup> Monozyten-Subpopulation in besonderem Maße für die Differenzierung zu DCs prädisponiert ist und somit insbesondere CD16<sup>+</sup> Monozyten als Vorläuferzellen für die DC-Entwicklung in vivo dienen könnten. Außerdem gibt es weitere in vitro Studien, die die Hypothese stützen, dass Monozyten als DC-Vorläuferzellen dienen. So zeigten Dauer et al., dass sich reife DCs innerhalb von 48 h aus Monozyten in vitro unter dem Einfluss bestimmter proinflammatorischer Mediatoren entwickeln lassen [Dauer et al., 2003]. Dieses Modell der schnellen Differenzierung könnte bezüglich des zeitlichen Rahmens näher an der physiologischen Differenzierung in vivo sein, als die weiter oben beschriebenen bisherigen mehrtägigen Generierungsprotokolle. Des Weiteren wurde die spontane Differenzierung von CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> Monozyten zu DCs bei der Kultur von humanen PBMCs ohne den Zusatz von Zytokinen beschrieben [Ho et al., 2002].

Neben den Versuchen zur Differenzierung von Monozyten in vitro existieren Studien an Mausmodellen in vivo. Randolph et al. und später Rotta et al. verwendeten ein experimentelles System, bei dem fluoreszierende Latexpartikel subkutan injiziert wurden. Anhand dieser Partikel konnten die Zellen, die diese aufgenommen hatten, verfolgt werden. Dabei ergaben sich Hinweise, dass Monozyten, die diese Partikel zuerst an der Injektionsstelle aufgenommen hatten, später als DCs in den drainierenden Lymphknoten wieder gefunden wurden [Randolph et al., 1999; Rotta et al., 2003]. Es existieren außerdem noch zahlreiche weitere Studien, die belegen, dass verschiedene murine Monozyten-Subpopulationen existieren, die zu DCs differenzieren können [Leon et al., 2005].

All diese Experimente unterstützen die Theorie, dass Monozyten auch beim Menschen unter physiologischen Umständen zu DCs differenzieren können, wobei noch nicht bekannt ist, welche humanen DC-Subpopulationen in lymphatischen oder nicht-lymphatischen Geweben unter welchen Bedingungen aus welchen Monozyten-Subpopulationen entstehen können. Es sind also noch zahlreiche Fragen bezüglich der Rolle von Monozyten bei der Entwicklung von DCs *in vivo* offen.

### 1.3 Antigenpräsentation und T-Zell-vermittelte Immunität

Eine große Herausforderung für das Immunsystem besteht darin, eigene Zellen, die von Pathogenen infiziert wurden, zu erkennen. Dabei spielen T-Zellen eine entscheidende Rolle und müssen daher gleichzeitig pathogene und körpereigene Strukturen erkennen. Wie bereits erläutert, entstehen durch somatische Rekombination eine große Anzahl jeweils einzigartiger TZR. Mittels TZR können T-Zellen nur Antigene erkennen, die in prozessierter Form als kurzkettige Peptide auf körpereigenen Molekülen an der Zelloberfläche präsentiert werden. Diese körpereigenen Moleküle sind Glykoproteine und werden MHC (*major histocompatibility complex*)-Moleküle oder auch HLA (*human leukocyte antigen*) genannt.

Es gibt zwei verschiedene Klassen von MHC-Molekülen, nämlich MHC-I- und MHC-II-Moleküle. MHC-I-Moleküle werden von allen kernhaltigen körpereigenen Zellen exprimiert. Auf MHC-I-Molekülen werden Peptidfragmente von im Zytosol gebildeten Proteinen präsentiert und von CD8-T-Zellen mittels TZR erkannt. MHC-II-Moleküle werden nur von Antigen-präsentierenden Zellen wie DCs, B-Zellen und Makrophagen gebildet. Auf ihnen werden Peptidfragmente von Antigenen präsentiert, die zuvor von den APCs aus dem Extrazellulärraum aufgenommen wurden. Mit Peptiden beladene MHC-II-Moleküle führen zur Aktivierung von CD4-T-Zellen. CD8 und CD4 sind Korezeptoren auf der T-Zell-Oberfläche, wobei CD8 am MHC-I-Molekül und CD-4 am MHC-II-Molekül bindet [Chaplin, 2006].

#### 1.3.1 Antigenpräsentation auf MHC-I-Molekülen

MHC-I-Moleküle bestehen aus einer polymorphen transmembranen  $\alpha$ -Kette und dem nicht-polymorphen  $\beta_2$ -Mikroglobulin. An Hand der  $\alpha$ -Kette werden drei verschiedene MHC-I-Moleküle unterschieden, nämlich HLA-A, HLA-B und HLA-C, die jeweils von einem bestimmten Gen kodiert werden und hoch polymorph sind [Chaplin, 2003].

Auf den MHC-I-Molekülen werden im allgemeinen von allen kernhaltigen Zellen Peptide präsentiert, die von in der Zelle synthetisierten Proteinen stammen, also endogene Antigene. Die Proteine einer Zelle werden im Zytosol auf- und abgebaut, wobei der Abbau mit der Bindung von Ubiquitin an die abzubauenden Proteine beginnt. Die ubiquitinylierten Proteine werden vom Proteasom, einem multikatalytischen Proteasekomplex, zu Peptiden abgebaut. Diese Peptide werden dann über bestimmte transmembrane Transporter, sogenannte *transporter associated with antigen processing* (TAP) –1 und –2, in das endoplasmatische Reticulum geschleust. Dort binden sie an das MHC-I-Molekül und der gesamte Komplex aus Antigen und MHC-I-Molekül gelangt über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche [Pamer et al., 1998; Rock et al., 1999]. So können neben körpereigenen Proteinen auch virale Proteinfragmente einer Virus-infizierten Zelle oder tumorspezifische Proteinfragmente einer maligne entarteten Zelle an der Zelloberfläche präsentiert werden.

Neben der Präsentation von endogenen Antigenen auf den MHC-I-Molekülen bei allen kernhaltigen Zellen wurde jedoch beobachtet, dass vor allem DCs auch Peptide, die von extrazellulären Proteinen stammen, auf MHC-I-Molekülen präsentieren und damit CD8-T-Zellen stimulieren können. Die Präsentation dieser exogenen Antigene auf MHC-I-Molekülen wird als Kreuzpräsentation bezeichnet.

Es gibt verschiedene Theorien, wie die Kreuzpräsentation von Antigenen funktionieren könnte, wobei die involvierten intrazellulären Wege noch nicht vollständig geklärt sind. Es könnte ein Proteasom- und TAP-unabhängiger Weg bestehen, bei dem extrazelluläre Antigene in Endosomen abgebaut und auf MHC-I-Moleküle geladen werden. Einen weiteren Weg könnte der Übergang der durch Endozytose internalisierten Antigene aus den Endosomen in das Zytosol mit nachfolgendem Abbau durch das Proteasom, TAP-abhängigem Transport und Ladung auf MHC-I-Moleküle im endoplasmatischen Reticulum darstellen. Dabei werden der direkte Weg vom Endosom in das Zytosol und der retrograde Weg vom Endosom über den Golgi-Apparat und das endoplasmatische Reticulum in das Zytosol diskutiert. Bei der durch Phagozytose internalisierten Proteine könnten diese in das Zytosol überführt und entsprechend prozessiert werden oder über spezielle Phagosomen, die sich aus dem endoplasmatischen Reticulum ableiten, zur Kreuzpräsentation gelangen. Auch das direkte Eindringen von exogenen Antigenen über die Zellmembran oder *gap junctions* in das Zytosol wäre möglich [Groothuis et al., 2005; Monu et al., 2007].

Die Kreuzpräsentation von Antigenen spielt im Immunsystem eine wichtige Rolle. Denn Zellen in peripheren Geweben oder Organen können Mutationen oder Virusinfektionen aufweisen, von denen die APCs nicht selbst betroffen sind. Über die Aufnahmen von

diesen Antigenen in der Peripherie und der Kreuzpräsentation durch APCs können trotzdem CD8-T-Zellen gegen diese pathologisch veränderten Zellen aktiviert werden. Dabei wird davon ausgegangen, dass sterbende Zellen Antigene freisetzen, die von APCs aufgenommen und der Kreuzpräsentation zugeführt werden. Gleichzeitig können sterbende Zellen Gefahrensignale freisetzen, die die Immunantwort auf die freigesetzten Antigene fördern [Rock et al., 2005].

### **1.3.2 Antigenpräsentation auf MHC-II-Molekülen**

MHC-II-Moleküle bestehen je aus zwei transmembranen Proteinen, einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette. Es gibt drei verschiedene Haupt-MHC-II-Moleküle, die HLA-DR, HLA-DQ und HLA-DP genannt werden. Die dafür kodierenden Gene sind äußerst polymorph [Chaplin, 2006].

DCs, B-Zellen, Monozyten und Makrophagen exprimieren konstitutiv MHC-II-Moleküle und präsentieren darauf den CD4-T-Zellen exogene Antigene. Sie nehmen über Endozytose und Phagozytose extrazelluläre Proteine auf, darunter Bestandteile von Bakterien, Parasiten und Partikel, die von virusinfizierten Zellen freigesetzt wurden. Die aufgenommenen extrazellulären Proteine werden dann in endosomalen intrazellulären Kompartimenten proteolytisch zu kurzkettigen Peptiden abgebaut. Die MHC-II-Moleküle werden aus dem endoplasmatischen Reticulum in diese endosomalen Kompartimente eingeschleust. Dabei dient die sogenannte invariante Kette, die mit dem MHC-II-Molekül assoziiert ist, als Wegweiser für den Transport in die Endosomen. Außerdem blockiert die invariante Kette die Peptidbindungsfurche des MHC-Moleküls, die später mit Antigen beladen wird. So wird verhindert, dass z.B. Peptide aus dem endoplasmatischen Reticulum an das MHC-II-Molekül binden. In den endosomalen Kompartimenten wird die invariante Kette entfernt und die exogenen Peptide binden an die MHC-II-Moleküle. Die mit den exogenen Antigenen beladenen MHC-II-Molekülen gelangen dann zur Zelloberfläche [Li et al., 2005].

Bei DCs hat der Reifegrad einen entscheidenden Einfluss auf die Präsentation von Antigenen über MHC-II-Moleküle. So werden ausgelöst durch inflammatorische Stimuli, die die Reifung der DCs induzieren, vermehrt MHC-II-Molekül-Peptid-Komplexe zur Zelloberfläche transportiert und bleiben dort mehrere Tage für die Erkennung durch CD4-Zellen verfügbar [Banchereau et al., 2000].

Über MHC-II-Moleküle können jedoch auch zytosolische, also endogene Antigene, präsentiert werden. Wie die Präsentation von endogenem Antigen über MHC-II-

Moleküle funktioniert und was sie im Immunsystem für eine Rolle spielt, ist jedoch noch weitgehend unbekannt [Li et al., 2005; Zhou et al., 2004].

#### 1.3.4 Präsentation von Lipid-Antigenen auf CD1-Molekülen

Neben den MHC-Molekülen, die Peptide präsentieren, existieren weitere Antigen-präsentierende Moleküle. CD1 ist ein Glykoprotein, das Ähnlichkeit mit dem MHC-I-Molekül aufweist und Lipide und Glykolipide gegenüber T-Zellen präsentiert. Die Expression von CD1 gehört typischerweise zum Phänotyp von DCs. Menschen besitzen fünf CD1-Gene, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d und CD1e. Trotz eines nur geringen Polymorphismus können eine Vielzahl an mikrobiellen oder körpereigenen Lipiden von den CD1-Molekülen gebunden werden. CD1 Moleküle werden im endoplasmatischen Reticulum synthetisiert, wandern durch das Golgi-Netzwerk und erreichen die Zelloberfläche. Sie können über Endozytose reinternalisiert werden und ein hoher Anteil an CD1-Molekülen findet sich in endosomalen und lysosomalen Kompartimenten. Dort können die CD1-Moleküle mit prozessierten Lipiden beladen werden. Mittels CD1 können exogene und endogene Lipide einer bestimmten Gruppe von T-Zellen und NK-T-Zellen präsentiert werden [Bricard et al., 2007; De Libero et al., 2006].

#### 1.3.5 T-Zell-Aktivierung

Reife CD4- und CD8-T-Zellen entwickeln sich im Thymus aus Vorläuferzellen [Spits, 2002]. Anschließend zirkulieren sie als sogenannte naive T-Zellen zwischen Blutkreislauf und lymphatischen Organen. Naiv bedeutet, dass die T-Zellen zwar reif sind, aber mit ihrem TZR noch nicht das passende Antigen erkannt haben. In den T-Zell-Arealen der sekundären lymphatischen Organe tasten die T-Zellen die Peptid-MHC-Komplexe der DCs ab. Die DCs präsentieren dort Antigene, die sie vor der Migration zu den lymphatischen Organen in der Peripherie aufgenommen haben [Banchereau et al., 1998].

Erkennt die T-Zelle mittels TZR ihr spezifisches Antigen, kommt es zur Aktivierung und klonalen Proliferation der Zelle. Dieser Vorgang nach der Antigenerkennung durch die naive T-Zelle wird als T-Zell-*priming* bezeichnet und führt zur primären Immunantwort. Die T-Zelle erkennt über den spezifischen TZR den Peptid-MHC-Komplex der DC. Für die T-Zell-Aktivierung sind jedoch weitere Wechselwirkungen mit der DC über sogenannte kostimulatorische Moleküle notwendig. Zu den bekanntesten kostimulatorischen Molekülen gehören CD80 und CD86, die auf aktivierten DCs

exprimiert werden und Liganden für das Oberflächenmolekül CD28 auf den T-Zellen darstellen. Die Stimulation über CD28 führt bei T-Zellen unter anderem zur Expression von Zytokinen, Zytokinrezeptoren, Transkriptionsfaktoren und weiteren Rezeptoren für kostimulatorische Signale wie CD40-Ligand, die zur Differenzierung und klonalen Expansion von T-Zellen beitragen [Acuto et al., 2003]. CD40-Ligand beispielsweise bindet an CD40, ein Oberflächenmolekül auf reifen DCs. Dies führt gleichzeitig zu einer weiteren Aktivierung der T-Zellen und der DCs. So exprimieren DCs nach Stimulation mit CD40-Ligand mehr kostimulatorische Moleküle und sekretieren mehr immunstimulatorische Zytokine wie IL-12 [Bennett et al., 1998; Caux et al., 1994; Ridge et al., 1998].

Neben der Bindung von TZR und Peptid-MHC-Komplex sind also eine Reihe von weiteren Interaktionen zwischen DCs und T-Zellen nötig, um über die Aktivierung von T-Zellen zu T-Effektorzellen eine Immunantwort zu initiieren.

Es sind verschiedene T-Effektorzellen bekannt, die unterschiedliche Funktionen im Immunsystem ausüben. CD8-T-Zellen werden durch APCs, die Peptid-MHC-I-Komplexe präsentieren, aktiviert. Sie entwickeln sich zu zytotoxischen T-Zellen, die infizierte körpereigene Zellen über Antigen-MHC-I-Komplexe erkennen und lysieren [Bhardwaj et al., 1994]. CD4-T-Zellen werden durch APCs mit Peptid-MHC-II-Komplexen aktiviert. Sie können in zwei verschiedene Arten von Effektorzellen differenzieren, nämlich in  $T_H1$ - oder in  $T_H2$ -Zellen. Für die Polarisierung in  $T_H1$ - oder  $T_H2$ -Zellen sind mehrere Faktoren verantwortlich, darunter DC-Subtyp, Zytokinprofil in der Umgebung, Art des Pathogens und Beschaffenheit der Signalvermittlung über PRRs [Pulendran, 2004].  $T_H1$ -Zellen sezernieren typischerweise IL-2 und IFN- $\gamma$  und fördern über die Aktivierung von Makrophagen vor allem die Bekämpfung intrazellulärer Bakterien.  $T_H2$ -Zellen produzieren bestimmte Zytokine wie IL-4, IL-5 und IL-13 und induzieren die Aktivierung von Eosinophilen sowie die Produktion von IgE durch B-Zellen. Sie können den Körper vor Helminthen schützen, sind jedoch auch maßgeblich an der Entstehung von Allergien beteiligt [Romagnani, 2006].

Die Art und Weise, in der APCs T-Zellen Peptide präsentieren, sowie die Umgebung, in der die Antigenpräsentation erfolgt, beeinflussen also maßgeblich die Differenzierung zu verschiedenen Effektor-Zellen.

### **1.3.6 T-Zell-Toleranz**

DCs können nicht nur über T-Zell-Aktivierung eine Immunantwort initiieren, sondern auch T-Zell-Toleranz gegenüber dem präsentierten Antigen erzeugen. Mechanismen

des Immunsystems zur Induktion von T-Zell-Toleranz sind notwendig, um autoimmune Reaktionen durch selbstreaktive T-Zellen zu verhindern. Es werden dabei zwei Mechanismen unterschieden, die Induktion zentraler Selbst-Toleranz und peripherer Selbst-Toleranz [Romagnani, 2006].

Im Thymus wird durch Selektionsprozesse die zentrale Selbst-Toleranz gewährleistet. Es werden zuerst T-Zellen selektiert, deren TZR körpereigene MHC-Moleküle erkennt (positive Selektion). Dann werden T-Zellen eliminiert, die eine hohe Affinität für Komplexe aus MHC-Molekülen und körpereigenen Peptiden aufweisen (negative Selektion). Im Thymus sind DCs und epitheliale Zellen in der Lage mittels negativer Selektion Toleranz zu induzieren [Steinman et al., 2003].

Da nicht alle körpereigenen Antigene im Thymus präsentiert werden können, finden sich selbstreaktive reife T-Zellen in der Peripherie. Es sind verschiedene Mechanismen bekannt, die zu peripherer Selbst-Toleranz bei T-Zellen führen, darunter die Induktion von Selbst-Toleranz durch DCs. Unreife DCs, die den T-Zellen im Gegensatz zu reifen DCs lediglich das spezifische Antigen ohne die entsprechende zusätzliche Aktivierung über kostimulatorische Moleküle anbieten, können Toleranz gegenüber diesem Antigen induzieren. Ob DCs eine Immunantwort oder Toleranz induzieren wird maßgeblich durch die begleitenden Umstände bestimmt. So verhindern IL-10 und TGF- $\beta$  die Aktivierung unreifer DCs und fördern die Induktion von Toleranz. Ein weiteres Beispiel ist das Prozessieren und Präsentieren von Antigenen sterbender Zellen durch DCs. Dabei induzieren nekrotische Zellen die Reifung von DCs verbunden mit der Initiierung einer Immunantwort, apoptotische Zellen hingegen führen zu keiner Aktivierung [Wallet et al., 2005]. DCs sind außerdem in der Lage, die Entwicklung zu regulatorischen T-Zellen zu induzieren. Regulatorische T-Zellen wirken beispielsweise über die Zytokine IL-10 oder TGF- $\beta$  immunsuppressiv und dienen dazu, laufende Immunantworten und selbstreaktive T-Zellen unter Kontrolle zu halten [Cools et al., 2007].

DCs haben im Immunsystem also nicht nur eine zentrale Rolle als Mittler zwischen angeborener und adaptiver Immunität bei der Induktion von Immunantworten, sondern auch bei Induktion von Toleranz gegenüber Antigenen.

## **1.4 Tumorimmuntherapie mit dendritischen Zellen**

Da DCs sowohl Resistenz als auch Toleranz des Immunsystems gegenüber bestimmten Antigenen induzieren können, wird versucht, mit Hilfe von DCs das Immunsystem zu therapeutischen Zwecken bei Infektionskrankheiten,

Autoimmunkrankheiten, Allergien, Transplantatabstoßungen und Krebs zu manipulieren [Steinman et al., 2007].

So werden Versuche zur Entwicklung neuer Impfstoffe gegen Infektionskrankheiten durchgeführt, wobei die Impfantigene an Antikörper für Rezeptoren von DCs gekoppelt sind, um die Impfantigene im Körper direkt zu DCs zu leiten [Trumfheller et al., 2006]. Außerdem wird getestet, ob die Induktion von regulatorischen T-Zellen durch DCs und die damit verbundene Toleranz des Immunsystems gegenüber bestimmten Antigenen therapeutisch bei Autoimmunerkrankungen, bei Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen und bei Asthma genutzt werden kann [Hammad et al., 2007; Luo et al., 2007; Ochando et al., 2006; Tarbell et al., 2007]. Ein weiteres Beispiel für den Einsatz von DCs im Rahmen von klinischen Immuntherapien stellt die Immuntherapie maligner Tumore durch Vakzinierung mit DCs dar.

Das Immunsystem ist grundsätzlich in der Lage, neoplastische Zellen zu erkennen und zu zerstören. Dies wurde wiederholt in Tiermodellen, aber auch beim Menschen beobachtet. Einen zusätzlichen Hinweis für die Interaktion zwischen Immunsystem und Neoplasien liefern Berichte über die erhöhte Inzidenz einiger Neoplasien bei immundefizienten Menschen oder im Alter, wenn die Funktion des Immunsystems vermindert ist [Banchereau et al., 2005]. Auf Grund dieser Beobachtungen wird versucht, maligne Neoplasien mittels Immuntherapie zu behandeln.

Banchereau stellte die Hypothese auf, dass DCs in vivo das Potential besitzen, eine Immunantwort gegen Tumore zu initiieren [Banchereau et al., 2000]. Dabei erkennen unreife DCs Tumor-assoziierte PAMPs mittels PRRs und aktivieren Effektorzellen der angeborenen Immunität wie Makrophagen und NK-Zellen, die die Tumorzellen abtöten. Dies führt zur Freisetzung von Tumor-assoziierten Antigenen, die von unreifen DCs aufgenommen werden. Nach ihrer Reifung präsentieren sie die prozessierten Antigene und aktivieren T-Zellen, was zu einer Tumor-spezifischen Immunantwort führt. Die Tumorzellen haben jedoch zahlreiche Möglichkeiten der Immunantwort zu entkommen. So können sie durch Freisetzung von beispielsweise VEGF, IL-10 und TGF- $\beta$  die Reifung von DCs inhibieren und somit die Induktion einer Immunantwort durch DCs verhindern [Kim et al., 2005; Oyama et al., 1998].

Die Generierung von autologen DCs und ihre Beladung mit Tumorantigenen ex vivo stellt einen vielversprechenden Ansatz für klinische Studien dar, da die kontrollierten Bedingungen ex vivo es ermöglichen könnten, die Parameter für eine optimale Vakzinierung festzustellen. Die Grundidee besteht darin, dass autologe DCs mit Tumor-assoziierten Antigenen beladen und durch bestimmte Stimuli aktiviert werden.

Dann werden sie dem Patienten wieder zugeführt, migrieren zu den lymphatischen Organen und aktivieren durch Antigenpräsentation Tumor-spezifische T-Zellen. Aktivierte CD8-T-Zellen können Tumorzellen direkt vernichten, aktivierte CD4-T-Zellen können weitere Zellen des Immunsystems wie B-Zellen, Eosinophile und Makrophagen aktivieren.

Bereits in den neunziger Jahren wurde in Versuchen mit Mäusen nachgewiesen, dass ex vivo generierte und mit Tumor-Antigen beladene DCs Tumor-spezifische Immunität induzieren können [Celluzzi et al., 1996; Inaba et al., 1990; Nair et al., 1997; Zitvogel et al., 1996]. Darauf folgten zahlreiche klinische Studien zur Immuntherapie mittels DC-Vakzinierung beim Menschen, unter anderem gegen das maligne Melanom [Paczesny et al., 2004; Schuler-Thurner et al., 2002], multiple Myelom und Prostatakarzinom [Cranmer et al., 2004]. Bei den klinischen Studien zur Tumorummuntherapie mit DCs werden größtenteils Monozyten-abgeleitete DCs eingesetzt [Nestle et al., 2005], da ihre Verwendung zahlreiche Vorteile bietet.

So können aus Monozyten in vitro deutlich mehr DCs gewonnen werden als DCs direkt aus dem Blut. Daher stehen sowohl für Forschungszwecke in vitro als auch für die Vakzinierung in vivo ausreichend Zellen zur Verfügung. Die kontrollierten Bedingungen in vitro ermöglichen das Testen verschiedenster Protokolle bezüglich der Generierung, der Beladung mit Tumorantigenen und der Aktivierung der DCs. Aus Monozyten können DCs mit myeloiden Charakteristika generiert werden, wobei myeloide DCs in besonderem Ausmaß zur Antigenaufnahme und Antigenprozessierung befähigt und daher für die Tumorummuntherapie geeignet sind. So wiesen Schnurr et al. nach, dass CD1c<sup>+</sup> DCs aus dem peripheren Blut und Monozyten-abgeleitete DCs ein bestimmtes Tumorantigen sowohl auf dem MHC-II-Molekül als auch auf dem MHC-I-Molekül mittels Kreuzpräsentation präsentierten, während plasmazytoide DCs es nur auf dem MHC-II-Molekül präsentierten [Schnurr et al., 2005].

Die bisherigen Erfahrungen in klinischen Studien zeigen, dass durch die Vakzinierung mit Monozyten-abgeleiteten DCs Antigen-spezifische T-Zellen bei den Patienten induziert werden können. Dabei existieren Studien zu verschiedenen malignen Erkrankungen, wie myeloischer Leukämie, kolorektalem Karzinom oder Nierenzellkarzinom [Babatz et al., 2006; Gitlitz et al., 2003; Lee et al., 2006]. Auch wenn das Grundprinzip der Vakzinierung somit funktioniert und bei einzelnen Patienten Regressionen von Tumoren beobachtet werden konnten, war die klinische Wirksamkeit generell jedoch gering [Osada et al., 2006]. Daher besteht die Notwendigkeit, die Parameter, die bei der Induktion einer Immunantwort durch DCs eine entscheidende Rolle spielen, in vitro genauer zu untersuchen, um über die Modifizierung der

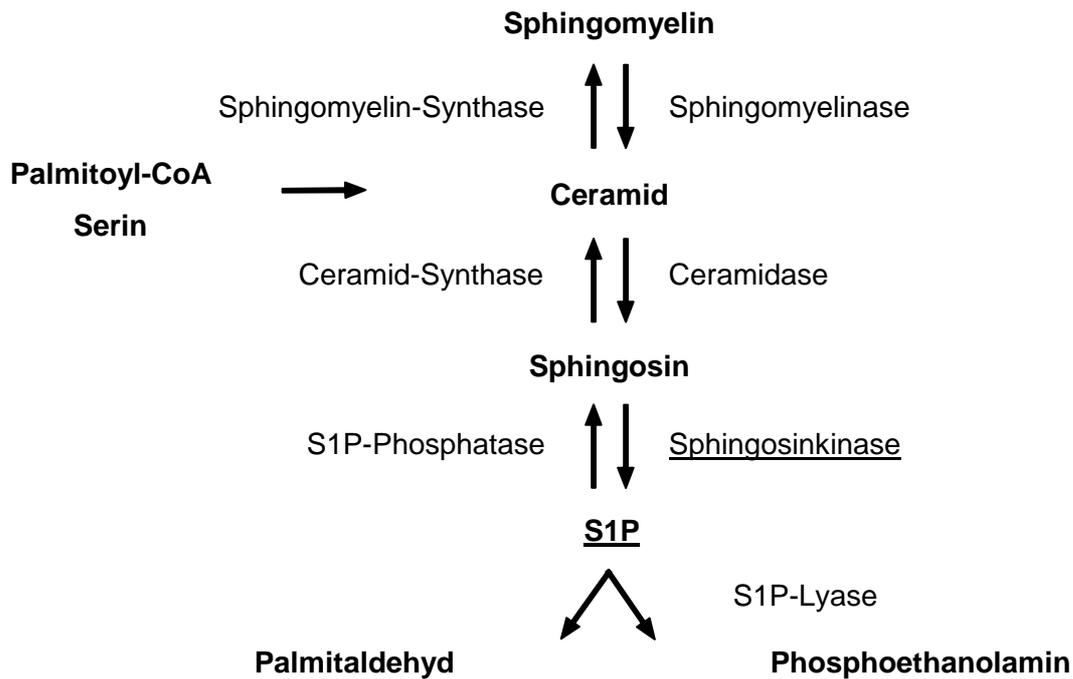
Vakzinierungsprotokolle eine bessere klinische Antwort bei den Patienten zu erreichen. Zu diesen wichtigen Faktoren gehören die Generierung, die Ausreifung, die Antigenbeladung und die Migration der DCs, wobei die verschiedenen Studienprotokolle in all diesen Punkten stark variieren. In der vorliegenden Arbeit wurde insbesondere das Migrationsverhalten von Monozyten-abgeleiteten DCs in vitro untersucht.

