

Tierärztliche Hochschule Hannover

**Die Rolle des Sphingosin-1-Phosphats  
in der Pathogenese  
allergisch-entzündlicher Hauterkrankungen**

INAUGURAL – DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades einer Doktorin  
der Veterinärmedizin  
- Doctor medicinae veterinariae -  
( Dr. med. vet. )

vorgelegt von

**Ilka Reines**

Aurich

Hannover 2009

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. Wolfgang Bäumer, Institut für  
Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Bäumer

2. Gutachter: Prof. Dr. M. Hewicker-Trautwein

Tag der mündlichen Prüfung: 18.05.2009

Die Arbeit wurde durch ein Promotionsstipendium der **Wilhelm Schaumann-Stiftung** gefördert.

**Meinen lieben Freunden  
gewidmet**



<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>13</b>
<b>2 LITERATURÜBERSICHT</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1 Aufbau und Funktion der Haut</b> .....	<b>15</b>
2.1.1 Epidermis .....	15
2.1.2 Dermis .....	17
2.1.3 Hypodermis .....	18
<b>2.2 Dendritische Zellen</b> .....	<b>18</b>
2.2.1 Herkunft, Entwicklung und Subtypen dendritischer Zellen .....	19
2.2.2 Langerhans-Zellen und interstitielle DC.....	21
<b>2.3 Sphingosin-1-Phosphat (S1P)</b> .....	<b>22</b>
2.3.1 Struktur, Vorkommen sowie Synthese und Abbau von S1P.....	22
2.3.2 S1P-Rezeptoren und rezeptorvermittelte Signaltransduktion.....	24
2.3.2.1 Der S1P1-Rezeptor .....	27
2.3.2.2 Der S1P2-Rezeptor .....	27
2.3.2.3 Der S1P3-Rezeptor .....	28
2.3.2.4 Der S1P4-Rezeptor .....	28
2.3.2.5 Der S1P5-Rezeptor .....	29
2.3.3 Biologische Funktionen von S1P .....	29
2.3.4 S1P-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten .....	31
2.3.5 Wirkung der S1P-Rezeptor-Agonisten auf dendritische Zellen und Keratinozyten .....	35
<b>2.4 Allergisch-entzündliche Hauterkrankungen</b> .....	<b>38</b>
2.4.1 Atopische Dermatitis .....	38
2.4.2 Allergische Kontaktdermatitis .....	41
2.4.3 Sensibilisierung .....	42
2.4.3.1 Antigenaufnahme und DC-Migration .....	43
2.4.3.2 Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung .....	44
2.4.3.3 Differenzierung von Th1- und Th2-Zellen.....	45
2.4.4 Challenge .....	46
2.4.5 TDI-Kontaktallergiemodell.....	47

<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>49</b>
<b>3.1 Geräte und Reagenzien</b> .....	<b>49</b>
3.1.1 Geräte für Versuche in der Zellkultur .....	49
3.1.2 Reagenzien für Versuche in der Zellkultur.....	49
3.1.3 Testsubstanzen.....	50
3.1.4 Geräte/Reagenzien für ELISA .....	51
<b>3.2 Geräte und Reagenzien für <i>In-vivo</i>-Versuche</b> .....	<b>51</b>
3.2.1 Geräte für FACS-Analyse .....	52
3.2.2 Reagenzien für FACS-Analyse .....	52
3.2.3 Geräte für Immunhistochemie.....	52
3.2.4 Reagenzien für Immunhistochemie .....	52
3.2.5 Geräte/Reagenzien für Proteinextraktion.....	53
3.2.6 Geräte für Histologie .....	53
3.2.7 Reagenzien für Histologie.....	53
3.2.8 Geräte für Blutuntersuchungen.....	54
3.2.9 Hergestellte Puffer und Lösungen .....	54
3.2.10 Versuchstiere .....	56
<b>3.3 Versuchsübersicht</b> .....	<b>57</b>
<b>3.4 <i>In-vivo</i>-Versuche</b> .....	<b>58</b>
3.4.1 TDI-Kontaktallergiemodell.....	58
3.4.2 Untersuchungen zur Migration dendritischer Zellen im TDI-Kontaktallergiemodell.....	59
3.4.2.1 Sensibilisierung.....	59
3.4.2.2 Challenge.....	60
3.4.3 <i>Mouse-Ear-Swelling-Test</i> (MEST) .....	61
3.4.4 <i>Local-Lymph-Node-Assay</i> (LLNA) .....	62
3.4.4.1 <i>In-vitro</i> -Stimulierung der Lymphknoten-Zellen mit Concanavalin A .....	62
3.