## **1.5 Sphingosin-1-phosphat und Sphingosinkinase**

Sphingosin-1-phosphat gehört der Gruppe der Sphingolipide an. Sphingolipide sind als amphiphile Verbindungen ein wichtiger struktureller Bestandteil der Lipiddoppelschichten, die die Grundstruktur aller zellulären Membranen darstellen. Neben dieser strukturellen Aufgabe spielen Sphingolipide eine wichtige Rolle bezüglich Wachstum, Überleben und Tod von Zellen. Zusätzlich wurde in den letzten Jahren vermehrt die Bedeutung von Sphingolipiden bei der Regulierung des Immunsystems untersucht.

### **1.5.1 Aufbau und Abbau von Sphingosin-1-phosphat**

Der Aufbau und der Abbau von Sphingosin-1-phosphat (S1P) (siehe Abb. 1) wird in der Zelle streng reguliert. Die Sphingosinkinase, von der die zwei verschiedenen Isoformen Sphingosinkinase 1 und Sphingosinkinase 2 existieren, katalysiert die Phosphorylierung von Sphingosin zu S1P. Es sind viele Faktoren bekannt, die die Sphingosinkinase aktivieren und somit zu einer vermehrten Bildung von S1P führen. Darunter befinden sich vor allem Faktoren, die das Zellwachstum und das Zellüberleben fördern. S1P kann mittels Sphingosin-1-phosphat-phosphatase wieder zu Sphingosin abgebaut werden. Außerdem kann S1P mittels Sphingosin-1-phosphat-lyase im endoplasmatischen Reticulum irreversibel abgebaut werden. Sphingosin kann aus Ceramid hergestellt werden, wobei Ceramid über Zwischenstufen de-novo synthetisiert werden kann oder aus Sphingomyelin entstehen kann [Maceyka et al., 2002].



**Abb.1 Aufbau und Abbau von S1P**

Die Sphingosinkinase katalysiert die Phosphorylierung von Sphingosin zu S1P. S1P kann mittels S1P-Phosphatase wieder zu Sphingosin verwandelt oder mittels S1P-Lyase irreversibel abgebaut werden. Sphingosin kann aus Ceramid hergestellt werden, wobei Ceramid über Zwischenstufen de-novo synthetisiert werden kann oder aus Sphingomyelin entstehen kann.

### 1.5.2 Signalvermittlung durch S1P

S1P kann in vielen verschiedenen Zellarten als Antwort auf bestimmte Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Zytokine, Antigen und GPCR-Agonisten mittels Sphingosinkinase gebildet werden. S1P kann beispielsweise von aktivierten Thrombozyten freigesetzt werden und ist im Blutplasma nachweisbar [Pyne et al., 2000]. Es wurde festgestellt, dass S1P sowohl als extrazellulärer Mediator als auch als intrazellulärer *second messenger* agieren kann [Ghosh et al., 1994; Mattie et al., 1994; Olivera et al., 1999].

Intrazellulär erhöhtes S1P kann beispielsweise das Wachstum und das Überleben von Zellen fördern, sowie die Freisetzung von Calcium aus zelleigenen Speichern bewirken. Allerdings sind die genauen Signalwege der intrazellulären Wirkung von S1P noch weitgehend unbekannt [Le Stunff et al., 2004].

Die extrazellulären Effekte von S1P werden über die gleichnamigen GPCRs S1P<sub>1</sub> [Lee et al., 1998], S1P<sub>2</sub>, S1P<sub>3</sub>, S1P<sub>4</sub> und S1P<sub>5</sub> vermittelt [Ancellin et al., 1999; Im et al., 2000; Kluk et al., 2002; Van Brocklyn et al., 2000]. Diese S1P-Rezeptoren sind mit

zahlreichen Effektorsystemen gekoppelt, die verschiedene zelluläre Prozesse wie die Migration von Zellen steuern [Spiegel et al., 2003].

Neben dem Einfluss von S1P auf das Überleben, das Wachstum und die Migration von Zellen wurde in den vergangenen Jahren beobachtet, dass S1P bei Zellen auch das Zytokinsekretionsprofil und die Reaktion auf Chemokine modulieren kann [Payne et al., 2004]. Da das Überleben, die Migration, die Zytokinsekretion und die Antwort auf Chemokine von Immunzellen entscheidende Faktoren bei der Immunantwort darstellen, kommt die Beteiligung von S1P an der Regulierung des Immunsystems in letzter Zeit immer deutlicher zum Vorschein. S1P kann außerdem durch seinen Einfluss auf Zellwachstum und Zellproliferation eine Rolle bei der Entwicklung von Tumoren spielen. So wurden unter anderem S1P-freisetzende Tumore [Hong et al., 1999] und Sphingosinkinase-abhängiges Tumorwachstum [Nava et al., 2002] beschrieben. Daher könnten genauere Kenntnisse über die Funktionen von S1P neue Angriffspunkte für die Tumorummuntherapie aufdecken.

## **1.6 Fragestellung der Arbeit**

DCs spielen als Antigen-präsentierende Zellen eine zentrale Rolle bei der Induktion einer adaptiven Immunantwort. Es wird versucht, dieses Potential von DCs zur Therapie von Krankheiten zu nutzen. So existieren bereits zahlreiche klinische Studien auf dem Gebiet der Tumorummuntherapie, bei denen durch den Einsatz von DCs bei Patienten eine Immunantwort gegen maligne Neoplasien induziert werden soll. Sphingosinkinase, S1P und S1P-Rezeptoren sind an essentiellen Prozessen der Immunabwehr wie der Migration von Immunzellen beteiligt, und es gibt klinische Studien, bei denen ein S1P-Analogon zur Therapie von Multipler Sklerose und Transplantatabstoßungen getestet wird. Sowohl über Modulation der Funktion von DCs als auch über Eingriffe in die S1P-Signalübertragung kann das Immunsystem beeinflusst werden. Diese immunologischen Interventionen können möglicherweise in Zukunft zur Therapie bestimmter Erkrankungen genutzt werden.

Ziel der vorliegenden Dissertation ist es, die Rolle von S1P und Sphingosinkinase bei der Migration von DCs zu untersuchen, um gegebenenfalls neue Angriffspunkte für die Manipulation des Immunsystems zu therapeutischen Zwecken zu entdecken. Dabei werden Monozyten-abgeleitete DCs verwendet, die häufig für klinische Studien zur Tumorummuntherapie eingesetzt werden.

In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob Sphingosinkinase und S1P-Rezeptoren bei Monozyten-abgeleiteten DCs verschiedener Reifestadien exprimiert werden. Es wird getestet, ob S1P und Sphingosinkinase die Migration der DCs beeinflussen und in weiteren Versuchen wird nach möglichen Signalwegen gesucht, über die die Wirkung von S1P auf DCs vermittelt werden könnte.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

#### 2.1.1 Geräte

Begasungsbrutschrank (BBD 6220)	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Eismaschine	Fa. Ziegra (Isernhagen, D)
ELISA-Reader	Fa. Dynatech-Laboratories (Guernsey, GB)
Entwicklungsmaschine (Curix 60)	Fa. Agfa (Köln, D)
Eppendorf Reference / Research Pipetten	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)
Eppendorf Zentrifuge (5417 R)	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)
FACSCalibur	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Kamera Polaroid MP4	Fa. Polaroid (Dreieich-Sprendlingen, D)
Lamin Air (HB 2472 S)	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Mikroskop	Fa. Nikon (Düsseldorf, D)
Mikrowelle (r-7180)	Fa. Sharp (Hamburg, D)
pH-Meter	Fa. WTW (Weilheim, D)
Pipetus-Akku Pipettierhilfe	Fa. Hirschmann (Eberstadt, D)
Power Pac 200 Spannungsgerät	Fa. Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell	Fa. Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Sonorex Super RK 510 H Ultraschallbad	Fa. Bandelin (Berlin, D)
Thermocycler Modell T3	Fa. Biometra (Göttingen, D)
UV Transilluminator 2011 Macrovue	Fa. Amersham (Buckinghamshire, UK)
Varifuge 20 RS	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Vortex VF 2	Fa. Bender & Hobein AG (Zürich, CH)
Waage (LP 620S)	Fa. Sartorius (Göttingen, D)
Waage (SBC 21)	Fa. Scaltec Instruments (Heiligenstadt, D)
Wasser-Deionisierungsmaschine	Fa. SG Reinstwasser-Sys. (Hamburg, D)

#### 2.1.2 Chemikalien

Agarose	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Ammoniumpersulfat	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Aprotinin	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Bradford-Reagenz	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

Bromphenolblau	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Entwickler (G 153)	Fa. Agfa (Köln, D)
Ethanol	Fa. Merck (Darmstadt, D)
Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
FACSFlow	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
FACSSafe	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Fixierbad (G353)	Fa. Agfa (Köln, D)
Glycerol	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Glycine	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Heparin-Natrium	Fa. Ratiopharm (Ulm, D)
2-Propanol	Fa. Merck (Darmstadt, D)
2-Mercapto-Ethanol	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Methanol	Fa. Merck (Darmstadt, D)
PMSF	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Polyacrylamid 30 % (19:1)	Fa. Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
<i>Sodium-dodecyl-sulfate</i> (SDS) 10 %	Fa. Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
<i>Sodium chloride</i>	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Tris-Borat-EDTA (TBE) -Puffer	Apotheke Innenstadt LMU (München, D)
TEMED	Fa. Amersham (Buckinghamshire, UK)
Triton X 100	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
TRIZMA Base (Tris-Base)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
TRIZMA <i>hydrochloride</i> (Tris-HCl)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
TRIZOL Reagent	Fa. GibcoBRL (Paisley, UK)
Trypan-Blau	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Tween 20	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

### 2.1.3 Material für Zellisolation, Zellkultur und Zellmigration

#### Medien und Zusätze:

Aqua ad iniectabilia	Fa. Braun (Melsungen, D)
Biocoll Separationsmedium	Fa. Biochrom (Berlin, D)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Fa. GibcoBRL (Paisley, UK)
Humanes AB-Serum	Fa. Bio Whittaker (Wakersville, USA)
L-Glutamin	Fa. PAA (Linz, A)
Natriumchloridlösung 0,9 %	Fa. Baxter Deutschland GmbH (Unterschleißheim, D)

<i>Phosphate-buffered saline (PBS)</i>	Fa. PAA (Linz, A)
Penicillin	Fa. PAA (Linz, A)
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Streptomycin	Fa. PAA (Linz, A)
Zytokine, Chemokine, Stimulantien und Inhibitoren:	
6Ckine	Fa. R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
D-erythro-Sphingosin-1-phosphat (S1P)	Fa. Biomol (Hamburg, D)
DL-threo-Dihydrosphingosin (DHS)	Fa. Biomol (Hamburg, D)
<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GMCSF)</i>	Fa. Immunex (Seattle, WA, USA)
Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )	Fa. Strahtmann (Hannover, D)
Interleukin-4 (IL-4)	Fa. Promega (Madison, WI, USA)
Ionomycin ( <i>calcium salt</i> )	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
<i>Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1)</i>	Fa. R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
<i>Macrophage inflammatory protein 1<math>\alpha</math></i> (MIP-1 $\alpha$ )	Fa. R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
<i>Macrophage inflammatory protein 3<math>\beta</math></i> (MIP-3 $\beta$ )	Fa. R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
Prostaglandin E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> )	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
<i>Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)</i>	Fa. R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
Suramin ( <i>sodium salt</i> )	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Tumor Nekrose Faktor $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) Y-27632	Fa. R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) Fa. Merck (Darmstadt, D)
Plastikmaterialien:	
Eppendorf-Gefäße (0,5 ml und 1,5 ml)	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)
Transwells (6,5 mm Durchmesser; 0,5 $\mu$ m Porengröße; Katalog Nr. 3421)	Corning Incorporated (Acton, USA)
Perfusor-Spritze (50 ml)	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Pipetten (1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Fa. Bibby Sterilin (Stone, UK)
PP-Röhrchen (50 ml)	Fa. Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, D)
6-Well-Zellkulturplatte	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
24-Well-Zellkulturplatte	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
96-Well-Platte	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)

Zellkulturflasche (550 ml, 175 cm <sup>2</sup> )	Fa. Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, D)
Zellschaber (25 cm und 39 cm)	Fa. Sarstedt (Nümbrecht-Rommelsdorf, D)

### 2.1.4 Medien und Lösungen für Zellkultur und Zellmigration

#### RPMI-Vollmedium

100 IU/ml Penicillin  
 100 µg/ml Streptomycin  
 1,5 mM L-Glutamin  
 2 Vol % humanes AB-Serum  
 in RPMI 1640-Medium

### 2.1.5 Puffer

Puffer für die Polymerase-Ketten-Reaktion:

#### 10xTBE-Puffer

1 M Tris  
 1 M Borsäure  
 0,02 M EDTA-2Na-2H<sub>2</sub>O  
 in gereinigtem Wasser

#### Blaupuffer

30 % Glycerol  
 1 Messerspitze Bromphenolblau  
 in dH<sub>2</sub>O

#### TBE-Puffer

10x TBE Puffer 1:10 in destilliertem  
 Wasser (dH<sub>2</sub>O)

Western Blot-Puffer:

#### Trenngel-Puffer

1,5 M Tris-Base  
 pH 8,8 mit HCl einstellen  
 in dH<sub>2</sub>O

#### Sammelgel-Puffer

1 M Tris-Base  
 pH 6,8 mit HCl einstellen  
 in dH<sub>2</sub>O

#### TBS-Puffer

150 mM NaCl  
 25 mM Tris-HCl  
 pH 7,5  
 in dH<sub>2</sub>O

#### TBST-Puffer

TBS-Puffer  
 0,05 % Tween 20

Lysepuffer

10 mM Tris-HCl  
 1 mM EDTA  
 0,1 % SDS  
 0,1 % Triton X 100  
 pH 7,4  
 in dH<sub>2</sub>O

Strip-Puffer

2 % SDS  
 62,5 mM Tris-HCl mit pH 6,8  
 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol  
 in dH<sub>2</sub>O

Laufpuffer

25 mM Tris-Base  
 190 mM Glycin  
 0,1 % SDS  
 in dH<sub>2</sub>O

Blot-Puffer

39 mM Glycin  
 2,9 g Tris-Base  
 0,037 % SDS  
 20 % Methanol  
 in dH<sub>2</sub>O

**2.1.6 Reagenzienansätze**

Titan One Tube RT-PCR Kit

Fa. Roche Diagnostics GmbH (Mannheim,  
 D)

ECL Detection Reagents

Fa. Amersham (Buckinghamshire, UK)

## **2.2 Isolation und Kultur von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen**

**2.2.1 Isolation von Monozyten**

Gesunden Spendern wurde 200 ml venöses Blut in vier 50 ml Perfusor-Spritzen abgenommen. Jede Spritze enthielt dabei 2500 I.E. Heparin zur Antikoagulation der Blutproben.

Alle weiteren Arbeitsschritte der Zellisolation sowie alle Manipulationen und Experimente wurden unter sterilen Bedingungen in einem Laminar-Air-Flow durchgeführt.

Die Isolation der mononukleären Zellfraktion (PBMCs = *peripheral blood mononuclear cells*) erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Dazu wurde das heparinisierte

Blut á 25 ml auf acht 50 ml-Röhrchen (Blue Cap) verteilt und je mit 20 ml steriler physiologischer Natriumchloridlösung gemischt. Mit je 30 ml dieses verdünnten Blutes wurden je 15 ml Ficoll-Hypaque in insgesamt zwölf neuen 50 ml-Röhrchen vorsichtig überschichtet, ohne dass eine Vermischung der beiden Phasen auftrat. Nach der Zentrifugation (1000 g, 20 °C, 20 min, Beschleunigung 1, Bremsung 1) wurde in jedem Blue Cap von oben nach unten die folgende Schichtung vorgefunden: Plasma mit Thrombozyten, Ring mit mononukleären Zellen, Ficoll, Erythrozyten und der größte Anteil der Granulozyten. Der PBMC-Ring wurde jeweils vorsichtig abpipettiert, in ein neues Blue Cap gegeben, mit steriler Natriumchloridlösung auf 50 ml aufgefüllt und zentrifugiert (520 g, 20 °C, 20 min, Beschleunigung 9, Bremsung 4). Anschließend wurde der Überstand dekantiert, das Zellpellet in 1 ml steriler Kochsalzlösung resuspendiert, die Suspensionen aus jeweils vier Röhrchen zusammenpipettiert und mit steriler Natriumchloridlösung auf 50 ml aufgefüllt. Nach der nächsten Zentrifugation (330 g, 4°C, 10 min, Beschleunigung 9, Bremsung 4) wurde erneut der Überstand dekantiert, das Zellpellet in 1 ml resuspendiert, die Suspensionen aus den verbliebenen 3 Blue Caps zusammengeführt, mit Kochsalzlösung auf 50 ml aufgefüllt und zentrifugiert (330 g, 4°C, 10 min, Beschleunigung 9, Bremsung 4). Danach wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 20 ml RPMI-Vollmedium resuspendiert.

Die Isolation der Monozyten aus den gewonnenen PBMCs erfolgte mittels Adhärenz an der Kunststoffoberfläche in Zellkulturflaschen. Dabei wurden je 5 ml der in RPMI-Vollmedium resuspendierten PBMCs in eine Zellkulturflasche pipettiert und auf 20 ml mit RPMI-Vollmedium aufgefüllt. Die Menge an PBMCs in einer Flasche entsprach damit der Anzahl gewonnener mononukleärer Zellen aus 50 ml peripherem Blut. Die Zellsuspension wurde durch vorsichtiges Schwenken in horizontaler Lage der Flasche auf der Kunststoffoberfläche des Bodens gleichmäßig verteilt. Nach einer Stunde Inkubation im Begasungsbrutschrank (37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO<sub>2</sub> - Luftgemisch) wurde das Medium abpipettiert und die Zellkulturflaschen mit den PBMCs zweimal mit raumwarmen PBS gespült. Dazu wurden jeweils 15 ml steriles PBS in die Flasche pipettiert und die Kulturflasche mit der Bodenseite, an der die Monozyten adhärten, nach unten in horizontaler Ebene eine Minute lang geschwenkt. Danach wurde das PBS abpipettiert. Auf diese Art und Weise wurden die Lymphozyten, die im Gegensatz zu den Monozyten nicht an der Kunststoffoberfläche adhärten, entfernt. Nach dem zweiten Waschschrift wurden 20 ml RPMI-Vollmedium zu den verbliebenen adhärenen Monozyten pipettiert und die Zellkulturflaschen für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Medium aus einer Zellkulturflasche in ein 50 ml-Röhrchen überführt, die Flasche mit 15 ml kaltem PBS gefüllt und die noch adhärenen Zellen mit einem sterilen langen Zellschaber vom Boden der Flasche abgeschabt. Das PBS mit den abgelösten Zellen wurde zu dem bereits abgenommenen Medium in das Blue Cap hinzu pipettiert. Anschließend wurde die Zellkulturflasche mit 15 ml kaltem PBS gespült und in das gleiche Blue Cap pipettiert. Nach der Zentrifugation (330 g, 4°C, 10 min, Beschleunigung 9, Bremsung 4) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, das Zellpellet mit 1 ml RPMI-Vollmedium resuspendiert und die Zellsuspensionen aus den vier Röhrchen des gleichen Spenders in einem Blue Cap zusammenpipettiert.

### **2.2.2 Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität**

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde der Trypanblauausschlusstest durchgeführt. 10 µl der Zellsuspension wurde dabei mit Trypanblaulösung (0,25 % Trypanblau in Wasser) verdünnt. Tote Zellen werden blau angefärbt, während lebende Zellen den Farbstoff ausschließen. Die Zellzahlen wurden durch Auszählen geeigneter Verdünnungen in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt.

### **2.2.3 Kultur von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen**

Die Monozyten-Suspension wurde nach dem Zählen durch Zugabe von RPMI-Vollmedium auf eine Konzentration von 1 Million lebende Zellen pro 1 ml Medium eingestellt. IL-4 wurde in einer Konzentration von 500 U/ml und GM-CSF in einer Konzentration von 1000 U/ml zugegeben. Die Monozyten wurden á 2 ml pro Well in 6-Well-Kulturplatten im Brutschrank inkubiert.

Nach fünf Tagen Inkubation hatten sich die Monozyten zu unreifen dendritischen Zellen (iDCs = *immature dendritic cells*) differenziert. Je nach Versuch wurden die iDCs unterschiedlich behandelt.

Für die Experimente mit unreifen DCs wurden die iDCs nach diesen fünf Tagen Inkubation geerntet. Dazu wurde das Medium mit iDCs aus der 6-Well-Platte in ein Blue Cap pipettiert, in das Well 1 ml kaltes PBS gefüllt, mit einem kurzen Zellschaber verbliebene Zellen abgeschabt und mit dem PBS zum entsprechenden Medium in das Blue Cap pipettiert. Zuletzt wurde das Well mit 1 ml PBS gespült und das PBS ebenfalls in das 50 ml-Röhrchen gefüllt. Nach der Zentrifugation (330 g, 4 °C, 10 min, Beschleunigung 9, Bremsung 4) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, die

Zellen in 1 ml Medium resuspendiert und die Lebendzellzahl mit der Trypanausschlussmethode bestimmt.

Zur Ausreifung von unreifen DCs wurden nach der fünftägigen Differenzierung mit IL-4 und GMCSF TNF- $\alpha$  (1000 U/ml), PGE<sub>2</sub> (1  $\mu$ M) und IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) in die Wells zugegeben und die Zellen für zwei weitere Tage im Brutschrank inkubiert. Die reifen dendritischen Zellen (mDCs = *mature dendritic cells*) wurden genauso geerntet wie die iDCs.

Für einige Experimente wurden die iDCs nach den fünf Tagen Inkubationszeit in den 6-Well-Platten mit *hemocyanin keyhole limpet* (KLH) (Fa. Merck, Darmstadt, D) in einer Konzentration von 25  $\mu$ g/ml oder Tetanustoxoid (TT) (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, D) in einer Konzentration von 5  $\mu$ g/ml für vier Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die iDCs wie oben beschrieben geerntet und zentrifugiert, dann jedoch vor dem Zählen in 20 ml PBS resuspendiert und zentrifugiert (330 g, 4 °C, 10 min, Beschleunigung 9, Bremsung 4). Nach dem Zählen wurde die Zellkonzentration wieder auf 1 Mio. pro 1 ml RPMI-Vollmedium eingestellt, IL-4 (500 U/ml), GMCSF (1000 U/ml), TNF- $\alpha$  (1000 U/ml), PGE<sub>2</sub> (1  $\mu$ M) und IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) zugegeben und die iDCs á 2 ml in 6-Well-Platten für zwei Tage im Brutschrank ausgereift. Die iDCs, die nach ihrer Ausreifung mit TT- oder KLH-beladenen Zellen verglichen werden sollten, wurden abgesehen von der Zugabe von TT bzw. KLH der gleichen Vorgehensweise unterzogen.

Vor den weiteren Experimenten wurde ein Teil der geernteten iDCs und mDCs dazu verwendet, die Expression der Oberflächenmoleküle mittels Durchflusszytometrie zu untersuchen.

## 2.3 Durchflusszytometrie

### 2.3.1 Grundlagen der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie mittels eines *fluorescence-activated cell sorters* (FACS) ermöglicht die Unterscheidung und Analyse von Zelleigenschaften wie Größe, Granularität und Expression von Oberflächenmolekülen. Dazu werden die zu untersuchenden Zellen mit fluoreszenzgekoppelten, gegen ein bestimmtes Oberflächenantigen gerichteten Antikörpern markiert und in einem laminaren Flüssigkeitsstrom einzeln durch einen Laserstrahl geleitet.

Das Auftreffen der Lichtstrahlen auf die Zellen führt zu einer Lichtstreuung. Das in Verlaufsrichtung des Lasers abgelenkte Vorwärtsstreulicht oder sog. *forward scatter* (FSC) und das dazu rechtwinklig abgestrahlte Seitwärtsstreulicht oder *sideward scatter* (SSC) werden von je einer entsprechend angebrachten Linse gesammelt und photometrisch detektiert. Das Vorwärtsstreulicht dient als Maß für die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht als Maß für die intrazelluläre Granularität. Anhand dieser Kriterien kann die gewünschte Zellpopulation ausgewählt und auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht werden.

Das Fluorochrom, das an die zur Oberflächenmarkierung verwendeten Antikörper gekoppelt ist, absorbiert einen Teil der Lichtenergie des Laserstrahls und emittiert Fluoreszenzlicht. Das emittierte Licht wird durch Linsen gesammelt und durch Spiegel und Filter nach Wellenlängenbereichen aufgetrennt, bevor es unterschiedliche Detektoren erreicht. So können die Signale mehrerer verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe bei der Mehrfarbenanalyse getrennt aufgenommen und quantitativ ausgewertet werden. Dabei ist die Fluoreszenzintensität proportional zur Anzahl der pro Zelle gebundenen Antikörper und damit zur Anzahl der untersuchten Oberflächenmoleküle.

Da sich die Emissionsspektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe teilweise überlappen, gelingt die Auftrennung der Fluoreszenzintensitäten der verschiedenen Fluorochrome nicht vollständig. Diese Überlappung wird durch die Kompensation korrigiert, indem von jedem detektierten Fluoreszenzsignal der Anteil abgezogen wird, der auf der Überschneidung der Emissionsspektren beruht. Dazu werden bei jedem Versuch Kontrollproben verwendet, die jeweils nur mit einem fluoreszenzgekoppelten Antikörper markiert wurden. Außerdem werden Isotypenkontrollen durchgeführt, indem Kontrollproben Antikörper zugegeben werden, die nicht gegen zelluläre Oberflächenantigene gerichtet sind, aber jeweils dem Isotyp der verwendeten spezifischen Antikörper entsprechen und mit dem gleichen Farbstoff gekoppelt sind. So kann die unspezifische Eigenfluoreszenz der Zellen und die unspezifische Bindung sowohl der Antikörper bestimmter Isotypen als auch der Farbstoffe detektiert werden.

Das für die Experimente verwendete Durchflusszytometer FACSCalibur besitzt zwei verschiedene Laser, die die verwendeten Fluorochrome zur Fluoreszenz anregen. Ein Argonlaser emittiert monochromatisches Licht der Wellenlänge 488 nm und ein Diodenlaser emittiert monochromatisches Licht der Wellenlänge 635 nm.

### 2.3.2 Bestimmung der zellulären Oberflächenmoleküle

Für die Analyse der Oberflächenmoleküle der iDCs und mDCs wurden  $1 \times 10^4$  –  $1 \times 10^5$  Zellen in 50 – 100  $\mu$ l PBS oder RPMI-Vollmedium in einem FACS-Röhrchen (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, D) mit FITC-, PE-, PerCP- und APC-gekoppelten (siehe Tabelle 2) und gegen CD83, CD80, HLA-DR (*human leukocyte antigen DR*) und CD14 gerichteten Antikörpern (alle Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, D) für 20 min bei 4 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurde ein Waschschrift mit 3 ml PBS pro Röhrchen durchgeführt, wobei die Zellen nach der Zentrifugation (400 g, 4 °C, 7 min) und dem Dekantieren des Überstands in 200  $\mu$ l PBS resuspendiert wurden. Die Fluoreszenzintensität der markierten Zellen wurde mit dem Durchflusszytometer gemessen und mit den Programmen CellQuest 4.0 (Beckton Dickinson, Heidelberg, D) und WinMDI 2.2.8 (Joseph Trotter) ausgewertet.

**Tabelle 2** Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe mit den entsprechenden maximalen Exzitations- und Emissionswellenlängen zur Analyse der DC-Oberflächenmoleküle

Fluoreszenzfarbstoff	Exzitation	Emission
Allophycocyanin (APC)	650 nm	660 nm
Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)	494 nm	518 nm
Peridinin-Chlorophyll-A-Protein (PerCP)	488 nm	675 nm
Phycoerythrin (PE)	565 nm	575 nm

### 2.3.3 Messung der intrazellulären Calciumkonzentration

Für die Messung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Fluo-3 und Fura Red (siehe Tabelle 3) jeweils als Acetoxymethylester-Derivate (Fa. Molecular Probes, Leiden, NL) eingesetzt, da sie in dieser Form die Zellmembran durchdringen können. Zusätzlich wurde Pluronic F-127 (Fa. Molecular Probes, Leiden, NL), ein Polyalkohol und nichtionisches Detergens, verwendet, um die Verteilung und damit auch die Aufnahme der Acetoxymethylester-Derivate zu optimieren. Intrazellulär werden die Acetoxymethylester von unspezifischen Esterasen abgespalten und die Fluoreszenzfarbstoffe können in dieser Form nur sehr langsam die Zelle wieder verlassen. Die Fluoreszenzfarbstoffe binden in der Zelle  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, wobei mit steigender intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung erhöht und so die Fluoreszenzintensität von Fluo-3 ansteigt, während die Fluoreszenzintensität von Fura Red abfällt.

Das Durchflusszytometer regt die Fluoreszenzfarbstoffe mit dem monochromatischen Licht der Wellenlänge 488 nm des Argonlasers an. Das Fluoreszenzsignal von Fluo-3

bzw. Fura Red wird jeweils über den Detektor registriert, der bei Standardfärbungen FITC- bzw. PerCP-Signale detektiert. Falls ein externer Stimulus durch intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem extrazellulären Raum zu einer höheren intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt, kann dies mit dem Durchflusszytometer durch die steigende bzw. abnehmende Fluoreszenzintensität von Fluo-3 bzw. Fura Red detektiert werden.

**Tabelle 3** Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe mit den entsprechenden maximalen Exzitations- und Emissionswellenlängen zur Bestimmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration

<b>Fluoreszenzfarbstoff</b>	<b>Exzitation (<math>\text{Ca}^{2+}</math>-gebunden)</b>	<b>Emission (<math>\text{Ca}^{2+}</math>-gebunden)</b>
Fluo-3	506 nm	526 nm
Fura Red	435 nm	639 nm

Zur Messung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurden  $1 - 5 \times 10^6$  iDCs in 1 ml purem RPMI-Medium mit Fluo-3 (4  $\mu\text{g/ml}$ ), Fura Red (10  $\mu\text{g/ml}$ ) und Pluronic (0,02 Vol.-%) (alle in DMSO gelöst) in einem sterilen 5 ml-Röhrchen mit Deckel (Becton Dickinson, Heidelberg, D) für 45 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit 3 ml RPMI-Medium, das 8 Vol.-% AB-Serum enthielt, gewaschen. Dabei wurde nach der jeweiligen Zentrifugation (330 g, 4 °C, 10 min) der Überstand vorsichtig abgenommen und nach dem zweiten Waschschrift wurden die Zellen auf eine Konzentration von 1 Mio. pro 1 ml RPMI-Medium mit 8 Vol.-% AB-Serum eingestellt. Je 400 000 Zellen wurden für eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Messung in ein steriles Röhrchen pipettiert. Die iDCs wurden danach zum Teil mit DHS in einer Konzentration von  $10^{-6}$  M für 30 min im Brutschrank präinkubiert. Vor der durchflusszytometrischen Messung wurden alle Zellen für 15 – 30 min im Brutschrank im Dunkeln bei 37 °C inkubiert.

Bei der durchflusszytometrischen Messung der Proben wurden die Fluoreszenzsignale der  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikatoren vor und nach Zugabe von MIP-1 $\alpha$ , SDF-1 (jeweils 100 ng/ml) oder S1P ( $10^{-6}$  M) aufgezeichnet. Als Positivkontrolle wurde Calcium-Ionomycin (2  $\mu\text{g/ml}$ ) verwendet. Ionomycin hat als Ionophor die Fähigkeit  $\text{Ca}^{2+}$  zu binden und durch die Zellmembran zu transportieren und somit die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu erhöhen [Beeler et al., 1979; Liu et al., 1978].

Die mittels FACS gewonnenen Daten wurden mit der Software FlowJow (Fa. Tree Star Inc., San Carlos, CA, USA) ausgewertet. Dabei wurde als Maß für die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der Quotient MFI (*mean fluorescence intensity*) Fluo-3 / MFI Fura Red verwendet [Novak et al., 1994].

## 2.4 Migrationsversuche

### 2.4.1 *Transwell assay*

Zur Untersuchung der Migration von DCs auf verschiedene Chemokine und S1P wurde ein *transwell assay* verwendet.

In eine 24-Well-Zellkulturplatte wurde pro Well 600  $\mu$ l Medium mit einer bestimmten S1P- oder Chemokin-Konzentration pipettiert. Die *transwells* wurden mit je 100  $\mu$ l Medium gefüllt, worin je nach Versuch 30 000, 50 000 oder 100 000 iDCs oder mDCs suspendiert waren. Jeweils ein *transwell* mit der Zellsuspension wurde in ein mit Medium befülltes Well der 24-Well-Zellkulturplatten eingesetzt. Auf diese Art entstanden zwei Kompartimente: Das obere Kompartiment mit den Zellen, die in reinem Medium ohne chemotaktisch aktive Substanzen suspendiert waren, und das untere Kompartiment mit Medium, das Chemokine und S1P in bestimmten Konzentrationen enthielt. Getrennt waren diese beiden Kompartimente durch die Polycarbonatmembran mit der Porengröße 0,5  $\mu$ m, die den Boden des *transwells* bildete.

Die Zellkulturplatten mit den *transwells* wurden für 2 h bzw. 4 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die *transwells* entfernt und die Anzahl der Zellen, die durch die Polycarbonatmembran in das untere Kompartiment migriert waren, bestimmt.

### 2.4.2 Bestimmung der Anzahl der migrierten Zellen

Zwei verschiedene Methoden wurden verwendet, um die Anzahl der migrierten Zellen zu bestimmen. Zum einen wurde nach der Inkubation zuerst das Medium aus dem unteren Kompartiment, also aus der 24-Well-Platte, in FACS-Röhrchen gefüllt. Die Zellzahl wurde dann mit dem Durchflusszytometer 120 s auf der Stufe *high* gemessen und anschließend auf das Gesamtvolumen der Probe hochgerechnet. Zum anderen wurden die Zellen in dem Medium des unteren Kompartiments in Eppendorf-Gefäßen abzentrifugiert (350 g; 4 °C; 10 min), das Medium bis auf 10  $\mu$ l bzw. 50  $\mu$ l abgenommen und die Zellen im verbliebenem Medium resuspendiert. Danach wurden 10  $\mu$ l der Zellsuspension unverdünnt in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und die Zellkonzentration unter dem Mikroskop bestimmt. Zuletzt wurde aus Zellkonzentration und Volumen der Zellsuspension die Anzahl der migrierten Zellen berechnet.

### 2.4.3 Verwendete Chemokine und Inhibitoren

Mit diesem *transwell assay* wurde sowohl die Migration von mDCs auf S1P und die Chemokine 6CKine und MIP-3 $\beta$ , als auch die Migration von iDCs auf S1P und die Chemokine MIP-1 $\alpha$  und SDF-1 untersucht. Als Kontrolle wurden *transwells* mit DCs in Wells eingesetzt, die nur Medium ohne chemotaktischen Stimulus enthielten, um so die Anzahl der spontan migrierenden Zellen zu ermitteln. Jede Bedingung wurde in Duplikaten oder Triplikaten untersucht.

In bestimmten Versuchen wurden mDCs und iDCs mit DHS, einem Inhibitor der Sphingosinkinase, für 30 Minuten vor der Migration präinkubiert, um die Abhängigkeit der Migration von der Sphingosinkinase zu prüfen. Die iDCs wurden in einigen Experimenten auch mit Suramin, einem Inhibitor des Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptors-3 (S1P<sub>3</sub>), oder mit Y-27632, einem Inhibitor der Rho-Kinase, für 30 min präinkubiert. Auf diese Weise wurde die Abhängigkeit der Migration der iDCs bezüglich S1P<sub>3</sub> und Rho-Kinase untersucht.

## 2.5 Reverse-Transkription-Polymerase-Ketten-Reaktion

### 2.5.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Das Verfahren der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ermöglicht es, ein spezifisches Desoxyribonukleinsäure (DNA) -Segment, das sogenannte *template*, innerhalb eines Nukleinsäuregemisches zu amplifizieren. Zur Durchführung der Reaktion sind eine thermostabile DNA-Polymerase und ein sequenzspezifisches Oligonukleotid-Primerpaar, das homolog zu den Enden des *templates* ist, notwendig. Die Polymerase-Ketten-Reaktion erfolgt in drei Schritten. Zuerst findet die hitzebedingte Denaturierung der DNA statt, wobei DNA-Doppelstränge in Einzelstränge getrennt werden. Danach erfolgt die Hybridisierung der Primer an die Zielsequenz der einzelsträngigen, zu amplifizierenden DNA. Im dritten Schritt bewirkt die hitzestabile DNA-Polymerase die Elongation der Primer mit Nukleotiden, so dass aus dem Einzelstrang des *templates* ein doppelsträngiges DNA-Stück entsteht, dessen Einzelstränge in der folgenden dreischrittigen Reaktion beide als Matrize zur Amplifikation dienen können. Auf diese Weise kann durch viele aufeinanderfolgende Zyklen eine exponentielle Anreicherung einer spezifischen DNA-Sequenz erfolgen.

Die Reverse-Transkription-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) dient zur Amplifikation eines spezifischen Ribonukleinsäure (RNA) -Stücks. Dazu wird diese RNA-Sequenz mit Hilfe einer Reversen-Transkriptase und einem spezifischen

Oligonukleotid-Primerpaar vor der eigentlichen PCR in den sogenannten *complementary-DNA* (cDNA) –Einzelstrang umgeschrieben. Hierzu wurde das *Titan One Tube RT-PCR Kit* von Roche Diagnostics verwendet. Zur Durchführung der kompletten RT-PCR ist dabei nur ein Reaktionsansatz nötig, da in dem Primer-Mix neben der *AMV reverse transcriptase* für die Reverse Transkription auch die *Taq DNA polymerase* und die *Tgo DNA polymerase* für die PCR enthalten sind.

### 2.5.2 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung wurde mit TRIZOL Reagent, einer monophasischen Lösung aus Phenol und Guanidinisothiozyanat, durchgeführt.

Zuerst wurden  $5 \times 10^5$  –  $2 \times 10^6$  iDCs, mDCs und mit Tetanustoxoid oder KLH beladene mDCs abzentrifugiert (300 g, 4°C, 10 min), in einem 1,5-ml-Eppendorf-Gefäß in 1 ml TRIZOL Reagent resuspendiert, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und bis zur Verwendung bei – 80 °C gelagert. TRIZOL lysiert dabei die Zelle, während die Integrität der RNA erhalten bleibt.

Zur RNA-Isolierung wurden diese Proben auf Eis aufgetaut und je 200 µl Chloroform zugegeben. Nach 15 s Schütteln und 3 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben zentrifugiert (12000 g, 4 °C, 15 min). Die obere wässrige Phase, die die RNA enthielt, wurde vorsichtig in ein neues 1,5-ml-Eppendorf-Gefäß pipettiert, während die organische Phase und die Interphase, die die Proteine und die DNA enthielten, verworfen wurden. Pro Probe wurde 500 µl Isopropanol zu der wässrigen Phase zugegeben, die Proben wurden dann nach kurzem Schütteln für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zentrifugation (12000 g, 4 °C, 10 min) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und die präzipitierte RNA in 1 ml 75 %gem Ethanol (15 % Aqua ad iniectionabilia) resuspendiert. Die Proben wurden anschließend kurz mit dem Vortexer gemischt und zentrifugiert (8000 g, 4 °C, 5 min). Nach der Abnahme des Überstands und der Verdunstung des restlichen Ethanols wurde die RNA in Aqua ad iniectionabilia resuspendiert. Pro  $1 \times 10^6$  Zellen wurden je nach Versuch 20 – 30 µl Aqua ad iniectionabilia verwendet. Die Proben wurden bei – 80 °C gelagert.

### 2.5.3 Durchführung der Reverse-Transkription-Polymerase-Ketten-Reaktion

Zur Durchführung der RT-PCR wurden verschiedene Oligonukleotid-Primerpaare für bestimmte Ziel-Messenger-RNA (mRNA) und somit Ziel-cDNA verwendet (siehe Tabelle 4). Die Primer wurde von Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)

hergestellt. Die Primersequenzen der Rezeptoren S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> wurden entsprechend einer Veröffentlichung von Idzko und Mitarbeitern [Idzko et al., 2002] gestaltet. Die Sequenzen der Primerpaare für Sphingosinkinase 1 (SphK-1) und GAPDH wurden freundlicherweise von Roland Derwand, Physiologisches Institut, Ludwig-Maximilians-Universität München, zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 4** Verwendete Primerpaare zur Durchführung der RT-PCR

<b>Ziel-cDNA</b>	<b>Primersequenz</b>
GAPDH (599 bp Produkt)	5'-TCC AAA ATC AAG TGG GGC GAT GCT-3' 5'-ACC ACC TGG TGC TCA GTG-3'
SphK-1 (693 bp Produkt)	5'-CCT TCA CGG TGA TGC TCA CTG AGC G-3' 5'-GGC CCA TGG GTG CAG CAA ACA TCT-3'
S1P <sub>1</sub> -Rezeptor (429 bp Produkt)	5'-TAT CAG CGC GGA CAA GGA GAA CAG-3' 5'-ATA GGC AGG CCA CCC AGG ATG AG-3'
S1P <sub>2</sub> -Rezeptor (220 bp Produkt)	5'-TCG GCC TTC ATC GTC ATC CTC T-3' 5'-CCT CCC GGG CAA ACC ACT G-3'
S1P <sub>3</sub> -Rezeptor (394 bp Produkt)	5'-CTG CCT GCA CAA TCT CCC TGA CTG-3' 5'-GGC CCG CCG CAT CTC CT-3'

Die RT-PCR wurde mit dem *Titan One Tube RT-PCR Kit* durchgeführt. Für die RT-PCR zu einem Primerpaar wurde ein Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 µl hergestellt (siehe Tabelle 5).

**Tabelle 5 Ansatz zur Durchführung der RT-PCR**

<b>Reagenz</b>	<b>Menge</b>
H <sub>2</sub> O	13,15 µl
5 x RT-PCR <i>buffer</i>	5 µl
dNTP mix	0,5 µl
DTT	1,25 µl
RNase Inhibitor	0,1 µl
RNA	2 µl
Primer <i>forward</i>	1,25 µl
Primer <i>reverse</i>	1,25 µl
<i>Titan enzyme mix</i> ( <i>AMV reverse transcriptase, Tag DNA polymerase, Tgo DNA polymerase</i> )	0,5 µl

#### **2.5.4 Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente wurde ein 1,5 %iges Agarosegel verwendet. Dazu wurden 1,95 g Agarose mit 130 ml TBE-Puffer in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Nach Zugabe von 5,0 µl Ethidiumbromid der Konzentration 10 µg/ml wurde es in die vorbereitete Gelkammer mit eingelegtem Kamm gegossen und härtete 1h bei Raumtemperatur aus. Der Gelkamm wurde entfernt und das Agarosegel wurde in die mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer eingebracht. Die Proben mit einem Volumen von 25 µl wurden mit je 5 µl Blaupuffer in die Geltaschen geladen. Dabei erleichterte das im Blaupuffer enthaltene Bromphenolblau als Farbstoff das Einpipettieren, und das ebenfalls enthaltene Glycerin beschleunigte aufgrund seiner höheren Dichte das Absinken der Probe in die Tasche. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde jedes Gel mit dem DNA-Größenmarker *DNA Molecular Weight Marker XIV 100 bp ladder* (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim, D) oder *1 Kb Plus DNA Ladder* (Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) beladen. Dann wurde ein elektrisches Feld mit einer Spannung von 85 Volt und einer nicht begrenzten Stromstärke angelegt. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid interkaliert in die Nukleotidstränge, wodurch die Auftrennung der DNA-Fragmente im UV-Licht (366 nm) kontrolliert werden konnte. Die Gele wurden nach der Elektrophorese im UV-Licht mit einer Polaroidkamera fotografiert.

## 2.5.5 Semiquantitative Auswertung

Die optische Dichte der Banden wurde mit der NIH (National Institutes of Health) IMAGE Software bzw. mit dem Fluor-S™ Multilmager (Fa. Bio-Rad, Hercules, CA, USA) und der Software Quantity One 4.2.3 (Fa. Bio-Rad, Hercules, CA, USA) analysiert. Der Fluor-S™ Multilmager des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr in München durfte freundlicherweise für die Auswertung unserer Versuche genutzt werden. Die Menge an mRNA wurde als optische Dichte der Banden der Sphingosinkinase bzw. der S1P-Rezeptoren per optische Dichte der GAPDH-Banden der entsprechenden Zellpopulation berechnet, woraus sich Indexwerte der relativen Expression ergaben.

## 2.6 Western Blot

### 2.6.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Mit dem Western Blot ist es möglich, spezifische Proteine in einem Proteingemisch zu identifizieren und quantifizieren. Bei der Durchführung des Western Blots wird zuerst das Proteingemisch in einer Gelelektrophorese aufgetrennt, dann die Proteine auf eine Membran übertragen und zuletzt die spezifischen Proteine mittels Antikörper detektiert.

Für den Proteinnachweis wurde in dieser Arbeit die diskontinuierliche *Sodium-dodecyl-sulfate*-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet, die es ermöglicht Proteine nach ihrer Molekularmasse aufzutrennen. Bei dieser Methode werden die Proteine vor der Gelelektrophorese denaturiert. Dabei wird *Sodium-dodecyl-sulfate* (SDS) eingesetzt, um die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine aufzuheben. Im Probenpuffer enthaltenes  $\beta$ -Mercaptoethanol führt zur Reduktion der Disulfidbrückenbindungen. Das SDS lagert sich mit seinem hydrophoben Teil an das lineare Protein an und führt durch seine negative Ladung zu einem negativ geladenen Komplex mit einem konstanten Verhältnis von negativer Ladung zu Proteinmasse. Die ursprüngliche Ladung des Proteins wird dabei von der stark negativen Ladung des SDS überdeckt.

Zur Herstellung der Gele wird Polyacrylamid verwendet. Acrylamidmonomere werden durch N,N'-Methylenbisacrylamid unter der Katalysierung von N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat (APS) quervernetzt. Die Porengröße des Gels ist vom Acrylamidgehalt und vom Verhältnis Bisacrylamid zu Acrylamid abhängig. Bei der Gelelektrophorese durchlaufen die Proben zuerst das Sammelgel und dann das Trenngel, um scharf begrenzte Banden zu erhalten. Dieser

Effekt beruht auf der verschiedenen Ladung von dem im Laufpuffer enthaltenen Glycin bei unterschiedlichen pH-Werten. Das Glycin ist im Sammelgel bei einem pH-Wert von 6,8 zum größten Teil ungeladen und wandert daher sehr langsam im elektrischen Feld. Die Chloridionen des Gelpuffers wandern hingegen sehr schnell. Deshalb entsteht im Bereich zwischen diesen beiden wandernden Ladungsträgern hohe elektrische Spannung, wodurch die Proteine, die sich als einzige Ladungsträger zwischen Glycin und Chloridionen befinden, schneller wandern und so fokussiert werden. Die niedrige Acrylamidkonzentration und die damit verbundenen größeren Poren tragen ebenfalls zu diesem Effekt bei. Auf diese Art wandern die Proteine relativ gleichzeitig vom Sammelgel in das Trenngel. Dort herrscht ein pH-Wert von 8,8 was dazu führt, dass die Glycinionen negativ geladen sind und so schneller als die Proteine wandern können. Zusätzlich sind die Poren deutlich kleiner als im Sammelgel. Daher werden die Proteine nun nach ihrer Molekularmasse aufgetrennt.

### **2.6.2 Probenvorbereitung**

Nach einem Waschschrift mit PBS (Zentrifugation 330 g, 4°C, 10 min) wurde der Überstand abgenommen, die DCs wurden in 100 µl Lyse-Puffer pro  $1 \times 10^6$  Zellen aufgenommen und in ein 1,5-ml-Eppendorf-Gefäß überführt. Zur Lysierung der Zellen wurden die Proben für 30 min auf Eis gestellt und alle 5 min mit dem Vortexer gemischt. Das im Lyse-Puffer enthaltene SDS führte dabei zum Verlust der höheren Proteinstrukturen. Nach der anschließenden Zentrifugation in der Eppendorf-Zentrifuge (10000 rpm, 4°C, 20 min) wurde der Überstand in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und bei – 80 °C gelagert. Direkt vor der SDS-PAGE wurden die Proben mit dem Probenpuffer 5 min bei 95 °C gekocht.

### **2.6.3 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben wurden jeweils 10 µl der Proben und der Standard-Verdünnungsreihe in Duplikaten in eine 96-Well-Platte pipettiert. Die Standard-Verdünnungsreihe bestand aus in Lyse-Puffer gelöstem BSA in den Konzentrationen 0, 50, 100, 200, 400, 600, 800 und 1000 µg/ml. Das Bradford-Reagenz wurde 1:5 mit dH<sub>2</sub>O verdünnt und jeweils 200 µl des verdünnten Bradford-Reagenz wurden in ein Well zu den Proben der Zell-Lysate und der Verdünnungsreihe pipettiert. Proportional zur Proteinkonzentration erfolgte ein blauer Farbumschlag, der im *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) -Reader unter der Verwendung eines Filters der Wellenlänge 570 nm gemessen wurde.

### 2.6.3 Durchführung der *Sodium-dodecyl-sulfate*-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die SDS-PAGE wurden Mini-Gele verwendet (siehe Tabelle 6). Zuerst wurde das Trenngel gegossen und mit 75 %igem Isopropanol überschichtet. Nachdem das Gel 1-2 h lang ausgehärtet war, wurde das Isopropanol verworfen, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Kamm in das Sammelgel gesteckt. Gelplatten, Gießständer und Elektrophoresekammern wurden von der Fa. Bio-Rad (Hercules, CA, USA) bezogen.

**Tabelle 6 Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel**

<b>Trenngel (10 %)</b>		<b>Sammelgel (4%)</b>	
12 ml	dH <sub>2</sub> O	6 ml	dH <sub>2</sub> O
7,5 ml	1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml	1 M Tris-HCl pH 6,8
10 ml	Polyacrylamid 30 % (19:1)	1,25 ml	Polyacrylamid 30 % (19:1)
150 µl	SDS 10 %	100µl	SDS 10 %
30 µl	TEMED	20 µl	TEMED
200 µl	APS	100 µl	APS

Nach 1 h wurde der Gelkamm entfernt, das Gel in die Elektrophoresekammer eingebracht und die Kammer mit Laufpuffer gefüllt. Die Geltaschen wurden mit den Proben beladen und in jedem Gel wurde der Molekularmassenmarker *Precision Plus Protein Standards Dual Color* (Fa. Bio-Rad, Hercules, CA, USA) mitgeführt. Anschließend wurde ein elektrisches Feld mit der Spannung von 50 V angelegt. Nachdem die Proben in das Trenngel eingetreten waren, wurde die Spannung auf 100 V erhöht. Die Stromstärke wurde nicht begrenzt.

### 2.6.4 Proteintransfer

Nach erfolgter SDS-PAGE wurden die Proteine des Gels mittels *semi-dry-blot* auf eine PVDF-Membran (Fa. Millipore, Billerica, MA, USA) übertragen. Dazu musste zuerst die PVDF-Membran vorbereitet werden, indem sie nacheinander 10 s in Methanol, 5 min in dH<sub>2</sub>O und 10 min in Blot-Puffer eingelegt wurde. Das Sammelgel wurde vom Trenngel entfernt und die Membran und die Filterpapiere wurden exakt auf die Größe des Trenngels zugeschnitten. Die untere Elektrodenplatte des Blotting-Apparats (Anode) wurde mit Blot-Puffer befeuchtet. Die Filterpapiere, das Gel und die Membran wurden vor ihrer Anwendung in Blot-Puffer eingelegt. Pro Gel wurden zuerst vier Filterpapiere

übereinander auf die untere Elektrodenplatte geschichtet. Darauf folgten die Membran, dann das Gel und zuletzt vier weitere Filterpapiere. Sowohl über jedes einzelne Papier als auch über die Membran und das Gel wurde eine Glaspipette gerollt, um mögliche Luftblasen zwischen den Schichten zu entfernen und einen ungestörten Proteintransfer zu gewährleisten. Die obere Elektrodenplatte (Kathode) wurde leicht mit Blot-Puffer befeuchtet und vorsichtig über die aufgeschichteten Stapel gelegt. Zusätzlich wurde sie mit drei dünnen Bleiplatten beschwert, um den Proteintransfer zu optimieren. Dann wurde 90 min lang ein elektrisches Feld mit einer Stromstärke von 0,14 A pro Gel ohne begrenzenden Spannungswert angelegt.

### 2.6.5 Proteindetektion

Anschließend an den *semi-dry-blot* wurde die Membran in TBST mit 5 % Trockenmilchpulver (Fa. Bio-Rad, Hercules, CA, USA) inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen vor der Proteindetektion abzudecken. Dieses sogenannte Blocken erfolgte entweder bei 4 °C über Nacht oder bei Raumtemperatur für 2 h und wie auch alle folgenden Inkubations- und Waschschrirte unter sanftem Rütteln.

Danach wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit einem Primärantikörper, der in TBST mit 5 % Milchpulver verdünnt worden war, inkubiert (siehe Tabelle 7).

**Tabelle 7** Verwendete Primärantikörper zur Proteindetektion

Bezeichnung	Molekular- gewicht	Verdünnung	Firma
Anti-EDG-1 (=S1P <sub>1</sub> ), polyklonal, <i>rabbit</i>	44 kDa	5 µg / ml	Fa. Biomol (Hamburg, D)
Anti-EDG-3 (=S1P <sub>3</sub> ), monoklonal, <i>mouse</i>	45 kDa	7,5 µg / ml	Fa. Biomol (Hamburg, D)
Anti-EDG-5 (=S1P <sub>2</sub> ), polyklonal, <i>rabbit</i>	42 kDa	5 µg / ml	Fa. Biomol (Hamburg, D)
Anti-p38-MAP-Kinase, polyklonal, <i>rabbit</i>	43 kDa	1:1000	Fa. Cell Signaling (Danvers, MA, USA)

Anschließend wurde die Membran fünfmal jeweils 5 min mit TBST gewaschen, bevor sie mit dem Sekundärantikörper, der ebenfalls in TBST mit 5 % Milchpulver verdünnt worden war, für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Je nach Spezies des Primärantikörpers wurde der mit Meerrettichperoxidase-konjugierte Anti-*rabbit*- oder Anti-*mouse*-Sekundärantikörper (Fa. Amersham, Buckinghamshire, UK) verwendet, der an den konstanten Teil des Primärantikörpers band. Danach wurde die Membran erneut fünfmal mit TBST für je 5 min gewaschen. Anschließend wurde das *ECL*

*Detection Reagent* (Fa. Amersham, Buckinghamshire, UK) auf die Membran pipettiert und 1 min lang inkubiert. Die Membran wurde luftblasenfrei in Frischhaltefolie eingepackt und in die Filmkammer eingebracht. An den Stellen, wo der Sekundärantikörper an den Primärantikörper gebunden hatte, wurde durch die Meerrettichperoxidase die Oxidation von Luminol im Substrat katalysiert, was zur Chemolumineszenz an diesen Stellen führte. Für die Detektion der Chemolumineszenzsignale und somit der gesuchten Proteinbanden wurden Filme des Typs Hyperfilm ECL (Fa. Amersham, Buckinghamshire, UK) verwendet. Nach unterschiedlicher Belichtungszeit wurden die Filme mit einer Entwicklungsmaschine entwickelt.

### **2.6.6 Strippen von Membranen**

Nach einer durchgeführten Proteindetektion kann eine Membran durch das sogenannte Strippen wieder von Primär- und Sekundärantikörper befreit werden, um danach ein anderes Protein zu detektieren. Dazu wurde die Membran nach erfolgtem Proteinnachweis dreimal jeweils 5 min lang in TBST gewaschen und 30 min bei 70 °C im Strip-Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für je 5 min in TBST gewaschen. Nach erneutem Blocken konnte eine erneute Proteindetektion erfolgen.

### **2.6.7 Auswertung**

Die entwickelten Western Blot Filme wurden mittels Fluor-S<sup>TM</sup> Multimager (Fa. Bio-Rad, Hercules, CA, USA) und der Software Quantity One 4.2.3 (Fa. Bio-Rad, Hercules, CA, USA) ausgewertet. Dabei wurde die optische Dichte der Banden der S1P-Rezeptoren auf den Filmen bestimmt. Von den Membranen, auf denen im ersten Schritt die S1P-Rezeptoren detektiert wurden, wurde im zweiten Schritt, nach dem Strippen der Membranen, die p38-MAP-Kinase detektiert. Es wurde schließlich das Verhältnis der Signalintensität der S1P-Rezeptoren zur Signalintensität der zugehörigen Banden der MAP-Kinase auf den entsprechenden Filmen berechnet. Diese Indexwerte der relativen Stärke der Expression wurden für die weitere statistische Auswertung verwendet.

## **2.7 Statistische Auswertung**

Die Ergebnisse der Versuche werden, falls nicht anderweitig gekennzeichnet, als arithmetisches Mittel angegeben, wobei die Streuung der Werte jeweils als

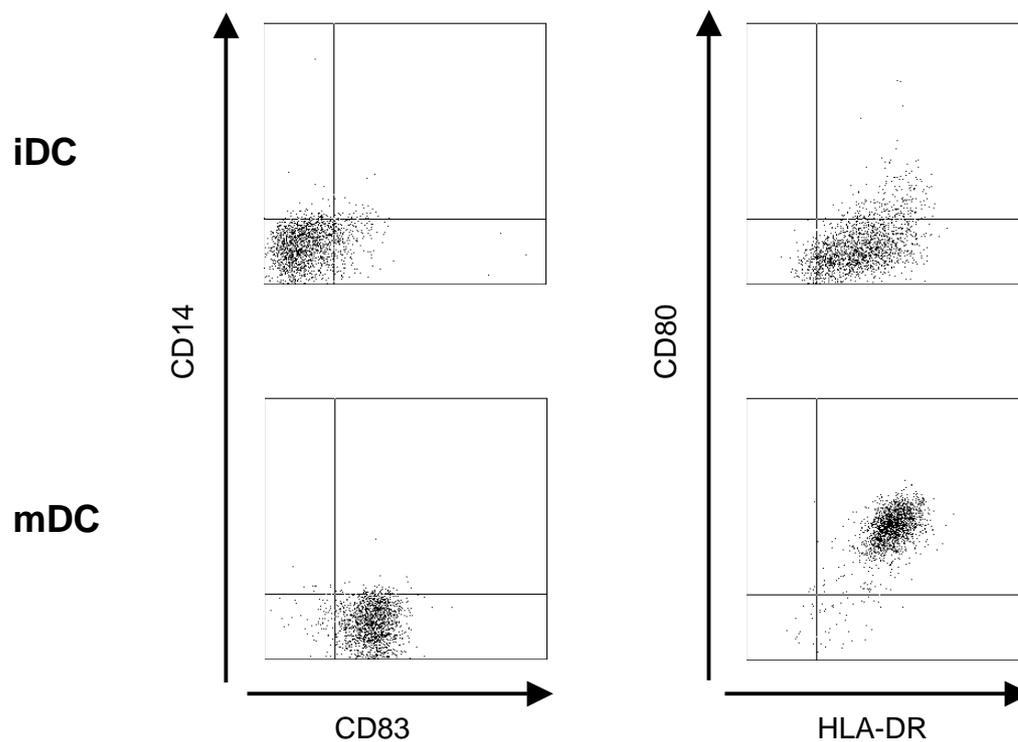
Standardfehler des Mittelwerts (SEM = *standard error of mean*) dargestellt wird. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde der zweiseitige Student-T-Test für gepaarte Stichproben verwendet. Statistische Signifikanz wurde bei p-Werten  $< 0,05$  bzw.  $< 0,01$  angenommen und ist mit \* bzw. \*\* gekennzeichnet. Die statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm Stat-View D-4.5 (Abacus Concepts, Calabasas, CA, USA) durchgeführt. Für die rechnerische Auswertung und die Erstellung von Grafiken wurden die Programme Microsoft Excel und Microsoft Power Point (Microsoft Cooperation, Redmond, WA, USA) verwendet.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Durchflusszytometrische Charakterisierung der Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen**

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten DCs wurden aus humanen Monozyten gewonnen. Die iDCs wurden in vitro aus Monozyten durch die fünftägige Inkubation mit GM-CSF (1000 U/ml) und IL-4 (500 U/ml) generiert, die Reifung zu mDCs wurde dann mittels einer weiteren Inkubation für zwei Tage mit TNF- $\alpha$  (10 ng/ml), IL-1 $\beta$  (1000 U/ml) und PGE<sub>2</sub> (1  $\mu$ g/ml) induziert.

Die iDCs und mDCs wurden durchflusszytometrisch an Hand der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle charakterisiert. Die iDCs waren negativ für CD14 und wiesen eine geringe Expression von CD83 und CD80 sowie eine hohe Expression von HLA-DR und damit von MHC-II-Molekülen auf. Die mDCs waren negativ für CD14, zeigten jedoch eine hohe Expression von CD83 und eine höhere Expression von CD80 und HLA-DR im Vergleich zu den iDCs (siehe Abb. 2).

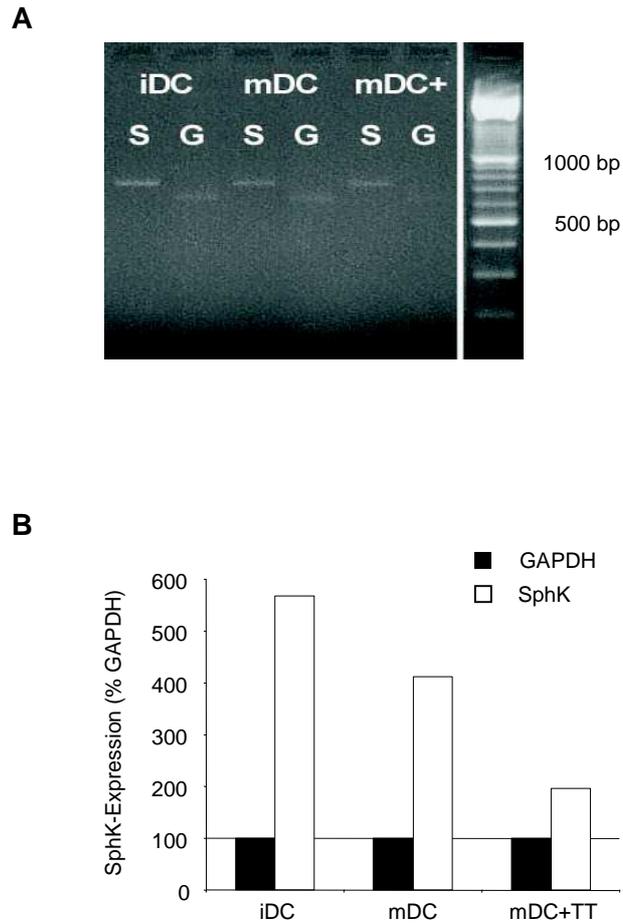


**Abb. 2 Durchflusszytometrische Charakterisierung von iDCs und mDCs im Vergleich**

Es ist die Expression der Oberflächenmarker CD14, CD83, CD80 und HLA-DR bei den Monozyten-abgeleiteten iDCs (oben) im Vergleich zu den mDCs (unten) abgebildet. Die Ergebnisse sind repräsentativ für n=4 Spender.

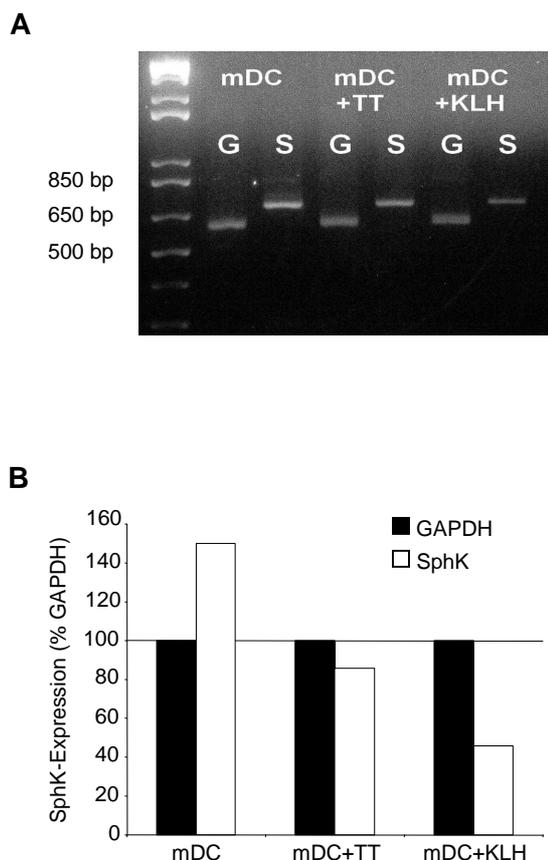
### 3.2 Expression der Sphingosinkinase in unreifen und reifen dendritischen Zellen

Bevor die Rolle von S1P und Sphingosinkinase bei der Migration von DCs untersucht wurde, wurde die mRNA-Expression der Sphingosinkinase 1 in iDCs, mDCs und mit Antigen beladenen mDCs mittels semiquantitativer RT-PCR getestet und untereinander verglichen. Die iDCs zeigten dabei eine stärkere Expression der Sphingosinkinase 1 als die mDCs. Die mDCs, die vor ihrer Ausreifung mit den Antigenen Tetanustoxoid oder KLH beladen worden waren, zeigten eine noch deutlichere Reduktion der Sphingosinkinase-Expression (siehe Abb. 3a, 3b, 4a und 4b).



### Abb. 3 mRNA-Expression der Sphingosinkinase

Abb. 3A zeigt ein RT-PCR-Gel, auf dem die mRNA-Expression der SphK-1 (S) in iDCs, mDCs und mit Tetanustoxoid (5µg/ml) beladenen mDCs (mDC+) zu sehen ist. Als *housekeeping*-Gen wurde GAPDH (G) und als Größenmarker *DNA Molecular Weight Marker XIV 100 bp ladder* (Fa. Roche) verwendet. Das Gel ist repräsentativ für n=4 verschiedene Spender. In Abb. 3B sind die Ergebnisse der optischen Dichtemessung der Banden und der semiquantitativen Analyse mittels NIH IMAGE Software dargestellt. Die iDCs weisen eine höhere mRNA-Expression der Spingosinkinase im Vergleich zu mDCs auf und es zeigt sich eine reduzierte Expression in mDCs nach Beladung mit Tetanustoxoid (mDC+TT). Die Ergebnisse konnten bei n=4 Spendern bestätigt werden, wegen der hohen inter-individuellen Abweichung zwischen den Spendern bildet die Graphik die Ergebnisse eines Spenders ab.



#### Abb. 4 mRNA-Expression der Sphingosinkinase

Abb. 4A zeigt ein RT-PCR-Gel, auf dem die mRNA-Expression der SphK-1 (S) in mDCs und mit Tetanustoxoid (5µg/ml) bzw. KLH (25 µg/ml) beladenen mDCs (mDC+TT bzw. mDC+KLH) zu sehen ist. Als *housekeeping*-Gen wurde GAPDH (G) und als Größenmarker *1Kb Plus DNA Ladder* (Fa. Invitrogen) verwendet. Das Gel ist repräsentativ für n=4 verschiedene Spender. In Abb. 4B sind die Ergebnisse der optischen Dichtemessung der Banden und der semiquantitativen Analyse mittels NIH IMAGE Software dargestellt. Es zeigt sich eine reduzierte SphK-Expression in mDCs nach Beladung mit Tetanustoxoid (mDC+TT) oder KLH (mDC+KLH). Die Ergebnisse konnten bei n=4 Spendern bestätigt werden, wegen der hohen inter-individuellen Abweichung zwischen den Spendern bildet die Graphik die Ergebnisse eines Spenders ab.

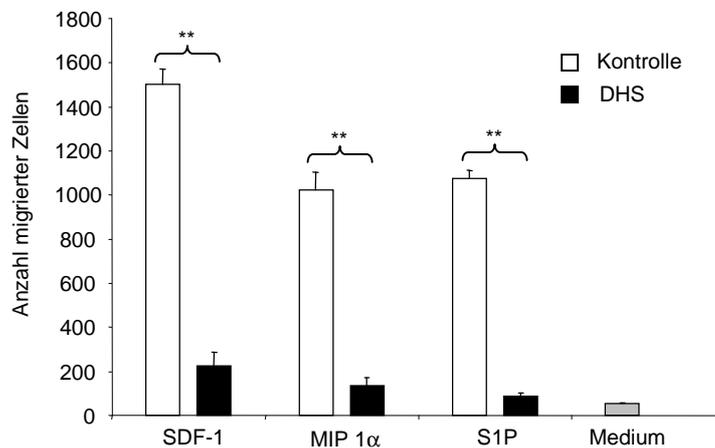
### 3.3 Einfluss der Sphingosinkinase auf die Migration dendritischer Zellen

#### 3.3.1 Abhängigkeit der Migration unreifer dendritischer Zellen von der Sphingosinkinase

Zur Untersuchung der Rolle von S1P und Sphingosinkinase wurde die Migration von iDCs auf bestimmte Chemokine sowie S1P getestet und dann mit der Migration von iDCs, die mit dem Sphingosinkinase-Inhibitor DHS präinkubiert worden waren, verglichen. Die Versuche wurden mit einem *transwell assay* durchgeführt. Als

Chemokine wurden SDF-1 (CXCL12) und MIP-1 $\alpha$  (CCL3) in einer Konzentration von 100 ng/ml verwendet. DHS wurde zur Vorinkubation der iDCs in einer Konzentration von 10<sup>-6</sup> M eingesetzt. Angemessene Konzentrationen der verwendeten Substanzen wurden in Vorversuchen ermittelt (Daten nicht gezeigt).

Der stärkste Stimulus für die Migration von iDCs war SDF-1, gefolgt von MIP-1 $\alpha$ . Die Migration der iDCs auf S1P war vergleichbar mit der Migration auf MIP-1 $\alpha$ . Die Anzahl der migrierten iDCs ohne Vorinkubation mit DHS auf SDF-1, MIP-1 $\alpha$  und S1P war im Vergleich zur Mediumkontrolle im gepaarten zweiseitigen T-Test signifikant erhöht ( $p < 0.01$ ). Die Vorinkubation der iDCs mit DHS, dem Inhibitor der Sphingosinkinase, reduzierte die Anzahl der migrierten iDCs auf die Chemokine und S1P signifikant (Siehe Abb. 5).



**Abb. 5 Einfluss von DHS auf die Migration von iDCs**

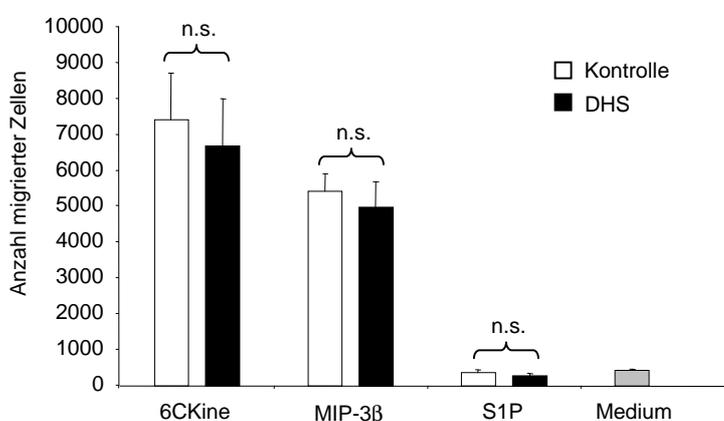
Dargestellt ist die Anzahl der migrierten iDCs ohne (Kontrolle) und nach Präinkubation mit DHS (DHS) auf die Chemokine SDF-1 und MIP-1 $\alpha$  (100 ng/ml) sowie S1P (10<sup>-6</sup> M) in einem *transwell* assay. Die Anzahl der migrierten iDCs ohne Vorinkubation mit DHS auf die Mediumkontrolle (ohne Zusatz von Chemokinen oder S1P) ist im grauen Balken dargestellt (Medium). Vorinkubation mit DHS (10<sup>-6</sup> M) verringerte die Anzahl der migrierten Zellen. In der Abb. sind die Mittelwerte von n=4 Spendern dargestellt, die Fehlerbalken kennzeichnen den jeweiligen SEM. Die statistische Signifikanz wurde mit dem gepaarten zweiseitigen T-Test berechnet (\*\*  $p < 0.01$ ).

### 3.3.2 Unabhängigkeit der Migration reifer dendritischer Zellen von der Sphingosinkinase

Entsprechend zu den Ergebnissen der Migration von iDCs wurde die Rolle von S1P und Sphingosinkinase bei der Migration von mDCs betrachtet. Die Migration von mDCs auf bestimmte Chemokine und S1P wurde ebenfalls ohne und nach Inkubation mit DHS (10<sup>-6</sup> M) in einem *transwell* assay untersucht. Als Chemokine wurden 6CKine

(CCL21) und MIP-3 $\beta$  (CCL19) in einer Konzentration von 100 ng/ml verwendet. Angemessene Konzentrationen der verwendeten Substanzen wurden in Vorversuchen ermittelt (Daten nicht gezeigt).

Die mDCs zeigten die stärkste migratorische Aktivität auf 6CKine, gefolgt von MIP-3 $\beta$ . Die Anzahl der migrierten mDCs ohne Vorinkubation mit DHS auf 6CKine und MIP-3 $\beta$  war im Vergleich zur Mediumkontrolle im gepaarten zweiseitigen T-Test signifikant erhöht ( $p < 0.01$ ). S1P bewirkte keine signifikante Erhöhung der Anzahl der migrierten mDCs verglichen mit der Mediumkontrolle. Die Vorinkubation der mDCs mit DHS, dem Inhibitor der Sphingosinkinase, führte zu keiner signifikanten Veränderung der Anzahl der migrierten mDCs auf die Chemokine 6CKine und MIP-3 $\beta$  oder S1P. (Siehe Abb. 6).



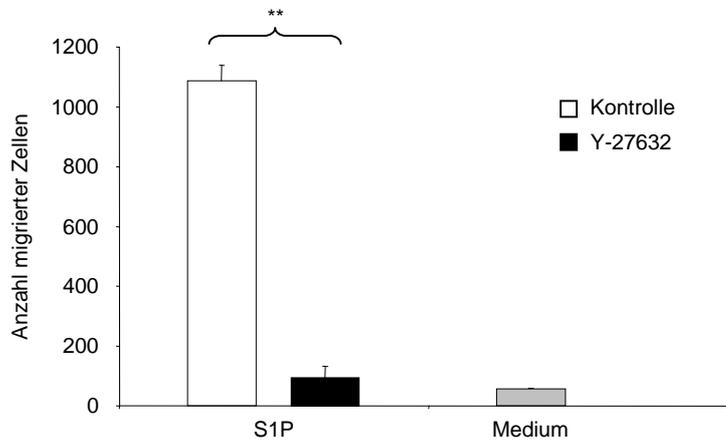
#### Abb. 6 Einfluss von DHS auf die Migration von mDCs

Dargestellt ist die Anzahl der migrierten mDCs ohne (Kontrolle) und nach Präinkubation mit DHS (DHS) auf die Chemokine 6CKine und MIP-3 $\beta$  (100 ng/ml) sowie S1P ( $10^{-6}$  M) in einem *transwell assay*. Die Anzahl der migrierten mDCs ohne Vorinkubation mit DHS auf die Mediumkontrolle (ohne Zusatz von Chemokinen oder S1P) ist im grauen Balken dargestellt (Medium). Die Vorinkubation mit DHS ( $10^{-6}$  M) beeinflusste die Anzahl der migrierten Zellen nicht. In der Abb. sind die Mittelwerte von  $n=4$  Spendern (bzw.  $n=3$  für MIP-3 $\beta$ ) dargestellt, die Fehlerbalken kennzeichnen den jeweiligen SEM. Die statistische Signifikanz wurde mit dem gepaarten zweiseitigen T-Test berechnet (n.s. = nicht signifikant).

### 3.4 Abhängigkeit der Migration unreifer dendritischer Zellen auf S1P von der Rho-Kinase

Um eine Vorstellung davon zu gewinnen, welche Wege der Signaltransduktion bei der Migration von iDCs auf S1P eine Rolle spielen, wurde die Migration auf S1P von nicht vorbehandelten iDCs mit iDCs verglichen, die mit einem Inhibitor der Rho-Kinase präinkubiert worden waren. Als Inhibitor der Rho-Kinase wurde Y-27632 verwendet.

Die Präinkubation mit Y-27632 in einer Konzentration von  $10^{-6}$ M führte zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl der migrierten iDCs (siehe Abb. 7). Die angemessene Konzentration der verwendeten Substanz wurde in Vorversuchen ermittelt (Daten nicht gezeigt).



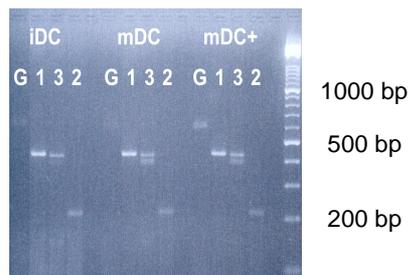
**Abb. 7 Einfluss der Rho-Kinase auf die Migration von iDCs auf S1P**

Dargestellt ist die Anzahl der migrierten iDCs ohne (Kontrolle) und nach Präinkubation mit Y-27632 ( $10^{-6}$  M) auf S1P ( $10^{-6}$  M) in einem *transwell assay*. Die Anzahl der migrierten iDCs ohne Vorinkubation mit Y-27632 auf die Mediumkontrolle (ohne Zusatz von Chemokinen oder S1P) ist im grauen Balken dargestellt (Medium). Vorinkubation mit Y-27632 ( $10^{-6}$  M) verringerte die Anzahl der migrierten Zellen. In der Abb. sind die Mittelwerte von  $n=3$  Spendern dargestellt, die Fehlerbalken kennzeichnen den jeweiligen SEM. Die statistische Signifikanz wurde mit dem gepaarten zweiseitigen T-Test berechnet (\*\*  $p<0.01$ ).

### 3.5 Expression der S1P-Rezeptoren bei dendritischen Zellen

#### 3.5.1 Untersuchung der S1P-Rezeptor-Expression mittels semiquantitativer PCR

Um zu testen, ob die nach unserem Protokoll generierten DCs S1P-Rezeptoren exprimieren, wurde zuerst eine Reverse-Transkription-Polymerase-Ketten-Reaktion durchgeführt. Die RT-PCR wurde semiquantitativ ausgewertet. Die S1P-Rezeptoren S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> wurden auf Ebene der mRNA untersucht. Es fand sich kein Unterschied bezüglich der Expression der S1P-Rezeptor-Subtypen zwischen iDCs und mDCs. Ebenso unterschieden sich unvorbehandelte mDCs nicht von mDCs, die vor ihrer Ausreifung mit Tetanustoxoid beladen worden waren, in der Expression von S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> oder S1P<sub>3</sub> (Siehe Abb. 8).

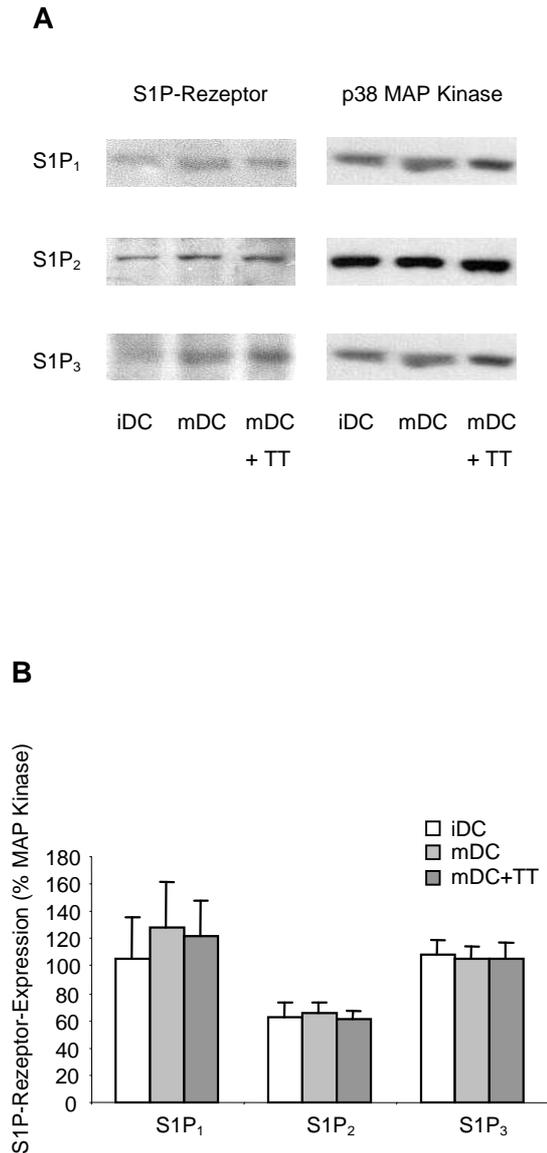


### Abb. 8 mRNA-Expression der S1P-Rezeptoren S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub>

Abb. 8 zeigt ein RT-PCR-Gel, auf dem die mRNA-Expression der S1P-Rezeptoren S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> jeweils für iDCs, mDCs und mit Tetanustoxoid (5µg/ml) beladenen mDCs (mDC+TT) eines Spenders zu sehen ist. Als *housekeeping*-Gen wurde GAPDH (G) und als Größenmarker *1Kb Plus DNA Ladder* (Fa. Invitrogen) verwendet. Die Abbildung ist repräsentativ für n=4 Spender.

### 3.5.2 Untersuchung der S1P-Rezeptor-Expression mittels Western Blot

Die Expression der S1P-Rezeptoren S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> wurde auch mittels Western Blot auf Proteinebene untersucht. Alle drei Rezeptoren wurden in den generierten iDCs und mDCs exprimiert. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede der Expression des Rezeptors S1P<sub>1</sub> sowohl zwischen iDCs und mDCs, als auch zwischen mDCs ohne Präinkubation mit Tetanustoxoid und mDCs, die vor ihrer Ausreifung mit Tetanustoxoid beladen worden waren. Ebenso fanden sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Expression der Rezeptoren S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> bei iDCs im Vergleich zu mDCs und bei unvorbehandelten mDCs im Vergleich zu mDCs, die vor ihrer Ausreifung mit Tetanustoxoid präinkubiert worden waren. Die S1P-Rezeptor-Suptypen S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> werden also gleichermaßen in iDCs, mDCs und mit Antigen beladenen mDCs exprimiert (Siehe Abb. 9).



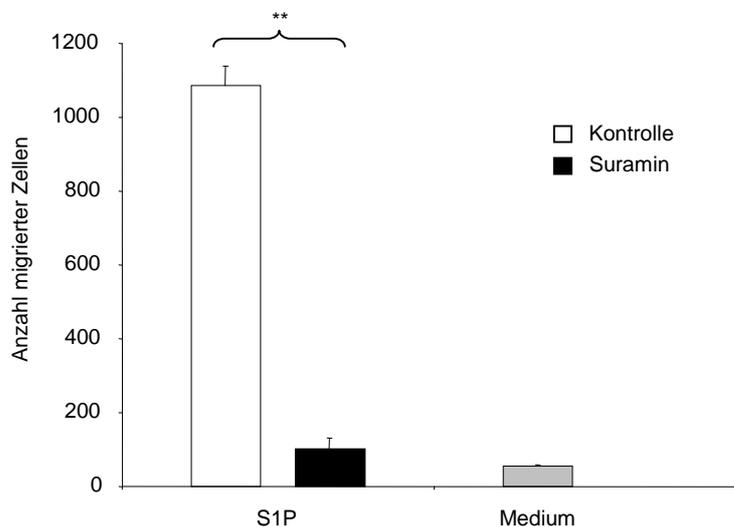
### Abb. 9 Expression der S1P-Rezeptoren S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub>

Abb. 9A zeigt Ausschnitte aus verschiedenen Western Blot Filmen. Von den Membranen, auf denen im ersten Schritt die S1P-Rezeptoren detektiert wurden, wurde im zweiten Schritt, nach dem Strippen der Membranen, die p38-MAP-Kinase detektiert. Auf der linken Seite sind Filmausschnitte mit Darstellung der Expression der S1P-Rezeptoren S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub>, auf der rechten Seite sind die Filmausschnitte mit Darstellung der entsprechenden Expression der p38 MAP Kinase abgebildet. Die Expression der verschiedenen S1P-Rezeptor-Subtypen ist jeweils für iDCs, mDCs und mit Tetanustoxoid (5µg/ml) beladenen mDCs (mDC+TT) eines Spenders zu sehen. Die Abbildung ist repräsentativ für n=5 Spender.

In Abb. 9B ist das Verhältnis der Signalintensität der S1P-Rezeptoren zur Signalintensität der zugehörigen Banden der p38 MAP Kinase auf den entsprechenden Filmen dargestellt. Die entwickelten Western Blot Filme wurden mittels Fluor-S<sup>TM</sup> Multilmager und der Software Quantity One 4.2.3 ausgewertet. Die relative Stärke der Expression der S1P-Rezeptor-Subtypen S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> wurde mittels zweiseitigem gepaartem T-Test untersucht. Dabei ergaben sich weder zwischen iDCs und mDCs noch zwischen mDCs und mit Tetanustoxoid beladenen mDCs signifikante Unterschiede bezüglich der Expression von S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> oder S1P<sub>3</sub>. In der Abbildung sind die Mittelwerte von n=5 Spendern dargestellt, die Fehlerbalken kennzeichnen den jeweiligen SEM.

### 3.6 Abhängigkeit der Migration unreifer dendritischer Zellen auf S1P vom Rezeptor S1P<sub>3</sub>

In einem weiteren *transwell* assay wurde untersucht, ob die verschiedenen S1P-Rezeptor-Subtypen die Migration auf S1P beeinflussen können. Dabei wurde die Migration auf S1P von nicht vorbehandelten iDCs mit der Migration von iDCs, die mit Suramin präinkubiert worden waren, verglichen. Suramin wirkt unter den S1P-Rezeptoren als Antagonist des S1P<sub>3</sub>-Rezeptors. Die Vorinkubation mit Suramin in einer Konzentration von 10<sup>-6</sup> M reduzierte die Anzahl der migrierten iDCs signifikant (siehe Abb. 10). Die angemessene Konzentration der verwendeten Substanz wurden in Vorversuchen ermittelt (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 10 Einfluss des S1P<sub>3</sub>-Rezeptors auf die Migration von iDCs auf S1P**

Dargestellt ist die Anzahl der migrierten iDCs ohne (Kontrolle) und nach Vorinkubation mit Suramin (Suramin) auf S1P in einem *transwell* assay. Die Anzahl der migrierten iDCs ohne Präinkubation mit Suramin auf die Mediumkontrolle (ohne Zusatz von S1P) ist mit dem grauen Balken dargestellt. Die Vorinkubation mit Suramin (10<sup>-6</sup> M) verringerte die Anzahl der migrierten Zellen signifikant. In der Abb. sind die Mittelwerte von n=3 Spendern dargestellt, die Fehlerbalken kennzeichnen den jeweiligen SEM. Die statistische Signifikanz wurde mit dem gepaarten zweiseitigen T-Test berechnet (\*\* p<0.01).

## **3.7 Untersuchung der Calciumkonzentration in unreifen dendritischen Zellen bei Stimulation mit Chemokinen und S1P**

### **3.7.1 Erhöhung der Calciumkonzentration in unreifen dendritischen Zellen durch Stimulation mit S1P**

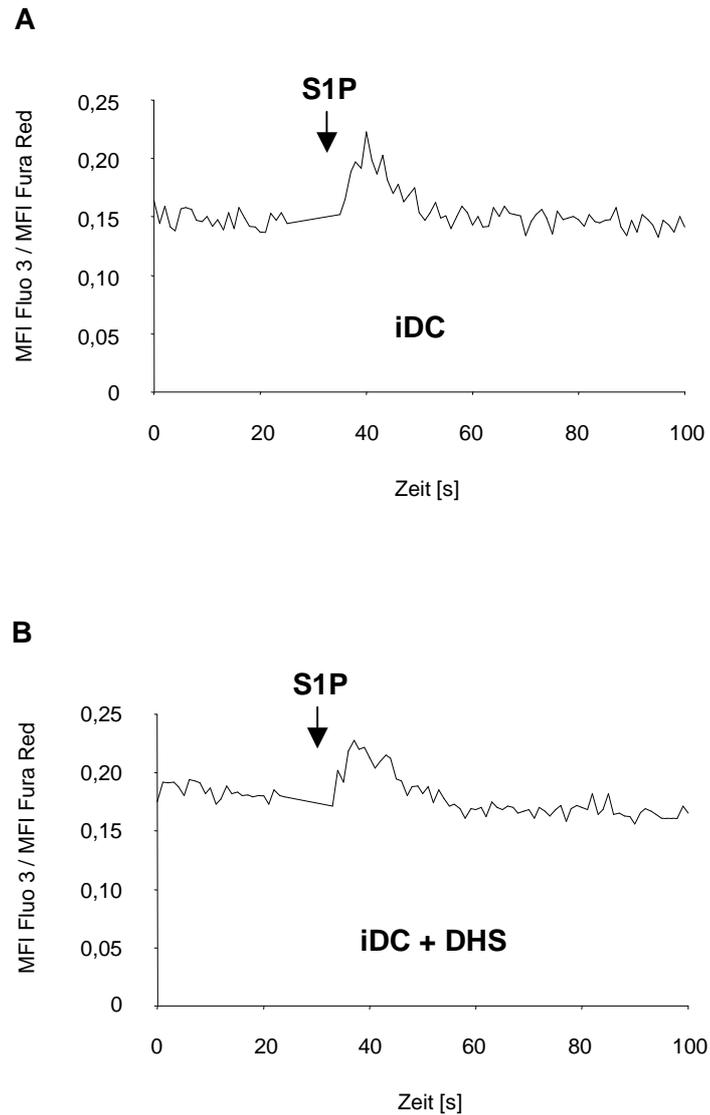
Entsprechend der bereits beschriebenen Migrationsversuche mit iDCs, wurde die Veränderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration als Reaktion auf S1P und verschiedene Chemokine gemessen. Dabei wurde die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mittels der Fluoreszenzfarbstoffe Fluo 3 und Fura Red durchflusszytometrisch bestimmt und mit der Software FlowJow ausgewertet.

Zuerst wurde untersucht, ob S1P zu einer Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den nach dem hier verwendeten Protokoll generierten iDCs führt. Die Zugabe von S1P verursachte einen deutlichen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in iDCs (siehe Abb. 11A).

### **3.7.2 Unabhängigkeit des Chemokin-vermittelten Calciumkonzentrationsanstiegs in unreifen dendritischen Zellen von der Sphingosinkinase**

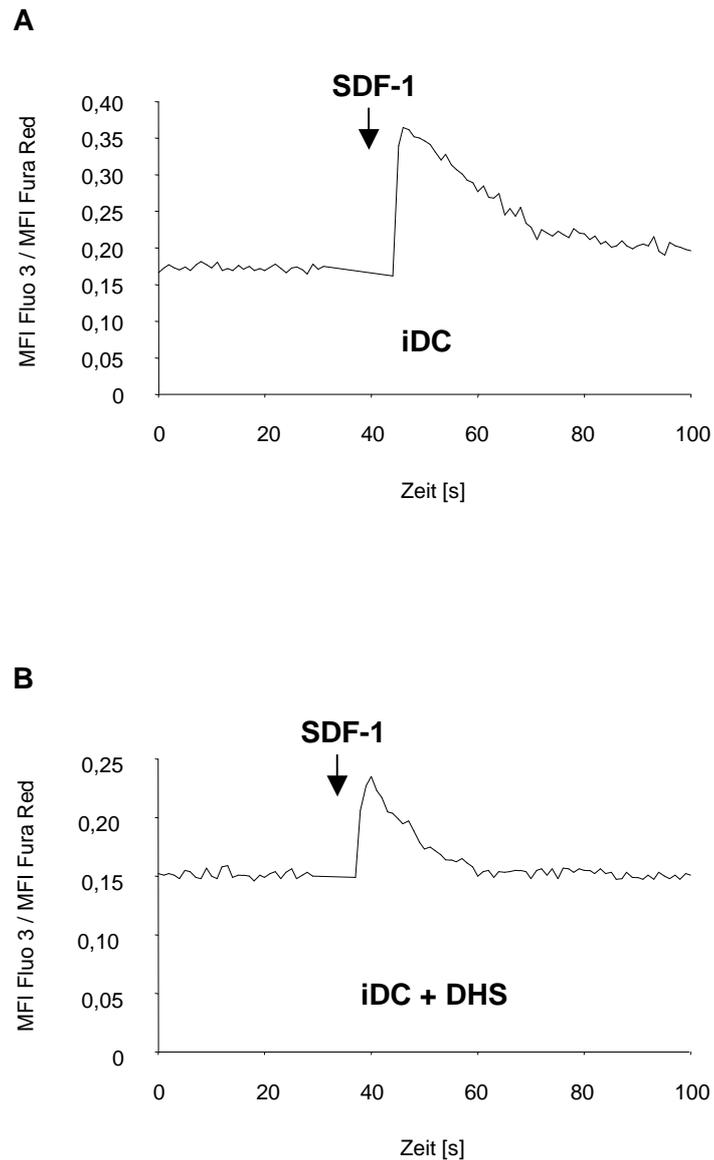
Analog zu den durchgeführten Migrationsversuchen mit iDCs wurde außerdem die Wirkung der Chemokine SDF-1 und MIP-1 $\alpha$  auf den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel in den nach unserem Protokoll gewonnenen iDCs untersucht. Sowohl SDF-1 als auch MIP-1 $\alpha$  führten zu einem deutlichen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (siehe Abb. 12A bzw. 13A).

Die Vorinkubation mit DHS und somit die Hemmung der Sphingosinkinase reduzierte zwar wie weiter oben beschrieben die Anzahl der migrierten Zellen (siehe Abb. 5), verhinderte aber nicht den Calciumanstieg in den iDCs auf die Stimuli S1P, SDF-1 und MIP-1 $\alpha$  (siehe Abb. 11B, 12B und 13B).



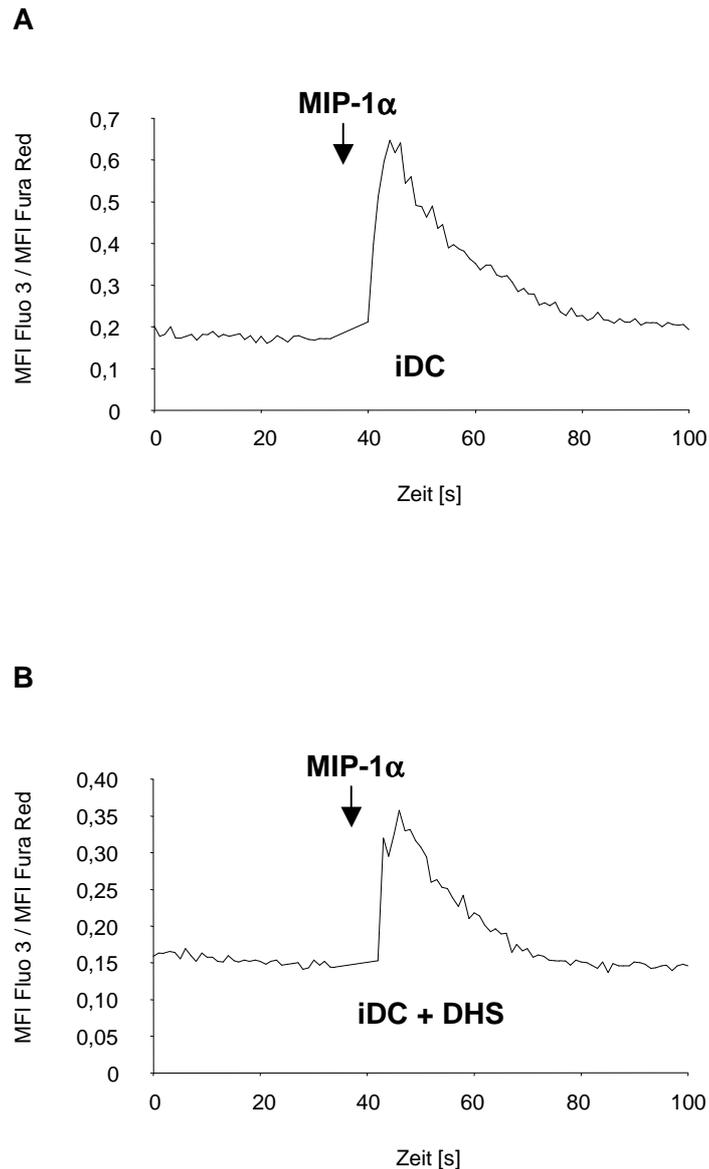
### Abb. 11 Einfluss von S1P und DHS auf die intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration

Abb. 11A zeigt nach Zugabe von S1P ( $10^{-6}$  M) einen deutlichen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Auf Abb. 11B ist bei iDCs desselben Spenders nach Präinkubation mit DHS ( $10^{-6}$  M) ebenfalls ein Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration als Reaktion auf die Zugabe von S1P zu sehen. Der durchflusszytometrisch bestimmte Quotient aus MFI von Fluo 3 und MFI von Fura Red dient dabei als Maß für die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm FlowJow. Die Abb. zeigt beispielhaft die Ergebnisse für einen Spender und ist repräsentativ für  $n=9$  Spender.



**Abb. 12 Einfluss von SDF-1 auf die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in iDCs ohne und mit Präinkubation mit DHS**

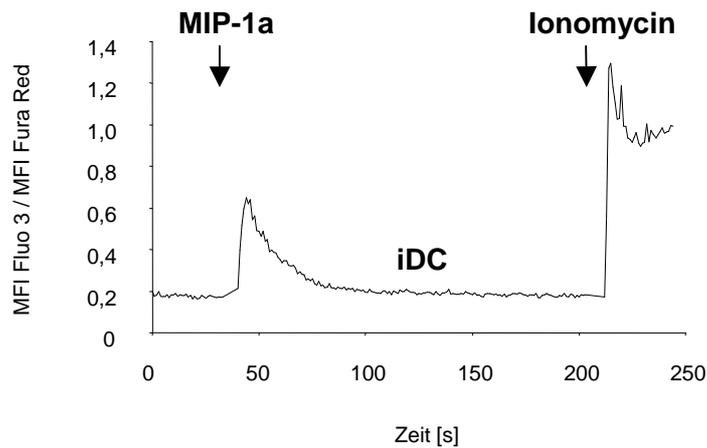
Abb. 12A zeigt nach Zugabe von SDF-1 (100 ng/ml) einen deutlichen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Auf Abb. 12B ist bei iDCs desselben Spenders nach Präinkubation mit DHS ( $10^{-6}$  M) ebenfalls ein Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration als Reaktion auf die Zugabe von SDF-1 zu sehen. Der durchflusszytometrisch bestimmte Quotient aus MFI von Fluo 3 und MFI von Fura Red dient dabei als Maß für die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm FlowJow. Die Abb. zeigt beispielhaft die Ergebnisse für einen Spender und ist repräsentativ für  $n=10$  Spender.



**Abb. 13 Einfluss von MIP-1 $\alpha$  auf die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in iDCs ohne und mit Präinkubation mit DHS**

Abb. 13A zeigt nach Zugabe von MIP-1 $\alpha$  (100 ng/ml) einen deutlichen Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. Auf Abb. 13B ist bei iDCs desselben Spenders nach Präinkubation mit DHS (10<sup>-6</sup> M) ebenfalls ein Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration als Reaktion auf die Zugabe von MIP-1 $\alpha$  zu sehen. Der durchflusszytometrisch bestimmte Quotient aus MFI von Fluo 3 und MFI von Fura Red dient dabei als Maß für die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm FlowJow. Die Abb. zeigt beispielhaft die Ergebnisse für einen Spender und ist repräsentativ für n=7 Spender.

Bei allen Versuchen zur Bestimmung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration wurde Calcium-Ionomycin, ein Ca<sup>2+</sup>-Ionophor, als Positivkontrolle verwendet (siehe Abb. 14).



**Abb. 14 Ionomycin als Positivkontrolle bei der Bestimmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration**

Die Abb. zeigt zuerst nach Zugabe von MIP-1 $\alpha$  (100 ng/ml) einen deutlichen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in iDCs. Dann folgt ein starker Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Zugabe von Ionomycin (2  $\mu\text{g/ml}$ ). Der durchflusszytometrisch bestimmte Quotient aus MFI von Fluo 3 und MFI von Fura Red dient dabei als Maß für die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm FlowJow. Die Abb. ist repräsentativ für alle aufgeführten Versuche zur Bestimmung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.

## 4. Diskussion

### 4.1 Übersicht über die Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von S1P und Sphingosinkinase bei der Migration von DCs untersucht. Aus humanen Monozyten wurden durch die fünftägige Inkubation mit GM-CSF und IL-4 unreife DCs generiert, die in der vorliegenden Dissertation als iDCs bezeichnet werden. Durch eine weitere Inkubation für zwei Tage mit TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und PGE<sub>2</sub> wurden reife DCs gewonnen, die mDCs genannt werden.

Zur Untersuchung der Migration der iDCs wurden unter anderem die Chemokine SDF-1 und MIP-1 $\alpha$  verwendet, deren chemotaktische Wirkung auf unreife DCs bekannt ist [Banchereau et al., 2000]. Wie erwartet, fand eine Migration der iDCs auf SDF-1 und MIP-1 $\alpha$  statt. Die iDCs migrierten außerdem im Gegensatz zu den mDCs auf S1P, wobei die Migration der iDCs auf S1P bezüglich der Anzahl der migrierten Zellen mit der Migration auf MIP-1 $\alpha$  vergleichbar war.

Die Inhibierung der Sphingosinkinase hemmte die Migration von iDCs auf SDF-1 und MIP-1 $\alpha$ . Die Migration der mDCs auf SDF-1 und MIP-3 $\beta$ , zwei bekannte Chemokine für reife DCs [Banchereau et al., 2000], wurde jedoch nicht durch die Hemmung der Sphingosinkinase beeinflusst. Die Sphingosinkinase scheint also nur eine Rolle bei der Migration von iDCs zu spielen. Zu dieser Annahme könnte auch ein weiteres Untersuchungsergebnis der vorliegenden Arbeit passen: Die Sphingosinkinase 1 wird auf Ebene der mRNA bei iDCs stärker als bei mDCs exprimiert.

Des Weiteren wurde untersucht, über welche Signalwege die Wirkung von S1P und Sphingosinkinase auf die DCs vermittelt werden könnte. Dabei wurde die Expression der S1P-Rezeptoren von iDCs und mDCs miteinander verglichen. Sowohl iDCs als auch mDCs exprimierten die Rezeptoren S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub>, wobei kein signifikanter Unterschied bezüglich der Expressionsstärke der einzelnen Rezeptoren bei den iDCs verglichen mit den mDCs bestand. Somit kann das verschiedene Migrationsverhalten von iDCs und mDCs auf S1P nicht mit einer unterschiedlichen Expression dieser S1P-Rezeptoren erklärt werden. Allerdings konnte in weiteren Versuchen festgestellt werden, dass der Rezeptor S1P<sub>3</sub> und die Rho-Kinase für die Migration der iDCs auf S1P notwendig zu sein scheinen. Entsprechend den Migrationsversuchen mit iDCs, wurde die Veränderung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration als Reaktion auf S1P, SDF-1 und MIP-1 $\alpha$  gemessen. Es ist bekannt, dass die Bindung eines Chemokins an seinen Rezeptor einen Anstieg der Ca<sup>2+</sup>-

Konzentration in der Zelle über die Aktivierung bestimmter Signalwege bewirkt. S1P führte wie die Chemokine zu einem deutlichen Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den iDCs. Die Hemmung der Sphingosinkinase verhinderte dabei nicht die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf SDF-1 und MIP-1 $\alpha$ .

## 4.2 Methodendiskussion

Zur Generierung von humanen DCs existieren eine Vielzahl von verschiedenen Protokollen. DCs können direkt aus dem peripheren Blut des Menschen isoliert werden oder aus dem Blut gewonnene DC-Vorläuferzellen können in vitro zu DCs differenziert werden. Die Generierung von DCs aus Vorläuferzellen hat unter anderem den Vorteil, dass im Vergleich zur direkten DC-Isolierung eine größere Anzahl an DCs gewonnen werden kann. Monozyten können als DC-Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut isoliert und dann in vitro zu DCs differenziert werden [Romani et al., 1994; Sallusto et al., 1994; Zhou et al., 1996]. Unter der Inkubation mit IL-4 und GM-CSF wird die Differenzierung von Monozyten zu unreifen DCs beobachtet, zur weiteren Ausreifung der DCs existieren zahlreiche Protokolle, wobei beispielsweise TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , CD40-Ligand oder LPS verwendet werden [Ardavin et al., 2001; Banchereau et al., 2005].

Die für diese Arbeit verwendeten DCs wurden in vitro aus Monozyten generiert. Dazu wurden humane PBMCs über Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Hypaque aus dem peripheren Blut gewonnen und anschließend die Monozyten mittels Adhärenz in Kulturflaschen aus den PBMCs isoliert, wie es bereits von unserer Arbeitsgruppe in der Literatur beschrieben wurde [Schnurr et al., 2001; Schnurr et al., 2002].

Die iDCs wurden in vitro aus Monozyten durch die fünftägige Inkubation mit GM-CSF (1000 U/ml) und IL-4 (500 U/ml) generiert, die Reifung zu mDCs wurde dann mittels einer Inkubation für zwei Tage mit TNF- $\alpha$  (10 ng/ml), IL-1 $\beta$  (1000 U/ml) und PGE<sub>2</sub> (1  $\mu$ g/ml) induziert.

Die generierten iDCs und mDCs wurden durchflusszytometrisch an Hand der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle charakterisiert. Die iDCs waren negativ für CD14 und wiesen eine geringe Expression von CD83 und CD80, sowie eine hohe Expression von MHC-II-Molekülen auf. Die mDCs waren negativ für CD14, zeigten jedoch eine hohe Expression von CD83 und eine höhere Expression von CD80 und MHC-II im Vergleich zu den iDCs. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der

durchflusszytometrischen Charakterisierung von unreifen und reifen DCs in der Literatur [Banchereau et al., 2000].

### **4.3 Diskussion der Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur**

Die Bindung von S1P an seine Rezeptoren kann eine Vielzahl von Effekten auslösen, die zur Regulierung der Differenzierung, des Überlebens, sowie der Motilität und der Migration von verschiedenen Zelltypen beitragen [Spiegel et al., 2002]. So wurde nachgewiesen, dass S1P über seine Rezeptoren die Migration von beispielsweise Endothelzellen [Kimura et al., 2000], vaskulären glatten Muskelzellen [Kluk et al., 2001] oder Immunzellen wie T-Zellen [Graeler et al., 2002] und Natürlichen Killerzellen [Kveberg et al., 2002] beeinflusst.

Die Migration ist ein Prozess, der für die Funktion der DCs im Immunsystem von entscheidender Bedeutung ist. So gelangen unreife DCs in das periphere Gewebe und akkumulieren besonders dort, wo Antigene in den Körper eingedrungen sind [McWilliam et al., 1996; McWilliam et al., 1994]. Es wird dabei davon ausgegangen, dass DC-Vorläuferzellen aus dem Blut mittels bestimmter Chemokine wie SDF-1, MIP-1 $\alpha$  oder MCP-1 in das periphere Gewebe rekrutiert werden [Sozzani, 2005]. Nach Antigenaufnahme durchlaufen die DCs einen Reifungsprozess und migrieren schließlich zu den sekundären lymphatischen Organen. Dieser Migrationsprozess erfolgt in Antwort auf die beiden Chemokine 6Ckine und MIP-3 $\beta$ . 6Ckine und MIP-3 $\beta$  werden in der T-Zell-Zone lymphatischer Organe exprimiert, 6Ckine auch in den lymphatischen Gefäßen [Chan et al., 1999; Dieu et al., 1998; Gunn et al., 1998; Saeki et al., 1999].

Neben den hier genannten Chemokinen existieren noch zahlreiche weitere Chemokine und Chemoattraktoren, die die Migration von DCs in ihren verschiedenen Entwicklungsstadien lenken können. So haben Idzko et al. gezeigt, dass S1P als Chemoattraktor auf unreife DCs, nicht aber auf reife DCs wirkt [Idzko et al., 2002].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der Sphingosinkinase bei der Migration von Monozyten-abgeleiteten DCs verschiedener Entwicklungsstufen auf bestimmte Chemokine sowie auf S1P untersucht.

#### **4.3.1 Vergleich der Sphingosinkinase-Expression bei dendritischen Zellen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien**

Als erstes wurde in der vorliegenden Arbeit die mRNA-Expression der Sphingosinkinase 1 bei DCs in verschiedenen Entwicklungsstadien mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht.

Bei mDCs, die unter Zugabe von TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub> und IL-1 $\beta$  gereift waren, zeigte sich im Vergleich zu iDCs eine geringere Expression der mRNA der Sphingosinkinase 1. Die Beladung von mDCs sowohl mit Tetanustoxoid als auch mit KLH reduzierte die Sphingosinkinase-Expression verglichen mit mDCs ohne Antigenbeladung. Die untersuchten verschiedenen Entwicklungsstufen der DCs unterschieden sich also bezüglich der Expressionsstärke der Sphingosinkinase-mRNA, die mit zunehmendem Reifegrad abnahm.

In der Literatur finden sich Angaben zur unterschiedlichen Expressionsstärke der Sphingosinkinase in verschiedenen Organen. So ist bekannt, dass die Expression der Sphingosinkinase in Lungengewebe, Milz und Leukozyten des peripheren Bluts besonders hoch ist [Melendez et al., 2000].

Zum Zeitpunkt der Durchführung der vorliegenden Experimente existierten nach dem Wissen unserer Arbeitsgruppe keine Publikationen, in denen die Expression der Sphingosinkinase bei den verschiedenen Entwicklungsstadien von humanen DCs verglichen wurde. Inzwischen wurden Experimente veröffentlicht, in denen eine Zunahme der mRNA-Expression der Sphingosinkinase 1 bei reifen DCs im Vergleich zu unreifen DCs beobachtet wurde [Mehtcheriakova et al., 2007]. Dabei wurden ebenfalls humane Monozyten-abgeleitete DCs verwendet, die Ausreifung erfolgte allerdings mittels LPS und nicht mittels TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub> und IL-1 $\beta$  wie in unseren Versuchen, worauf die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Expressionsstärke bei reifen DCs im Vergleich zu unreifen DCs beruhen könnten.

Aus der Beobachtung unserer Arbeitsgruppe, dass DCs je nach Reife und Antigenbeladung eine unterschiedliche Expressionsstärke der Sphingosinkinase 1 aufwiesen, ergab sich die Frage, ob dieser Unterschied in Zusammenhang mit biologischen Funktionen der DCs stehen könnte. Da die Migration von DCs einen essentiellen Bestandteil bei der Immunantwort darstellt und sich das Migrationsverhalten von DCs während ihrer Reifung verändert, wurde die Rolle der Sphingosinkinase bei der Migration von DCs in verschiedenen Entwicklungsstufen untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde nur die Expression der Sphingosinkinase 1 untersucht und nicht die Expression der Sphingosinkinase 2. Von der Sphingosinkinase 1 ist bekannt, dass sie durch zahlreiche Faktoren reguliert werden kann und eine herausragende Rolle in der zellulären Signaltransduktion spielt. Insbesondere die Migration von beispielsweise Mastzellen und Makrophagen auf bestimmte Stimuli ist von der Funktion der Sphingosinkinase 1 abhängig, während die Sphingosinkinase 2 darauf keinen Einfluss zu haben scheint [Hait et al., 2006; Jolly et al., 2004; Melendez et al., 2004].

#### **4.3.2 Der Einfluss von S1P auf die Migration dendritischer Zellen**

Das Migrationsverhalten von DCs wurde in *transwell assays* untersucht. Unter anderem wurde dabei die Migration von iDCs und mDCs auf S1P getestet. Während iDCs auf S1P migrierten, fand bei mDCs keine Migration auf S1P statt.

Diese Ergebnisse sind konsistent mit den Beobachtungen von Idzko et al., die die Migration von humanen Monozyten-abgeleiteten DCs auf S1P untersuchten [Idzko et al., 2002]. Sie zeigten ebenfalls, dass S1P chemotaktisches Potential auf unreife DCs, aber nicht auf reife DCs besitzt. Die Reifung der DCs wurde dabei durch LPS und nicht wie in unserer Arbeitsgruppe durch eine Zytokinkombination mit TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und PGE<sub>2</sub> induziert.

Die vorliegenden Ergebnisse bezüglich der Wirkung von S1P auf die Migration humaner DCs entsprechen nicht den Beobachtungen für die DCs der Maus. Czeloth et al. berichteten, dass nur reife murine DCs und keine unreifen murinen DCs auf S1P migrierten [Czeloth et al., 2005]. Diese Diskrepanz kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnten sich Mensch und Maus bei der Regulierung der Migration von DCs durch S1P grundlegend unterscheiden. Zum anderen könnten die unterschiedlichen Protokolle zum Gewinn der DCs für diesen Unterschied verantwortlich sein. So wurden bei der Maus Knochenmarkszellen als DC-Vorläuferzellen verwendet, beim Menschen jedoch Monozyten aus dem peripheren Blut. Zusätzlich unterschieden sich die verwendeten Zytokinkombinationen zur Differenzierung der DCs.

Die migratorische Aktivierung von humanen iDCs, jedoch nicht von mDCs durch S1P, die in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde, könnte einen Hinweis darauf geben, dass S1P einen zusätzlichen chemotaktischen Stimulus darstellt, der neben bereits bekannten Chemokinen wie MIP-1 $\alpha$  zur Rekrutierung unreifer DCs in Körperregionen beiträgt, an denen Entzündungen bestehen oder in die Mikroorganismen eingedrungen

sind. Es ist bekannt, dass S1P von aktivierten Mastzellen unter entzündlichen Bedingungen sezerniert wird [Jolly et al., 2004; Mitra et al., 2006]. So wurden erhöhte S1P-Spiegel in der bronchioalveolären Lavage von Asthmapatienten nach Allergenexposition gemessen [Ammit et al., 2001]. Diese Studien deuten darauf hin, dass die Sekretion von S1P durch Mastzellen eine wichtige Funktion bei Entzündungen einnimmt, und stützen die Vermutung, dass S1P für die Migration unreifer DCs in Richtung eingedrungener Antigene mitverantwortlich sein kann.

#### **4.3.3 Vergleich der Expression der S1P-Rezeptoren bei dendritischen Zellen in verschiedenen Entwicklungsstadien**

S1P fungiert als intrazellulärer und extrazellulärer Botenstoff bei der Regulation zahlreicher Signalwege. Die extrazellulären Wirkungen, wozu unter anderem die Regulierung der Zellmotilität zählt, werden über S1P-Rezeptoren an der Zelloberfläche vermittelt [Taha et al., 2004]. Als S1P-Rezeptoren sind bislang die GPCRs S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub>, S1P<sub>3</sub>, S1P<sub>4</sub> und S1P<sub>5</sub> bekannt [Chun et al., 2002; Lee et al., 1998]. Bei humanen Monozyten-abgeleiteten DCs wurden bereits von Idzko et al. S1P-Rezeptoren auf Ebene der mRNA nachgewiesen [Idzko et al., 2002].

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels semiquantitativer RT-PCR gezeigt werden, dass iDCs, mDCs und mMDCs, die mit dem Antigen Tetanustoxoid präinkubiert worden waren, die S1P-Rezeptoren S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> auf mRNA-Ebene exprimierten. Im Gegensatz zur mRNA-Expression der Sphingosinkinase, zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich des Expressionsmusters von S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> bei den Monozyten-abgeleiteten DCs in den genannten verschiedenen Entwicklungsstadien.

Zusätzlich zur mRNA-Expression wurde auch die Expression von S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> auf Proteinebene untersucht. Im Western Blot wurde analog zur RT-PCR nachgewiesen, dass iDCs, mMDCs und mit Tetanustoxoid beladene mMDCs S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> exprimierten und keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Expression eines Rezeptorsubtyps bei den verschiedenen Entwicklungsstufen der DCs bestanden.

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass das verschiedene Migrationsverhalten von iDCs und mMDCs auf S1P nicht durch eine unterschiedliche Konstellation oder Expression der S1P-Rezeptoren S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> auf Ebene der mRNA oder der Proteine reguliert wird. Es sind verschiedene Ursachen denkbar, warum sich das Migrationsverhalten von iDCs und mMDCs in Antwort auf S1P dennoch unterscheidet. Bei mMDCs könnten verglichen mit iDCs Unterschiede in den den S1P-Rezeptoren nachgeschalteten intrazellulären Signalwegen für das unterschiedliche

Migrationsverhalten verantwortlich sein. Auch wäre es möglich, dass es im Rahmen der Ausreifung zu strukturellen Veränderungen der Bindungsstelle für S1P an einem oder mehreren S1P-Rezeptorsubtypen kommt, und sich dadurch die Affinität dieser Rezeptoren zu S1P ändert. Außerdem existieren noch die S1P-Rezeptoren S1P<sub>4</sub> und S1P<sub>5</sub>, die in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurden und die die migratorische Antwort der DCs auf S1P beeinflussen könnten.

#### **4.3.4 Rolle der S1P-Rezeptoren bei der Migration unreifer dendritischer Zellen auf S1P**

Da die iDCs S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> exprimierten, stellte sich die Frage, welche dieser S1P-Rezeptoren eine maßgebliche Rolle bei der Migration von iDCs auf S1P spielen. Für S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>2</sub> waren zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente keine etablierten spezifischen Antagonisten erhältlich. Von Suramin jedoch war bekannt, dass es bei den S1P-Rezeptoren als selektiver Antagonist für S1P<sub>3</sub> wirkt [Ancellin et al., 1999].

Die Präinkubation mit Suramin reduzierte die Anzahl der migrierten iDCs im *transwell* assay signifikant. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass der Rezeptor S1P<sub>3</sub> an der Vermittlung der Wirkung von S1P maßgeblich beteiligt ist. Das Versuchsergebnis aus der vorliegenden Arbeit ist konsistent mit den Daten mehrerer Studien, die zeigten, dass die Migration von Zellen positiv mit den Rezeptoren S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3</sub>, aber negativ mit S1P<sub>2</sub> korreliert ist [Kon et al., 1999; Okamoto et al., 2000; Wang et al., 1999b].

Allerdings handelt es sich bei Suramin um eine Substanz, von der bekannt ist, dass sie die Interaktion von zahlreichen Liganden wie beispielsweise ATP mit ihren entsprechenden Rezeptoren blockieren kann [Ralevic et al., 1998]. Es wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, welche anderen möglichen Effekte Suramin in unserem Versuchsaufbau haben könnte.

#### **4.3.5 Rolle der Proteine der Rho-Familie bei der Migration unreifer dendritischer Zellen auf S1P**

Die S1P-Rezeptoren sind GPCRs mit sieben Transmembrandomänen, die nach Bindung von S1P über heterotrimere G-Proteine zahlreiche intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren können. Dabei weisen die fünf S1P-Rezeptoren verschiedene, aber sich teilweise überlappende Strukturen der Signalvermittlung auf.

So wird die Phospholipase C von S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> aktiviert, die Adenylatcyclase kann von S1P<sub>2</sub> aktiviert werden, wird jedoch von S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3</sub> gehemmt und die GTPasen Rho und Rac werden von S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3</sub> aktiviert, während Rho von S1P<sub>2</sub> aktiviert, aber Rac gehemmt wird [Taha et al., 2004; Takabe et al., 2008; Takuwa, 2002].

Rac und Rho gehören zu den GTPasen der Rho-Familie. Sie sind Guaninnukleotid-bindende Proteine und können in einem aktiven GTP-gebundenen oder in einem inaktiven GDP-gebundenen Zustand vorliegen. GTP-gebundenes Rho und Rac können über die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Effektoren die Struktur des Aktinzytoskeletts und die Zellmotilität regulieren. Damit sind Rho und Rac an Prozessen beteiligt, die für die Zellmigration von essentieller Bedeutung sind. So aktiviert Rho die Rho-Kinase und weitere Signalwege, was zur Bildung von Stressfasern und fokalen Adhäsionen führt. Aktives Rac bewirkt über bestimmte Signalwege die Formation von Lamellipodien, womit dünne, herausragende Ausläufer am führenden Ende von migrierenden Zellen bezeichnet werden [Burridge et al., 2004]. Es wurde für Leukozyten nachgewiesen, dass die Zellen bei Bestehen eines chemotaktischen Gradienten eine Polarität bezüglich intrazellulärer Vorgänge aufweisen, die die zielgerichtete Migration ermöglicht. Die Aktivierung von Rac spielt dabei bezogen auf die Bewegungsrichtung an der Vorderseite der Zelle eine entscheidende Rolle bei der Migration, die Aktivierung von Rho an der Hinterseite [Worthylake et al., 2003; Xu et al., 2003].

Es ist daher wahrscheinlich, dass die GTPasen der Rho-Familie bei der Signaltransduktion der Migration von iDCs auf S1P beteiligt sind. Okamoto et al. zeigten anhand von Zellen aus den Ovarien chinesischer Hamster, dass S1P über S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3</sub> zu einer Aktivierung von Rac führt und die Chemotaxis auf S1P, die über S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3</sub> vermittelt wird, von Rac abhängig ist. S1P<sub>2</sub> hingegen hemmte die Aktivierung von Rac und verursachte eine Inhibition der Migration [Okamoto et al., 2000]. Die Abhängigkeit von Rac wurde dabei durch die Expression einer dominant negativen Form von Rac getestet.

Da im Gegensatz zu den Effektoren von Rac für einen der bedeutendsten Signalüberträger von Rho, der Rho-Kinase, ein selektiver Inhibitor zur Verfügung steht, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Migration der iDCs auf S1P durch die Hemmung der Rho-Kinase beeinflusst wird. Dazu wurde die Migration auf S1P von nicht vorbehandelten iDCs mit der Migration von iDCs verglichen, die mit Y-27632, dem Inhibitor der Rho-Kinase [Maekawa et al., 1999; Uehata et al., 1997], präinkubiert worden waren. Die Präinkubation mit Y-27632 führte zu einer signifikanten Reduktion

der Anzahl der migrierten iDCs, was darauf hindeutet, dass die Rho-Kinase und damit die Aktivierung der GTPase Rho bei der Migration von iDCs auf S1P von Bedeutung ist.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Studien, die unter Verwendung eines Rho-inaktivierenden Toxins nachgewiesen haben, dass die Endothelzellmigration auf S1P von der über S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3</sub> vermittelten Aktivierung Rhos abhängig ist [Lee et al., 1999; Paik et al., 2001].

#### **4.3.6 Rolle der Sphingosinkinase bei der Migration unreifer und reifer dendritischer Zellen**

Neben dem Potential von S1P als Stimulus für die DC-Migration, wurde in der vorliegenden Arbeit auch der Einfluss der Sphingosinkinase bei der Migration von iDCs und mDCs getestet.

Dazu wurde die Migration auf bestimmte Chemokine von nicht vorbehandelten DCs mit der Migration von DCs nach Präinkubation mit DHS verglichen. Bei DHS handelt es sich um einen Inhibitor der Sphingosinkinase 1 und 2 [Buehrer et al., 1992; Hait et al., 2006]. Für iDCs wurden SDF-1 und MIP-1 $\alpha$ , für mDCs 6CKine und MIP-3 $\beta$  als Chemokine verwendet, die bekanntermaßen jeweils chemotaktisch auf unreife bzw. reife DCs wirken [Banchereau et al., 2000; Sozzani et al., 1999].

In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass iDCs auf SDF-1 und MIP-1 $\alpha$  bzw. mDCs auf 6CKine und MIP-3 $\beta$  migrieren. Die Vorinkubation der iDCs mit dem Sphingosinkinase-Inhibitor DHS reduzierte die Anzahl der migrierten iDCs auf die Chemokine SDF-1 und MIP-1 $\alpha$  signifikant. Ebenso war die Anzahl der migrierten iDCs nach Präinkubation mit DHS auf S1P vermindert. Die Vorinkubation der mDCs mit DHS führte zu keiner signifikanten Veränderung der Anzahl der migrierten mDCs auf die Chemokine 6CKine und MIP-3 $\beta$ .

Die Migration der iDCs wurde also durch die Inhibition der Sphingosinkinase gehemmt, während die Migration der mDCs durch Hemmung der Sphingosinkinase nicht beeinflusst wurde. Die Sphingosinkinase scheint daher bei der Migration von iDCs im Gegensatz zur Migration von mDCs eine entscheidende Rolle zu spielen. Unsere Ergebnisse zur Expression der Sphingosinkinase unterstützen diese Annahme, da iDCs verglichen mit mDCs eine höhere Sphingosinkinase-Expression aufweisen. Zwar wurde in unseren Versuchen nicht die Konzentration von S1P gemessen, aber es liegt

die Vermutung nahe, dass eine geringere Expression der Sphingosinkinase mit einer geringeren Synthese und Exkretion von S1P einhergeht.

Die höhere Synthese von S1P durch iDCs könnte daher zu einer höheren extrazellulären S1P-Konzentration führen. Dadurch könnten die S1P sezernierenden iDCs selbst in autokriner Weise sowie die anderen iDCs der näheren Umgebung in parakriner Weise über die Bindung von S1P an die S1P-Rezeptoren stimuliert werden. Von Mastzellen ist beispielsweise bekannt, dass sie nach Stimulation mit Immunglobulin E vermehrt S1P sezernieren, das über den Rezeptor S1P<sub>1</sub> zu einer stärkeren Chemotaxis von Mastzellen in Richtung Antigen führt [Jolly et al., 2004].

Es ist denkbar, dass über solche auto- und parakrinen Mechanismen die migratorische Antwort von iDCs auf bestimmte Chemoattraktoren gesteigert werden kann. Diese Signalwege könnten das Migrationspotential von iDCs in Richtung eines Chemokin-sezernierenden Ziels wie eines Tumors oder einer Entzündungsstelle vergrößern. Es wäre möglich, dass nach Antigenaufnahme und Reifung der DCs die Expression der Sphingosinkinase über spezielle intrazelluläre Signalwege herunterreguliert wird, und dies zu einer Migration in Richtung anderer Chemokine führt.

Neben diesen vorstellbaren auto- und parakrinen Mechanismen wäre es ebenfalls möglich, dass S1P als *second messenger* die Migration von iDCs beeinflusst. Denn von S1P ist bekannt, dass es nicht nur aus dem extrazellulären Raum über die S1P-Rezeptoren, sondern auch intrazellulär als *second messenger* bestimmte Effekte auslösen kann. Intrazellulär erhöhtes S1P kann eine Vielzahl von zellulären Vorgängen beeinflussen. So fördert S1P in der Zelle das Wachstum und das Überleben von Zellen und bewirkt die Freisetzung von Calcium aus zelleigenen Speichern. Die genauen Signalwege der intrazellulären Wirkung von S1P sind noch weitgehend unbekannt [Le Stunff et al., 2004; Payne et al., 2002; Pyne et al., 2000]. S1P könnte also auch direkt intrazellulär Migrationsvorgänge beeinflussen, wobei diese Möglichkeit im nächsten Unterkapitel der vorliegenden Arbeit im Zusammenhang mit den Versuchen zur intrazellulären Calcium-Freisetzung eingehender diskutiert wird.

Insgesamt kann auf Grund der Versuchsergebnisse der vorliegenden Arbeit vermutet werden, dass intrazellulär synthetisiertes S1P abhängig von der Expressionsstärke der Sphingosinkinase eine große Rolle bei der Migration von DCs spielt. Dabei bleibt offen, ob auto- bzw. parakrine Mechanismen oder intrazelluläre Wirkungen von S1P daran beteiligt sind.

Nach dem Wissen unserer Arbeitsgruppe war zum Zeitpunkt der Durchführung unserer Experimente die Rolle der Sphingosinkinase bei der Migration von DCs auf die oben genannten Chemokine und S1P noch nicht untersucht worden. Insgesamt existieren nur wenige Veröffentlichungen zum Einfluss der Sphingosinkinase bei der Migration von DCs, wobei in den folgenden Abschnitten die Ergebnisse von Kaneider et al. zu humanen DCs und Jung et al. zu murinen DCs in die Diskussion miteinbezogen werden.

Kaneider et al. beschrieben 2003, dass unreife Monozyten-abgeleitete DCs in Richtung eines Prionproteinfragments migrierten. Die Migration auf dieses Prionproteinfragment wurde durch Dimethylsphingosin, einem Inhibitor der Sphingosinkinase 1 und 2, signifikant reduziert [Kaneider et al., 2003]. Die Migration der unreifen DCs auf N-Formyl-Methionyl-Phenylalanin, einem bekannten Chemoattraktor für unreife DCs [Sozzani et al., 1995], wurde jedoch nicht durch Dimethylsphingosin gehemmt. Die Sphingosinkinase scheint daher nur bei der Migration auf bestimmte chemotaktische Agonisten eine entscheidende Rolle zu spielen und nicht generell für jeden Migrationsvorgang von unreifen DCs notwendig zu sein. Dies könnte bedeuten, dass die Sphingosinkinase-abhängige Migration auf bestimmte Chemokine und Chemoattraktoren durch eine verminderte oder verstärkte Aktivierung oder Expression der Sphingosinkinase reguliert werden könnte.

Als Aktivatoren der Sphingosinkinase sind unter anderem TNF- $\alpha$  bei Endothelzellen [Xia et al., 1998] und das Crosslinking von Immunglobulinrezeptoren bei neutrophilen Granulozyten bekannt [Chuang et al., 2000]. Es ist möglich, dass auch bei DCs im Rahmen von entzündlichen Reaktionen und dem Eindringen von Antigenen die Sphingosinkinase über ähnliche Mechanismen aktiviert wird. Infolge dieser Aktivierung könnte die Migration in Richtung bestimmter Chemokine und Chemoattraktoren verstärkt werden und somit zur Steuerung der Immunantwort beitragen. Die unterschiedliche Expressionsstärke der Sphingosinkinase von DCs verschiedener Reifegrade könnte, wie bereits diskutiert, ebenfalls zu dieser Regulierung beitragen.

2007 veröffentlichten Jung et al. Daten zum Einfluss der Sphingosinkinase auf die Migration von DCs, die aus dem Knochenmark von Mäusen gewonnen wurden [Jung et al., 2007]. Murine DCs, die mit einem Sphingosinkinaseinhibitor präinkubiert worden waren, zeigten nach 24-stündiger Stimulation mit LPS eine verminderte Migration auf MIP-3 $\beta$  im Vergleich zu DCs, die nur mit LPS stimuliert und nicht mit dem Sphingosinkinaseinhibitor vorinkubiert worden waren. Dabei führte die Präinkubation mit dem Sphingosinkinaseinhibitor generell zu einer Suppression der DC-Reifung, die

normalerweise durch LPS induziert wird. So wiesen die mit dem Sphingosinkinaseinhibitor vorbehandelten DCs nach Stimulation mit LPS weniger kostimulatorische Moleküle und eine geringere Expression des zu MIP-3 $\beta$  passenden Chemokinrezeptors CCR7 auf als unbehandelte DCs nach Ausreifung mit LPS. Der verwendete Sphingosinkinaseinhibitor hemmte die Aktivierung der p38 MAPK, wobei die alleinige Hemmung der p38 MAPK durch einen spezifischen Inhibitor zu einer Suppression der LPS-induzierten Reifung der murinen DCs, zu einer reduzierten Expression von CCR7 und zu einer geringeren Migration auf MIP-3 $\beta$  führte.

Bei den von Jung et al. beschriebenen Versuchen scheint also die Hemmung der Sphingosinkinase die Ausreifung von murinen, aus dem Knochenmark gewonnenen DCs zu supprimieren und somit auch die Migration auf MIP-3 $\beta$  zu reduzieren, das typischerweise chemotaktisch auf reife DCs wirkt, die den passenden Chemokinrezeptor CCR7 im Rahmen der Ausreifung hochreguliert haben. Dabei scheint die Wirkung des Sphingosinkinaseinhibitors über die Hemmung der p38 MAPK vermittelt zu werden.

In der vorliegenden Arbeit jedoch wird die Migration von unreifen humanen DCs durch einen Inhibitor der Sphingosinkinase gehemmt. Daher muss ein anderer Mechanismus zugrunde liegen, als die von Jung et al. beobachtete Supprimierung der DC-Ausreifung. Es wäre aber möglich, dass auch in unseren Versuchen die Hemmung der Sphingosinkinase intrazellulär über eine Inhibierung der p38 MAPK die Migration von iDCs beeinflusst, da die Rolle der p38 MAPK bei der Migration von iDCs in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde.

Um einen möglichen Signalweg aufzuspüren, der bei der Hemmung der Migration von iDCs durch die Inhibition der Sphingosinkinase involviert sein könnte, wurden Versuche zur intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration durchgeführt, die im folgenden Unterkapitel diskutiert werden.

#### **4.3.7 Einfluss von S1P und Sphingosinkinase auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration**

Bei der Bindung eines Chemokins an den passenden Chemokinrezeptor werden zahlreiche Signaltransduktionswege aktiviert. Dabei kommt es auch zu einer Aktivierung der Phospholipase C, was zur Bildung von IP<sub>3</sub> und einem transienten Konzentrationsanstieg des intrazellulären freien Calciums führt [Kehrl, 2006; Thelen, 2001]. Die Messung des intrazellulären Calciumanstiegs wird häufig verwendet, um die

Empfindlichkeit eines Chemokinrezeptors auf verschiedene Liganden zu testen [Baggiolini et al., 1997].

In der vorliegenden Arbeit wurde wie erwartet analog zu den Migrationsversuchen festgestellt, dass die Chemokine SDF-1 und MIP-1 $\alpha$  bei den iDCs eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration verursachten. Aber auch S1P führte analog zu seiner Wirkung auf die Migration von iDCs zu einem Konzentrationsanstieg des intrazellulären Calciums. Dies beobachteten auch Idzko et al. in ihren Versuchen mit unreifen Monozyten-abgeleiteten DCs [Idzko et al., 2002].

Die in unseren Versuchen verwendeten iDCs exprimierten die S1P-Rezeptoren S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub>. Mehrere Studien haben gezeigt, dass von diesen Rezeptoren vor allem S1P<sub>3</sub> mit besonders hoher Wirksamkeit starke Konzentrationsanstiege des intrazellulären Calciums vermittelt, gefolgt von S1P<sub>2</sub>. Dabei wurde der Calciumanstieg über die Phospholipase C vermittelt [An et al., 1999; Kon et al., 1999; Okamoto et al., 1999]. S1P<sub>1</sub> hingegen scheint keine deutliche Erhöhung des intrazellulären Calciums zu bewirken, sondern eher den intrazellulären Calciumkonzentrationsanstieg, der durch andere Rezeptoren induziert wurde, über die Proteinkinase C zu hemmen [Meyer zu Heringdorf et al., 2003b; Siehler et al., 2002]. Es existieren aber auch andere Signalwege, über die die S1P-Rezeptoren als GPCRs die Konzentration des intrazellulären Calciums ohne Beteiligung der Phospholipase C regulieren könnten, beispielsweise über den Einfluss von Proteinkinase A oder Proteinkinase C auf spannungsgesteuerte Calciumkanäle [Catterall, 2000; Meyer zu Heringdorf, 2004].

Allerdings kann nicht nur extrazelluläres S1P über die S1P-Rezeptoren einen intrazellulären Calciumanstieg vermitteln, sondern auch intrazelluläres S1P kann unabhängig von den S1P-Rezeptoren einen Konzentrationsanstieg des intrazellulären Calciums verursachen [Ghosh et al., 1994; Meyer zu Heringdorf et al., 2003a], wobei die genaue Angriffsstelle von S1P noch nicht bekannt ist.

Es gibt mehrere bekannte externe Agonisten, die nach Bindung an Rezeptoren der Plasmamembran durch Aktivierung der Sphingosinkinase zu einem schnellen und transienten intrazellulären S1P-Anstieg verbunden mit einem Calciumkonzentrationsanstieg führen. Die Hemmung der Sphingosinkinase reduziert dabei den intrazellulären Calciumanstieg bei der Stimulation durch bestimmte Rezeptoragonisten wie ATP, Carbachol und *epidermal growth factor* [Meyer zu Heringdorf, 2004]. Dies deutet darauf hin, dass S1P als *second messenger* den Konzentrationsanstieg des intrazellulären Calciums vermittelt. Extrazelluläres S1P kann über seine Rezeptoren in bestimmten Zellen zu einer Aktivierung der

Sphingosinkinase führen, was mit einem Anstieg von intrazellulärem S1P und intrazellulärem Calcium gekoppelt ist [Meyer zu Heringdorf et al., 2001]. Damit scheint neben der weiter oben diskutierten, über die Phospholipase C vermittelten intrazellulären Calciumerhöhung ein weiterer Signalweg zu existieren, über den extrazelluläres S1P mittels seiner Rezeptoren einen intrazellulären Calciumanstieg bewirken kann.

Es sind Rezeptoren bekannt, die nach Bindung ihrer Liganden sowohl die Sphingosinkinase als auch die Phospholipase C aktivieren. So zeigten Melendez et al., dass bei humanen Mastzellen das Crosslinking von Immunglobulinrezeptoren durch Antigenkomplexe die Sphingosinkinase und die Phospholipase C aktivieren. Die Aktivierung der Sphingosinkinase führte zu einem raschen Calciumkonzentrationsanstieg, der von der Calciummobilisierung aus intrazellulären Speichern abhängig war. Die Aktivierung der Phospholipase C führte zu einem zweiten, langsameren Konzentrationsanstieg des intrazellulären Calciums durch Mobilisierung aus intrazellulären Speichern sowie zu einem Calciumeinstrom von außen in die Zelle hinein. Diese beiden Signalwege schienen unabhängig voneinander abzulaufen, wobei die Aktivierung der Sphingosinkinase für die Degranulation der Mastzelle notwendig war [Melendez et al., 2002].

Angesichts der Tatsache, dass ein Konzentrationsanstieg des intrazellulären Calciums durch extrazelluläre Stimuli sowohl über die Phospholipase C als auch über die Sphingosinkinase als auch über beide Signalwege gleichzeitig ausgelöst werden kann, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, wie sich die Hemmung der Sphingosinkinase auf den intrazellulären Calciumkonzentrationsanstieg bei iDCs nach Stimulation mit S1P, MIP-1 $\alpha$  oder SDF-1 auswirkt.

Während die Hemmung der Sphingosinkinase mit DHS die Migration der iDCs auf S1P, SDF-1 und MIP-1 $\alpha$  hemmte, verhinderte sie jedoch nicht den intrazellulären Calciumanstieg in den iDCs nach Stimulation mit S1P, SDF-1 und MIP-1 $\alpha$ . Der Anstieg des intrazellulären Calciums auf die Stimuli S1P, SDF-1 und MIP-1 $\alpha$  scheint also nicht oder zumindest nicht ausschließlich über die Sphingosinkinase vermittelt zu werden.

Mit der in der dieser Arbeit verwendeten Methode kann nur eine Aussage darüber getroffen werden, ob die intrazelluläre Calciumkonzentration steigt oder nicht. Um zu differenzieren, ob die Größe des Calciumkonzentrationsanstiegs nach Hemmung der Sphingosinkinase verringert ist, müssten andere Methoden verwendet werden, mit denen der Wert der Calciumkonzentration genau bestimmt werden kann. Ein geringerer Calciumkonzentrationsanstieg würde dann Anlass zur Vermutung geben,

dass die Sphingosinkinase an der Auslösung des Calciumsignals beteiligt ist. In unseren Versuchen wurde nicht überprüft, ob die Hemmung von anderen bekannten Signalwegen, z.B. der Phospholipase C, zur vollständigen oder teilweisen Inhibition des Calciumkonzentrationsanstiegs führt.

Daher kann durch die Versuche der vorliegenden Arbeit nicht ausgeschlossen werden, dass Sphingosinkinase und intrazelluläres S1P an der Auslösung des intrazellulären Calciumanstiegs mitbeteiligt sind, aber es kann sich nicht um den alleinigen Signalweg handeln, da nach Hemmung der Sphingosinkinase immer noch ein deutlicher Konzentrationsanstieg messbar war. Ob dieses rasche transiente intrazelluläre Calciumsignal auf S1P, SDF-1 und MIP-1 $\alpha$  bei der Migration von iDCs eine Rolle spielt, kann durch die Versuche dieser Arbeit nicht geklärt werden, da keine Inhibition oder messbare Veränderung des Signals stattfand.

Die Frage bleibt offen, wie die Hemmung der Sphingosinkinase zur Migrationshemmung der iDCs führt, da der untersuchte schnelle intrazelluläre Calciumkonzentrationsanstieg daran nicht beteiligt zu sein scheint. Es wäre möglich, dass S1P als *second messenger* neben der Freisetzung von intrazellulärem Calcium noch andere Signalwege beeinflusst, die bei der Migration von DCs eine Rolle spielen könnten. So zeigten Wang et al., dass S1P wahrscheinlich von intrazellulär aus und nicht über Oberflächenrezeptoren durch Phosphorylierung der *focal adhesion kinase* die Motilität von Brustkrebszellen hemmt [Wang et al., 1999a]. Allerdings wurden noch keine direkten intrazellulären Angriffspunkte von S1P identifiziert und nach dem Wissen unserer Arbeitsgruppe existieren keine Studien, die eine Wirkung von intrazellulärem S1P auf die Migration von Immunzellen nachgewiesen haben.

Daher erscheint die bereits weiter oben diskutierte mögliche Erklärung wahrscheinlicher, dass die Freisetzung von intrazellulär durch die Sphingosinkinase synthetisiertem S1P über autokrine bzw. parakrine Mechanismen, die durch die S1P-Rezeptoren vermittelt werden, zur Verstärkung der Migration von iDCs beiträgt.

#### **4.4 Klinische Relevanz**

DCs können sowohl Resistenz als auch Toleranz des Immunsystems gegenüber bestimmten Antigenen induzieren. Daher wird versucht, mit Hilfe von DCs das Immunsystem zu therapeutischen Zwecken zu manipulieren unter anderem bei der Immuntherapie maligner Tumore [Steinman et al., 2007].

In den bisherigen klinischen Studien konnten durch Vakzinierung mit DCs nur vereinzelt Regressionen von Tumoren beobachtet werden [O'Rourke et al., 2003; Palucka et al., 2006], generell war die klinische Wirksamkeit jedoch gering [Osada et al., 2006; Steinman et al., 2007]. Um die Effektivität der Krebsimmuntherapie mit DCs zu verbessern, sind Versuche *in vitro* zu grundlegenden Parametern nötig, die bei der Induktion einer Immunantwort durch DCs eine entscheidende Rolle spielen. Einen wichtigen Vorgang stellt dabei die Migration von DCs dar, da die meisten *ex vivo* generierten DCs an der Injektionsstelle verbleiben [De Vries et al., 2003; Morse et al., 1999]. Daher besteht die Notwendigkeit, zu untersuchen, welche Faktoren und Zusätze bei der Applikation von DCs die Migration zu den lymphatischen Organen und damit die Induktion tumorspezifischer Immunantworten steigern könnte. In der vorliegenden Arbeit wurden Monozyten-abgeleitete DCs *in vitro* untersucht, da diese Art von DCs unter anderem auf Grund ihrer einfachen Verfügbarkeit häufig in klinischen Studien zur Immuntherapie maligner Neoplasien eingesetzt wird.

Während der letzten Jahre wurde entdeckt, dass Sphingolipide wie S1P eine wichtige Rolle bezüglich Migration, Wachstum, Überleben und Tod von Zellen spielen [Spiegel et al., 2003]. Die Synthese von S1P durch die Sphingosinkinase wird durch bestimmte Stimuli wie Zytokine oder Antigenen gesteigert. S1P kann als extrazellulärer Mediator über die S1P-Rezeptoren und als intrazellulärer *second messenger* agieren [Payne et al., 2002; Pyne et al., 2000]. S1P ist an der Regulierung der Differenzierung und Aktivierung von Immunzellen beteiligt und kann als proinflammatorischer Mediator die Zytokinproduktion und Chemotaxis von Immunzellen entscheidend beeinflussen [Kee et al., 2005; Melendez, 2008].

So spielt die Sphingosinkinase eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung und Chemotaxis von Neutrophilen und Makrophagen auf ein bestimmtes Anaphylatoxin, das proinflammatorische Wirkung besitzt [Ibrahim et al., 2004; Melendez et al., 2004]. Die Hemmung der Sphingosinkinase könnte daher einen Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Therapeutika bei entzündlichen Erkrankungen darstellen.

Auf der Beeinflussung der Migration von Lymphozyten beruht die Wirkung von FTY720, dass nach Applikation im Körper durch die Sphingosinkinase 2 phosphoryliert wird. FTY720-Phosphat stellt ein S1P-Analogon dar, dass an die S1P-Rezeptoren S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>3</sub>, S1P<sub>4</sub> und S1P<sub>5</sub> bindet [Takabe et al., 2008]. Es induziert die Internalisierung und Degradation von S1P<sub>1</sub> und bewirkt damit eine verlängerte Downregulation des Rezeptors. Dies führt zu einer Sequestration der Lymphozyten in den sekundären lymphatischen Organen, da die Signalvermittlung von S1P über S1P<sub>1</sub> für die Lymphozyten zum Verlassen der lymphatischen Organe notwendig ist

[Matloubian et al., 2004]. Daraus resultiert eine starke Verringerung der Lymphozyten im Blut und in den nichtlymphatischen Organen und somit eine immunsuppressive Wirkung. In klinischen Studien wird die Wirksamkeit von FTY720 bei Nierentransplantation [Tedesco-Silva et al., 2006] und Multipler Sklerose getestet [Kappos et al., 2006].

In einem murinen Asthmodell wurde festgestellt, dass die Inhalation und somit lokale Anwendung von FTY720 die Migration von DCs aus der Lunge zu den mediastinalen Lymphknoten hemmte und auf diese Art die Bildung von allergenspezifischen T<sub>H</sub>2-Zellen inhibierte [Idzko et al., 2006]. Die Manipulation der Migration von DCs in der Lunge mit S1P-Rezeptor-Agonisten könnte daher einen Ansatz für eine neue Strategie in der Asthmatherapie darstellen.

Es bestehen also zahlreiche Ansätze, verschiedene Erkrankungen durch Modulation des Immunsystems zu therapieren, indem die Funktion von DCs oder die Signaltransduktion über Sphingosinkinase, S1P und S1P-Rezeptoren manipuliert wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit die Migration von Monozyten-abgeleiteten DCs verschiedener Reifegrade durch S1P und Sphingosinkinase beeinflusst wird. Dabei stellte sich heraus, dass die Migration von iDCs durch die Inhibierung der Sphingosinkinase gehemmt und durch extrazelluläres S1P verstärkt wird, während die Migration von mDCs nicht beeinflusst wird. Durch die Hemmung der S1P-Rezeptoren oder der Sphingosinkinase könnte die Migration von unreifen DCs zu inflammatorischen Gebieten, wo vermehrt S1P oder das Chemokin MIP-1 $\alpha$  sezerniert wird, reduziert und damit eventuell die Induktion einer Immunantwort über DCs verhindert werden. Bei der Tumorummuntherapie werden zunehmend mDCs verwendet, da diese eine höhere Migrationsrate zu den Lymphknoten aufweisen [De Vries et al., 2003]. Unsere Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass ihre Migration nicht durch S1P oder die Hemmung der Sphingosinkinase beeinflusst werden könnte. Allerdings gibt es Tumore, die S1P sezernieren [Hong et al., 1999], und es wäre daher denkbar, dass diese Tumore leichter vom Immunsystem attackiert werden könnten, indem unreife DCs auf Grund des S1P-Gradienten vermehrt dorthin migrieren.

Insgesamt stellt sich die Frage, inwieweit das Verhalten der DCs in dem verwendeten Migrationsmodell dem Verhalten der DCs bei Entzündungen oder malignen Neoplasien beim Menschen entspricht. Die Beeinflussung der Signaltransduktion über S1P beim Menschen könnte außerdem unvorhergesehene Wirkungen hervorrufen, da Sphingosinkinase, S1P und S1P-Rezeptoren bei zahlreichen verschiedenen Zellen eine unterschiedliche Rolle spielen können. Um diese Punkte zu beurteilen, wären weitere

Versuche notwendig, z.B. als nächster Schritt mit Tiermodellen zu entzündlichen oder malignen Erkrankungen.

## 5. Zusammenfassung

Wegen ihrer Schlüsselrolle bei der Regulierung von Immunantworten sind DCs Gegenstand intensiver Forschung. Unter anderem richtet sich das Interesse dabei besonders auf die Migration von DCs. Denn die DCs müssen sich erst zur Antigenaufnahme in der Peripherie verteilen und anschließend zur Antigenpräsentation in die Lymphknoten wandern, um eine Immunantwort induzieren zu können.

Das Sphingolipid S1P wird durch die Sphingosinkinase synthetisiert und kann als extrazellulärer Mediator über die S1P-Rezeptoren oder als intrazellulärer *second messenger* agieren. S1P ist an der Regulierung von Migration, Wachstum, Überleben und Tod von Zellen, darunter auch Zellen des Immunsystems, beteiligt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von S1P und Sphingosinkinase bei der Migration von Monozyten-abgeleiteten unreifen (iDCs) und reifen DCs (mDCs) untersucht.

Es ließ sich feststellen, dass die iDCs im Gegensatz zu den mDCs auf S1P migrierten. Dabei exprimierten iDCs und mDCs gleichermaßen die S1P-Rezeptoren S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub>, so dass das verschiedene Migrationsverhalten auf S1P nicht mit einer unterschiedlichen Expression dieser S1P-Rezeptoren erklärt werden kann. Für die Migration der iDCs auf S1P scheint nach den Ergebnissen dieser Arbeit der Rezeptor S1P<sub>3</sub> notwendig zu sein.

Die Inhibierung der Sphingosinkinase hemmte die Migration von iDCs auf die proinflammatorischen Chemokine MIP-1 $\alpha$  und SDF-1. Die Migration der mDCs auf 6CKine und MIP-3 $\beta$ , die als Chemokine in vivo reife DCs zu den Lymphknoten leiten, wurde jedoch nicht durch die Hemmung der Sphingosinkinase beeinflusst.

Gemäß weiterer Versuchsergebnisse scheint die Expression der Sphingosinkinase 1 bei iDCs höher als bei mDCs und bei mDCs höher als bei mit Antigen beladenen mDCs zu sein. Zwar wurde in unseren Versuchen nicht die Konzentration von S1P gemessen, aber es liegt die Vermutung nahe, dass eine höhere Expression der Sphingosinkinase bei iDCs mit einer höheren Synthese und Exkretion von S1P einhergeht. Durch die höhere extrazelluläre S1P-Konzentration könnten die iDCs in autokriner und parakriner Weise über die Bindung von S1P an die S1P-Rezeptoren stimuliert werden und so die migratorische Antwort von iDCs auf bestimmte Chemoattraktoren gesteigert werden. Es wäre möglich, dass nach Antigenaufnahme

und Reifung der DCs die Expression der Sphingosinkinase über spezielle intrazelluläre Signalwege herunterreguliert wird, und dies zu einer Migration in Richtung anderer Chemokine führt.

Insgesamt kann vermutet werden, dass intrazellulär synthetisiertes S1P abhängig von der Expressionsstärke der Sphingosinkinase eine große Rolle bei der Migration von DCs auf bestimmte Chemokine spielt. Extrazellulär hingegen scheint S1P bedeutenden Einfluss als Chemoattraktor für unreife DCs zu haben. Deshalb könnte S1P zur Rekrutierung von unreifen DCs an Stellen des Körpers beitragen, wo Entzündungsprozesse stattfinden oder Pathogene eingedrungen sind.

## 6. Literaturverzeichnis

- Acuto O, Michel F. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:939-51.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124:783-801.
- Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 1998; 392:86-9.
- Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 1999; 285:736-9.
- Allavena P, Sica A, Vecchi A, Locati M, Sozzani S, Mantovani A. The chemokine receptor switch paradigm and dendritic cell migration: its significance in tumor tissues. *Immunol Rev* 2000; 177:141-9.
- Ammit AJ, Hastie AT, Edsall LC, Hoffman RK, Amrani Y, Krymskaya VP, Kane SA, Peters SP, Penn RB, Spiegel S, Panettieri RA, Jr. Sphingosine 1-phosphate modulates human airway smooth muscle cell functions that promote inflammation and airway remodeling in asthma. *Faseb J* 2001; 15:1212-4.
- An S, Bleu T, Zheng Y. Transduction of intracellular calcium signals through G protein-mediated activation of phospholipase C by recombinant sphingosine 1-phosphate receptors. *Mol Pharmacol* 1999; 55:787-94.
- Ancellin N, Hla T. Differential pharmacological properties and signal transduction of the sphingosine 1-phosphate receptors EDG-1, EDG-3, and EDG-5. *J Biol Chem* 1999; 274:18997-9002.
- Ardavin C, Martinez del Hoyo G, Martin P, Anjuere F, Arias CF, Marin AR, Ruiz S, Parrillas V, Hernandez H. Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol* 2001; 22:691-700.
- Babatz J, Rollig C, Lobel B, Folprecht G, Haack M, Gunther H, Kohne CH, Ehninger G, Schmitz M, Bornhauser M. Induction of cellular immune responses against carcinoembryonic antigen in patients with metastatic tumors after vaccination with altered peptide ligand-loaded dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55:268-76.
- Babatz J, Rollig C, Oelschlagel U, Zhao S, Ehninger G, Schmitz M, Bornhauser M. Large-scale immunomagnetic selection of CD14+ monocytes to generate dendritic cells for cancer immunotherapy: a phase I study. *J Hematother Stem Cell Res* 2003; 12:515-23.
- Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:675-705.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:767-811.
- Banchereau J, Palucka AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 2005; 5:296-306.
- Banchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M, Burkeholder S, Taquet N, Rolland A, Taquet S, Coquery S, Wittkowski KM, Bhardwaj N, Pineiro L, Steinman R, Fay J. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res* 2001; 61:6451-8.
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392:245-52.
- Beeler TJ, Jona I, Martonosi A. The effect of ionomycin on calcium fluxes in sarcoplasmic reticulum vesicles and liposomes. *J Biol Chem* 1979; 254:6229-31.

- Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Heath WR. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 1998; 393:478-80.
- Bhardwaj N, Bender A, Gonzalez N, Bui LK, Garrett MC, Steinman RM. Influenza virus-infected dendritic cells stimulate strong proliferative and cytolytic responses from human CD8+ T cells. *J Clin Invest* 1994; 94:797-807.
- Bonasio R, von Andrian UH. Generation, migration and function of circulating dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 2006; 18:503-11.
- Bricard G, Porcelli SA. Antigen presentation by CD1 molecules and the generation of lipid-specific T cell immunity. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64:1824-40.
- Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR, Godowski PJ, Modlin RL. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 1999; 285:732-6.
- Buehrer BM, Bell RM. Inhibition of sphingosine kinase in vitro and in platelets. Implications for signal transduction pathways. *J Biol Chem* 1992; 267:3154-9.
- Burridge K, Wennerberg K. Rho and Rac take center stage. *Cell* 2004; 116:167-79.
- Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* 1998; 279:381-4.
- Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; 16:521-55.
- Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 1992; 360:258-61.
- Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, Banchereau J. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 1994; 180:1263-72.
- Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant C, de Saint-Vis B, Jacquet C, Yoneda K, Imamura S, Schmitt D, Banchereau J. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med* 1996; 184:695-706.
- Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 1997; 388:782-7.
- Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 1996; 184:747-52.
- Celluzzi CM, Mayordomo JI, Storkus WJ, Lotze MT, Falo LD, Jr. Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity. *J Exp Med* 1996; 183:283-7.
- Chan VW, Kothakota S, Rohan MC, Panganiban-Lustan L, Gardner JP, Wachowicz MS, Winter JA, Williams LT. Secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) is chemotactic for mature dendritic cells. *Blood* 1999; 93:3610-6.
- Chaplin DD. 1. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:S442-59.
- Chaplin DD. 1. Overview of the human immune response. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:S430-5.
- Chuang FY, Sassaroli M, Unkeless JC. Convergence of Fc gamma receptor IIA and Fc gamma receptor IIIB signaling pathways in human neutrophils. *J Immunol* 2000; 164:350-60.
- Chun J, Goetzl EJ, Hla T, Igarashi Y, Lynch KR, Moolenaar W, Pyne S, Tigyi G. International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol Rev* 2002; 54:265-9.

- Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. *J Leukoc Biol* 2007; 82:1365-74.
- Cranmer LD, Trevor KT, Hersh EM. Clinical applications of dendritic cell vaccination in the treatment of cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53:275-306.
- Czeloth N, Bernhardt G, Hofmann F, Genth H, Forster R. Sphingosine-1-phosphate mediates migration of mature dendritic cells. *J Immunol* 2005; 175:2960-7.
- Dauer M, Obermaier B, Herten J, Haerle C, Pohl K, Rothenfusser S, Schnurr M, Endres S, Eigler A. Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *J Immunol* 2003; 170:4069-76.
- De Libero G, Mori L. Mechanisms of lipid-antigen generation and presentation to T cells. *Trends Immunol* 2006; 27:485-92.
- De Vries IJ, Krooshoop DJ, Scharenborg NM, Lesterhuis WJ, Diepstra JH, Van Muijen GN, Strijk SP, Ruers TJ, Boerman OC, Oyen WJ, Adema GJ, Punt CJ, Figdor CG. Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state. *Cancer Res* 2003; 63:12-7.
- Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Ait-Yahia S, Briere F, Zlotnik A, Lebecque S, Caux C. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 1998; 188:373-86.
- Engering AJ, Cella M, Fluitsma D, Brockhaus M, Hoefsmit EC, Lanzavecchia A, Pieters J. The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. *Eur J Immunol* 1997; 27:2417-25.
- Fanger NA, Wardwell K, Shen L, Tedder TF, Guyre PM. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J Immunol* 1996; 157:541-8.
- Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* 1999; 5:1249-55.
- Ghosh TK, Bian J, Gill DL. Sphingosine 1-phosphate generated in the endoplasmic reticulum membrane activates release of stored calcium. *J Biol Chem* 1994; 269:22628-35.
- Gitlitz BJ, Beldegrun AS, Zisman A, Chao DH, Pantuck AJ, Hinkel A, Mulders P, Moldawer N, Tso CL, Figlin RA. A pilot trial of tumor lysate-loaded dendritic cells for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *J Immunother (1997)* 2003; 26:412-9.
- Gordon S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 2002; 111:927-30.
- Graeler M, Shankar G, Goetzl EJ. Cutting edge: suppression of T cell chemotaxis by sphingosine 1-phosphate. *J Immunol* 2002; 169:4084-7.
- Groothuis TA, Neefjes J. The many roads to cross-presentation. *J Exp Med* 2005; 202:1313-8.
- Grouard G, Rissoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 1997; 185:1101-11.
- Gunn MD, Tangemann K, Tam C, Cyster JG, Rosen SD, Williams LT. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:258-63.
- Hait NC, Oskeritzian CA, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758:2016-26.
- Hammad H, Kool M, Soullie T, Narumiya S, Trottein F, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. Activation of the D prostanoid 1 receptor suppresses asthma by modulation of lung dendritic cell function and induction of regulatory T cells. *J Exp Med* 2007; 204:357-67.

- Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997; 90:3245-87.
- Hartmann G, Weiner GJ, Krieg AM. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:9305-10.
- Ho CS, Munster D, Pyke CM, Hart DN, Lopez JA. Spontaneous generation and survival of blood dendritic cells in mononuclear cell culture without exogenous cytokines. *Blood* 2002; 99:2897-904.
- Hong G, Baudhuin LM, Xu Y. Sphingosine-1-phosphate modulates growth and adhesion of ovarian cancer cells. *FEBS Lett* 1999; 460:513-8.
- Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002; 168:4531-7.
- Ibrahim FB, Pang SJ, Melendez AJ. Anaphylatoxin signaling in human neutrophils. A key role for sphingosine kinase. *J Biol Chem* 2004; 279:44802-11.
- Idzko M, Hammad H, van Nimwegen M, Kool M, Muller T, Soullie T, Willart MA, Hijdra D, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. Local application of FTY720 to the lung abrogates experimental asthma by altering dendritic cell function. *J Clin Invest* 2006; 116:2935-44.
- Idzko M, Panther E, Corinti S, Morelli A, Ferrari D, Herouy Y, Dichmann S, Mockenhaupt M, Gebicke-Haerter P, Di Virgilio F, Girolomoni G, Norgauer J. Sphingosine 1-phosphate induces chemotaxis of immature and modulates cytokine-release in mature human dendritic cells for emergence of Th2 immune responses. *Faseb J* 2002; 16:625-7.
- Im DS, Heise CE, Ancellin N, O'Dowd BF, Shei GJ, Heavens RP, Rigby MR, Hla T, Mandala S, McAllister G, George SR, Lynch KR. Characterization of a novel sphingosine 1-phosphate receptor, Edg-8. *J Biol Chem* 2000; 275:14281-6.
- Inaba K, Metlay JP, Crowley MT, Steinman RM. Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ. *J Exp Med* 1990; 172:631-40.
- Inaba K, Pack M, Inaba M, Sakuta H, Isdell F, Steinman RM. High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *J Exp Med* 1997; 186:665-72.
- Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:197-216.
- Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman RM, Nussenzweig MC. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 1995; 375:151-5.
- Jolly PS, Bektas M, Olivera A, Gonzalez-Espinosa C, Proia RL, Rivera J, Milstien S, Spiegel S. Transactivation of sphingosine-1-phosphate receptors by FcepsilonRI triggering is required for normal mast cell degranulation and chemotaxis. *J Exp Med* 2004; 199:959-70.
- Jonuleit H, Kuhn U, Muller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, Knop J, Enk AH. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol* 1997; 27:3135-42.
- Jung ID, Lee JS, Kim YJ, Jeong YI, Lee CM, Lee MG, Ahn SC, Park YM. Sphingosine kinase inhibitor suppresses dendritic cell migration by regulating chemokine receptor expression and impairing p38 mitogen-activated protein kinase. *Immunology* 2007; 121:533-44.
- Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001; 194:863-9.

- Kaneider NC, Kaser A, Dunzendorfer S, Tilg H, Wiedermann CJ. Sphingosine kinase-dependent migration of immature dendritic cells in response to neurotoxic prion protein fragment. *J Virol* 2003; 77:5535-9.
- Kappos L, Antel J, Comi G, Montalban X, O'Connor P, Polman CH, Haas T, Korn AA, Karlsson G, Radue EW. Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2006; 355:1124-40.
- Kee TH, Vit P, Melendez AJ. Sphingosine kinase signalling in immune cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005; 32:153-61.
- Kehrl JH. Chemoattractant receptor signaling and the control of lymphocyte migration. *Immunol Res* 2006; 34:211-27.
- Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer cell immune escape and tumor progression by exploitation of anti-inflammatory and pro-inflammatory responses. *Cancer Biol Ther* 2005; 4:924-33.
- Kimura T, Watanabe T, Sato K, Kon J, Tomura H, Tamama K, Kuwabara A, Kanda T, Kobayashi I, Ohta H, Ui M, Okajima F. Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of human endothelial cells possibly through the lipid receptors, Edg-1 and Edg-3. *Biochem J* 2000; 348 Pt 1:71-6.
- Kluk MJ, Hla T. Role of the sphingosine 1-phosphate receptor EDG-1 in vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Circ Res* 2001; 89:496-502.
- Kluk MJ, Hla T. Signaling of sphingosine-1-phosphate via the S1P/EDG-family of G-protein-coupled receptors. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1582:72-80.
- Kon J, Sato K, Watanabe T, Tomura H, Kuwabara A, Kimura T, Tamama K, Ishizuka T, Murata N, Kanda T, Kobayashi I, Ohta H, Ui M, Okajima F. Comparison of intrinsic activities of the putative sphingosine 1-phosphate receptor subtypes to regulate several signaling pathways in their cDNA-transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1999; 274:23940-7.
- Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, Giese T, Engelmann H, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* 2001; 31:3026-37.
- Kveberg L, Bryceson Y, Inngjerdigen M, Rolstad B, Maghazachi AA. Sphingosine 1 phosphate induces the chemotaxis of human natural killer cells. Role for heterotrimeric G proteins and phosphoinositide 3 kinases. *Eur J Immunol* 2002; 32:1856-64.
- Larsson C. Protein kinase C and the regulation of the actin cytoskeleton. *Cell Signal* 2006; 18:276-84.
- Le Stunff H, Milstien S, Spiegel S. Generation and metabolism of bioactive sphingosine-1-phosphate. *J Cell Biochem* 2004; 92:882-99.
- Lee JJ, Park MS, Park JS, Kang HK, Kim SK, Nguyen Pham TN, Zhu XW, Cho D, Nam JH, Kim YJ, Rhee JH, Chung IJ, Kim HJ. Induction of leukemic-cell-specific cytotoxic T lymphocytes by autologous monocyte-derived dendritic cells presenting leukemic cell antigens. *J Clin Apher* 2006; 21:188-94.
- Lee MJ, Thangada S, Claffey KP, Ancellin N, Liu CH, Kluk M, Volpi M, Sha'afi RI, Hla T. Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* 1999; 99:301-12.
- Lee MJ, Van Brocklyn JR, Thangada S, Liu CH, Hand AR, Menzeleev R, Spiegel S, Hla T. Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science* 1998; 279:1552-5.
- Leon B, Lopez-Bravo M, Ardavin C. Monocyte-derived dendritic cells. *Semin Immunol* 2005; 17:313-8.
- Li P, Gregg JL, Wang N, Zhou D, O'Donnell P, Blum JS, Crotzer VL. Compartmentalization of class II antigen presentation: contribution of cytoplasmic and endosomal processing. *Immunol Rev* 2005; 207:206-17.
- Liu C, Hermann TE. Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J Biol Chem* 1978; 253:5892-4.

- Liu YJ, Kanzler H, Soumelis V, Gilliet M. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat Immunol* 2001; 2:585-9.
- Luo X, Tarbell KV, Yang H, Pothoven K, Bailey SL, Ding R, Steinman RM, Suthanthiran M. Dendritic cells with TGF-beta1 differentiate naive CD4+CD25-T cells into islet-protective Foxp3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:2821-6.
- MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DN. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 2002; 100:4512-20.
- Maceyka M, Payne SG, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1585:193-201.
- Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Ohashi K, Mizuno K, Narumiya S. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 1999; 285:895-8.
- Maraskovsky E, Daro E, Roux E, Teepe M, Maliszewski CR, Hoek J, Caron D, Lebsack ME, McKenna HJ. In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand. *Blood* 2000; 96:878-84.
- Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL, Cyster JG. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 2004; 427:355-60.
- Mattie M, Brooker G, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate, a putative second messenger, mobilizes calcium from internal stores via an inositol trisphosphate-independent pathway. *J Biol Chem* 1994; 269:3181-8.
- McWilliam AS, Napoli S, Marsh AM, Pemper FL, Nelson DJ, Pimm CL, Stumbles PA, Wells TN, Holt PG. Dendritic cells are recruited into the airway epithelium during the inflammatory response to a broad spectrum of stimuli. *J Exp Med* 1996; 184:2429-32.
- McWilliam AS, Nelson D, Thomas JA, Holt PG. Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces. *J Exp Med* 1994; 179:1331-6.
- Mechtcheriakova D, Wlachos A, Sobanov J, Kopp T, Reuschel R, Bornancin F, Cai R, Zemann B, Urtz N, Stingl G, Zlabinger G, Woisetschlager M, Baumruker T, Billich A. Sphingosine 1-phosphate phosphatase 2 is induced during inflammatory responses. *Cell Signal* 2007; 19:748-60.
- Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 2000; 173:89-97.
- Melendez AJ. Sphingosine kinase signalling in immune cells: potential as novel therapeutic targets. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1784:66-75.
- Melendez AJ, Carlos-Dias E, Gosink M, Allen JM, Takacs L. Human sphingosine kinase: molecular cloning, functional characterization and tissue distribution. *Gene* 2000; 251:19-26.
- Melendez AJ, Ibrahim FB. Antisense knockdown of sphingosine kinase 1 in human macrophages inhibits C5a receptor-dependent signal transduction, Ca<sup>2+</sup> signals, enzyme release, cytokine production, and chemotaxis. *J Immunol* 2004; 173:1596-603.
- Melendez AJ, Khaw AK. Dichotomy of Ca<sup>2+</sup> signals triggered by different phospholipid pathways in antigen stimulation of human mast cells. *J Biol Chem* 2002; 277:17255-62.
- Meyer zu Heringdorf D. Lysophospholipid receptor-dependent and -independent calcium signaling. *J Cell Biochem* 2004; 92:937-48.
- Meyer zu Heringdorf D, Lass H, Kuchar I, Lipinski M, Alemany R, Rumenapp U, Jakobs KH. Stimulation of intracellular sphingosine-1-phosphate production by G-protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptors. *Eur J Pharmacol* 2001; 414:145-54.
- Meyer zu Heringdorf D, Liliom K, Schaefer M, Danneberg K, Jaggar JH, Tigyi G, Jakobs KH. Photolysis of intracellular caged sphingosine-1-phosphate causes

- Ca<sup>2+</sup> mobilization independently of G-protein-coupled receptors. *FEBS Lett* 2003a; 554:443-9.
- Meyer zu Heringdorf D, Vincent ME, Lipinski M, Danneberg K, Stropp U, Wang DA, Tigyi G, Jakobs KH. Inhibition of Ca(2+) signalling by the sphingosine 1-phosphate receptor S1P(1). *Cell Signal* 2003b; 15:677-87.
- Mitra P, Oskeritzian CA, Payne SG, Beaven MA, Milstien S, Spiegel S. Role of ABCC1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:16394-9.
- Monu N, Trombetta ES. Cross-talk between the endocytic pathway and the endoplasmic reticulum in cross-presentation by MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol* 2007; 19:66-72.
- Morse MA, Coleman RE, Akabani G, Niehaus N, Coleman D, Lysterly HK. Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies. *Cancer Res* 1999; 59:56-8.
- Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'Amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 2000; 164:5998-6004.
- Nair SK, Snyder D, Rouse BT, Gilboa E. Regression of tumors in mice vaccinated with professional antigen-presenting cells pulsed with tumor extracts. *Int J Cancer* 1997; 70:706-15.
- Nava VE, Hobson JP, Murthy S, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine kinase type 1 promotes estrogen-dependent tumorigenesis of breast cancer MCF-7 cells. *Exp Cell Res* 2002; 281:115-27.
- Nestle FO, Farkas A, Conrad C. Dendritic-cell-based therapeutic vaccination against cancer. *Curr Opin Immunol* 2005; 17:163-9.
- Novak EJ, Rabinovitch PS. Improved sensitivity in flow cytometric intracellular ionized calcium measurement using fluo-3/Fura Red fluorescence ratios. *Cytometry* 1994; 17:135-41.
- Ochando JC, Homma C, Yang Y, Hidalgo A, Garin A, Tacke F, Angeli V, Li Y, Boros P, Ding Y, Jessberger R, Trinchieri G, Lira SA, Randolph GJ, Bromberg JS. Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol* 2006; 7:652-62.
- Okamoto H, Takuwa N, Yatomi Y, Gonda K, Shigematsu H, Takuwa Y. EDG3 is a functional receptor specific for sphingosine 1-phosphate and sphingosylphosphorylcholine with signaling characteristics distinct from EDG1 and AGR16. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 260:203-8.
- Okamoto H, Takuwa N, Yokomizo T, Sugimoto N, Sakurada S, Shigematsu H, Takuwa Y. Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3. *Mol Cell Biol* 2000; 20:9247-61.
- Olivera A, Kohama T, Edsall L, Nava V, Cuvillier O, Poulton S, Spiegel S. Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. *J Cell Biol* 1999; 147:545-58.
- O'Rourke MG, Johnson M, Lanagan C, See J, Yang J, Bell JR, Slater GJ, Kerr BM, Crowe B, Purdie DM, Elliott SL, Ellem KA, Schmidt CW. Durable complete clinical responses in a phase I/II trial using an autologous melanoma cell/dendritic cell vaccine. *Cancer Immunol Immunother* 2003; 52:387-95.
- Osada T, Clay TM, Woo CY, Morse MA, Lysterly HK. Dendritic cell-based immunotherapy. *Int Rev Immunol* 2006; 25:377-413.
- Oyama T, Ran S, Ishida T, Nadaf S, Kerr L, Carbone DP, Gabrilovich DI. Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells. *J Immunol* 1998; 160:1224-32.

- Paczesny S, Banchereau J, Wittkowski KM, Saracino G, Fay J, Palucka AK. Expansion of melanoma-specific cytolytic CD8+ T cell precursors in patients with metastatic melanoma vaccinated with CD34+ progenitor-derived dendritic cells. *J Exp Med* 2004; 199:1503-11.
- Paik JH, Chae S, Lee MJ, Thangada S, Hla T. Sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cell migration requires the expression of EDG-1 and EDG-3 receptors and Rho-dependent activation of alpha vbeta3- and beta1-containing integrins. *J Biol Chem* 2001; 276:11830-7.
- Palucka AK, Ueno H, Connolly J, Kerneis-Norvell F, Blanck JP, Johnston DA, Fay J, Banchereau J. Dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells can induce objective clinical responses and MART-1 specific CD8+ T-cell immunity. *J Immunother* 2006; 29:545-57.
- Pamer E, Cresswell P. Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:323-58.
- Payne SG, Milstien S, Barbour SE, Spiegel S. Modulation of adaptive immune responses by sphingosine-1-phosphate. *Semin Cell Dev Biol* 2004; 15:521-7.
- Payne SG, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate: dual messenger functions. *FEBS Lett* 2002; 531:54-7.
- Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2002; 14:123-8.
- Peters JH, Ruppert J, Gieseler RK, Najar HM, Xu H. Differentiation of human monocytes into CD14 negative accessory cells: do dendritic cells derive from the monocytic lineage? *Pathobiology* 1991; 59:122-6.
- Pulendran B. Modulating TH1/TH2 responses with microbes, dendritic cells, and pathogen recognition receptors. *Immunol Res* 2004; 29:187-96.
- Pulendran B, Banchereau J, Burkeholder S, Kraus E, Guinet E, Chalouni C, Caron D, Maliszewski C, Davoust J, Fay J, Palucka K. Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J Immunol* 2000; 165:566-72.
- Pyne S, Pyne NJ. Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. *Biochem J* 2000; 349:385-402.
- Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 1998; 50:413-92.
- Randolph GJ, Beaulieu S, Lebecque S, Steinman RM, Muller WA. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 1998; 282:480-3.
- Randolph GJ, Inaba K, Robbiani DF, Steinman RM, Muller WA. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* 1999; 11:753-61.
- Randolph GJ, Sanchez-Schmitz G, Liebman RM, Schakel K. The CD16(+) (FcgammaRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *J Exp Med* 2002; 196:517-27.
- Reddy A, Sapp M, Feldman M, Subklewe M, Bhardwaj N. A monocyte conditioned medium is more effective than defined cytokines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells. *Blood* 1997; 90:3640-6.
- Reid CD, Stackpoole A, Meager A, Tikerpae J. Interactions of tumor necrosis factor with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent CD34+ progenitors in human bone marrow. *J Immunol* 1992; 149:2681-8.
- Reis e Sousa C, Stahl PD, Austyn JM. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J Exp Med* 1993; 178:509-19.
- Rescigno M, Granucci F, Citterio S, Foti M, Ricciardi-Castagnoli P. Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. *Immunol Today* 1999; 20:200-3.
- Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 1998; 393:474-8.

- Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, Liu YJ. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999; 283:1183-6.
- Robinson SP, Patterson S, English N, Davies D, Knight SC, Reid CD. Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur J Immunol* 1999; 29:2769-78.
- Rock KL, Goldberg AL. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:739-79.
- Rock KL, Shen L. Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol Rev* 2005; 207:166-83.
- Romagnani S. Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy* 2006; 36:1357-66.
- Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994; 180:83-93.
- Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, Niederwieser D, Schuler G. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* 1996; 196:137-51.
- Rossi M, Young JW. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol* 2005; 175:1373-81.
- Rotta G, Edwards EW, Sangaletti S, Bennett C, Ronzoni S, Colombo MP, Steinman RM, Randolph GJ, Rescigno M. Lipopolysaccharide or whole bacteria block the conversion of inflammatory monocytes into dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 2003; 198:1253-63.
- Saeki H, Moore AM, Brown MJ, Hwang ST. Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *J Immunol* 1999; 162:2472-5.
- Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1995; 182:389-400.
- Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994; 179:1109-18.
- Sallusto F, Palermo B, Lenig D, Miettinen M, Matikainen S, Julkunen I, Forster R, Burgstahler R, Lipp M, Lanzavecchia A. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur J Immunol* 1999; 29:1617-25.
- Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Scharniel C, Lenig D, Mackay CR, Qin S, Lanzavecchia A. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 1998; 28:2760-9.
- Schnurr M, Chen Q, Shin A, Chen W, Toy T, Jenderek C, Green S, Miloradovic L, Drane D, Davis ID, Villadangos J, Shortman K, Maraskovsky E, Cebon J. Tumor antigen processing and presentation depend critically on dendritic cell type and the mode of antigen delivery. *Blood* 2005; 105:2465-72.
- Schnurr M, Galambos P, Scholz C, Then F, Dauer M, Endres S, Eigler A. Tumor cell lysate-pulsed human dendritic cells induce a T-cell response against pancreatic carcinoma cells: an in vitro model for the assessment of tumor vaccines. *Cancer Res* 2001; 61:6445-50.
- Schnurr M, Scholz C, Rothenfusser S, Galambos P, Dauer M, Robe J, Endres S, Eigler A. Apoptotic pancreatic tumor cells are superior to cell lysates in promoting cross-priming of cytotoxic T cells and activate NK and gammadelta T cells. *Cancer Res* 2002; 62:2347-52.

- Schuler G, Steinman RM. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med* 1985; 161:526-46.
- Schuler-Thurner B, Schultz ES, Berger TG, Weinlich G, Ebner S, Woerl P, Bender A, Feuerstein B, Fritsch PO, Romani N, Schuler G. Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells. *J Exp Med* 2002; 195:1279-88.
- Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:151-61.
- Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999; 284:1835-7.
- Siebler S, Manning DR. Pathways of transduction engaged by sphingosine 1-phosphate through G protein-coupled receptors. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1582:94-9.
- Sozzani S. Dendritic cell trafficking: more than just chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16:581-92.
- Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Mantovani A. The role of chemokines in the regulation of dendritic cell trafficking. *J Leukoc Biol* 1999; 66:1-9.
- Sozzani S, Sallusto F, Luini W, Zhou D, Piemonti L, Allavena P, Van Damme J, Valitutti S, Lanzavecchia A, Mantovani A. Migration of dendritic cells in response to formyl peptides, C5a, and a distinct set of chemokines. *J Immunol* 1995; 155:3292-5.
- Sparwasser T, Koch ES, Vabulas RM, Heeg K, Lipford GB, Ellwart JW, Wagner H. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur J Immunol* 1998; 28:2045-54.
- Spiegel S, English D, Milstien S. Sphingosine 1-phosphate signaling: providing cells with a sense of direction. *Trends Cell Biol* 2002; 12:236-42.
- Spiegel S, Milstien S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4:397-407.
- Spits H. Development of alphabeta T cells in the human thymus. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:760-72.
- Spits H, Couwenberg F, Bakker AQ, Weijer K, Uittenbogaart CH. Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2. *J Exp Med* 2000; 192:1775-84.
- Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991; 9:271-96.
- Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 2007; 449:419-26.
- Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973; 137:1142-62.
- Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:685-711.
- Strobl H, Riedl E, Scheinecker C, Bello-Fernandez C, Pickl WF, Rappersberger K, Majdic O, Knapp W. TGF-beta 1 promotes in vitro development of dendritic cells from CD34+ hemopoietic progenitors. *J Immunol* 1996; 157:1499-507.
- Svensson M, Stockinger B, Wick MJ. Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T cells. *J Immunol* 1997; 158:4229-36.
- Taha TA, Argraves KM, Obeid LM. Sphingosine-1-phosphate receptors: receptor specificity versus functional redundancy. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1682:48-55.
- Takabe K, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S. "Inside-out" signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. *Pharmacol Rev* 2008; 60:181-95.

- Takuwa Y. Subtype-specific differential regulation of Rho family G proteins and cell migration by the Edg family sphingosine-1-phosphate receptors. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1582:112-20.
- Tarbell KV, Petit L, Zuo X, Toy P, Luo X, Mqadmi A, Yang H, Suthanthiran M, Mojsov S, Steinman RM. Dendritic cell-expanded, islet-specific CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> regulatory T cells restore normoglycemia in diabetic NOD mice. *J Exp Med* 2007; 204:191-201.
- Tedesco-Silva H, Pescovitz MD, Cibrik D, Rees MA, Mulgaonkar S, Kahan BD, Gugliuzza KK, Rajagopalan PR, Esmeraldo Rde M, Lord H, Salvadori M, Slade JM. Randomized controlled trial of FTY720 versus MMF in de novo renal transplantation. *Transplantation* 2006; 82:1689-97.
- Thelen M. Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol* 2001; 2:129-34.
- Thurner B, Roder C, Dieckmann D, Heuer M, Kruse M, Glaser A, Keikavoussi P, Kampgen E, Bender A, Schuler G. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J Immunol Methods* 1999; 223:1-15.
- Trumpfheller C, Finke JS, Lopez CB, Moran TM, Moltedo B, Soares H, Huang Y, Schlesinger SJ, Park CG, Nussenzweig MC, Granelli-Piperno A, Steinman RM. Intensified and protective CD4<sup>+</sup> T cell immunity in mice with anti-dendritic cell HIV gag fusion antibody vaccine. *J Exp Med* 2006; 203:607-17.
- Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Narumiya S. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 1997; 389:990-4.
- Van Brocklyn JR, Graler MH, Bernhardt G, Hobson JP, Lipp M, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate is a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-6. *Blood* 2000; 95:2624-9.
- Wallet MA, Sen P, Tisch R. Immunoregulation of dendritic cells. *Clin Med Res* 2005; 3:166-75.
- Wan H, Dupasquier M. Dendritic cells in vivo and in vitro. *Cell Mol Immunol* 2005; 2:28-35.
- Wang F, Nohara K, Olivera A, Thompson EW, Spiegel S. Involvement of focal adhesion kinase in inhibition of motility of human breast cancer cells by sphingosine 1-phosphate. *Exp Cell Res* 1999a; 247:17-28.
- Wang F, Van Brocklyn JR, Hobson JP, Movafagh S, Zukowska-Grojec Z, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine 1-phosphate stimulates cell migration through a G(i)-coupled cell surface receptor. Potential involvement in angiogenesis. *J Biol Chem* 1999b; 274:35343-50.
- Worthylake RA, Burridge K. RhoA and ROCK promote migration by limiting membrane protrusions. *J Biol Chem* 2003; 278:13578-84.
- Xia P, Gamble JR, Rye KA, Wang L, Hii CS, Cockerill P, Khew-Goodall Y, Bert AG, Barter PJ, Vadas MA. Tumor necrosis factor-alpha induces adhesion molecule expression through the sphingosine kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:14196-201.
- Xu J, Wang F, Van Keymeulen A, Herzmark P, Straight A, Kelly K, Takuwa Y, Sugimoto N, Mitchison T, Bourne HR. Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils. *Cell* 2003; 114:201-14.
- Zhou D, Blum JS. Presentation of cytosolic antigens via MHC class II molecules. *Immunol Res* 2004; 30:279-90.
- Zhou LJ, Schwarting R, Smith HM, Tedder TF. A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily. *J Immunol* 1992; 149:735-42.
- Zhou LJ, Tedder TF. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* 1995; 154:3821-35.

- Zhou LJ, Tedder TF. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:2588-92.
- Zitvogel L, Mayordomo JI, Tjandrawan T, DeLeo AB, Clarke MR, Lotze MT, Storkus WJ. Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. *J Exp Med* 1996; 183:87-97.

## 8. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

APC	Allophycocyanin
APCs	Antigen-präsentierende Zellen
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovines Serum Albumin
BZR	B-Zellrezeptor
cDNA	<i>complementary</i> -Desoxyribonukleinsäure
DAG	Diacylglycerin
DC	Dendritische Zelle
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
DHS	DL-threo-Dihydrosphingosin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorters</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	<i>Forward scatter</i>
GMCSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GPCRs	G protein-coupled receptors
GTP	Guanosintriphosphat
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
iDC	Unreife dendritische Zelle
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositoltrisphosphat
KLH	<i>Hemocyanin keyhole limpet</i>
LC	Langerhans-Zelle
LPS	Lipopolysaccherid
MCP	<i>Monocyte chemotactic protein</i>
mDC	Reife dendritische Zelle
MDC	<i>Monophage derived chemokine</i>
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>

mRNA	<i>Messenger-Ribonukleinsäure</i>
myDC	Myeloide dendritische Zelle
n.s.	Nicht signifikant
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-A-Protein
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PRRs	<i>Pattern recognition receptors</i>
RANTES	<i>Regulated on activation, normal T expressed and secreted</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkription-Polymerase-Ketten-Reaktion
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SEM	<i>Standard error of mean</i>
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor 1</i>
SDS	<i>Sodium-dodecyl-sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium-dodecyl-sulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>
SLC	<i>secondary lymphoid tissue chemokine</i>
SphK	Sphingosinkinase
SSC	<i>Sideward scatter</i>
S1P	D-erythro-Sphingosin-1-phosphat
TARC	<i>Thymus and activation regulated chemokine</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
TT	Tetanustoxoid
TZR	T-Zellrezeptor

## 9. Danksagung

Mein Dank gilt allen, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben. Bei Herrn PD Dr. Andreas Eigler und Herrn Prof. Dr. Stefan Endres möchte ich mich für die Überlassung des Themas und die herzliche Aufnahme in die Abteilung für Klinische Pharmakologie bedanken. Ich bin dankbar für die Unterstützung beim Besuch internationaler Kongresse und die kollegiale Atmosphäre innerhalb des Labors.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann und allen Verantwortlichen des Förderprogramms für Forschung und Lehre der Medizinischen Fakultät der LMU München für die finanzielle, wissenschaftliche und organisatorische Unterstützung meiner Dissertation im Rahmen des Promotionsstudiums Molekulare Medizin.

Bei Herrn Dr. Marc Dauer und Frau Dr. Sabina Eigenbrod möchte ich mich für die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten bedanken. Frau Rosemarie Kiefl danke ich für die Einarbeitung in experimentelle Techniken, ihre Mitarbeit bei der Durchführung der Experimente und den vielen unersetzlichen praktischen Ratschlägen. Für die gute Zusammenarbeit und das kollegiale Verhältnis möchte ich mich bei Jana Junkmann sowie allen anderen Doktoranden in der Abteilung für Klinische Pharmakologie bedanken. Herrn Dr. Kai Kehe und dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr in München danke ich für die Möglichkeit, den Fluor-S<sup>TM</sup> Multimager zur Auswertung meiner Versuche zu nutzen.

Ich danke Holger Tewes-Kampelmann, Dr. phil. Bernhard Jakl und meinen Eltern Siegrun Jakl und Dipl.-Ing. Hermann Jakl für ihre Hilfe und Unterstützung während der Arbeit an meiner Dissertation.

## 10. Veröffentlichungen

### A Originalarbeiten

Sabina Eigenbrod, Roland Derwand, **Veronika Jakl**, Stefan Endres, Andreas Eigler.  
Sphingosine kinase and sphingosine-1-phosphate regulate migration, endocytosis and apoptosis of dendritic cells  
*Immunological Investigations*, 2006;35(2):149-165

### B Vorträge

„Die Rolle von Sphingosin-1-Phosphat und Sphingosinkinase bei der Migration von dendritischen Zellen“. Gastroenterologisches Kolloquium, Medizinische Klinik Innenstadt, LMU München, Januar 2005

### C Abstracts und Poster

**Veronika Jakl**, Sabina Eigenbrod, Roland Derwand, Marc Dauer, Stefan Endres, Andreas Eigler.  
Sphingosine-kinase and sphingosine-1-phosphate regulate migration of immature dendritic cells.  
*2<sup>nd</sup> Cancer Immunotherapy Symposium*, Mainz, 2004, P 37  
*Cancer Cell International* 2004, 4(Suppl I):S56

**Veronika Jakl**, Sabina Eigenbrod, Marc Dauer, Max Schnurr, Roland Derwand, Stefan Endres, Andreas Eigler.  
Sphingosine-kinase and sphingosine-1-phosphate regulate migration of immature dendritic cells.  
*8<sup>th</sup> International Symposium on Dendritic Cells*, Brügge, 2004, P 420

## 11. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Vorname	Veronika Maria
Familienname	Jakl
Geburtsdatum	18.06.1982
Geburtsort	München
Nationalität	Deutsch

### Schulbildung

1988-1992	Grundschule Pullach
1992-2000	Staatliches Gymnasium Pullach
1997	Vorrücken von der 9. in die 11. Klasse
2000	Abitur mit der Note 1,0

### Studium

2000-2007	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
August 2002	Ärztliche Vorprüfung mit der Note 1,0
August 2003	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der Note 2,0
März 2006	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der Note 1,0
Mai 2007	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der Note 1,0

### Stipendien

2001-2007	Studienstiftung des deutschen Volkes
2003-2005	Promotionsstudium „Molekulare Medizin“ des Förderprogramms für Forschung und Lehre der Medizinischen Fakultät der LMU München
2006	PJ-Programm der München-Harvard-Allianz

### Praktisches Jahr

03.04.06 - 30.07.06	Innere Medizin, im Rahmen des PJ-Programms der München-Harvard-Allianz, Harvard Medical School Teaching Hospitals – Beth Israel Deaconess Medical Center und Mt. Auburn Hospital, Boston, MA, USA
07.08.06 – 26.11.06	Wahlfach Neurologie, Neurologische Klinik und Poliklinik, Klinikum Großhadern der LMU, München
27.11.06 – 18.03.07	Chirurgie, Chirurgische Klinik und Poliklinik, Klinikum Innenstadt der LMU, München

**Forschung**

2003-2006

Experimentelle Doktorarbeit im Rahmen des Promotionsstudiums „Molekulare Medizin“ des Förderprogramms für Forschung und Lehre der Medizinischen Fakultät der LMU München in der Arbeitsgruppe „Gastroenterologische Immuntherapie“ unter der Leitung von Herrn PD Dr. Andreas Eigler, Abteilung für Klinische Pharmakologie, Medizinische Klinik Innenstadt, Klinikum der Universität München

**Klinische Tätigkeit**

seit Juni 2007

Assistenzärztin in der Neurologischen Klinik und Poliklinik, Klinikum Großhadern der LMU, München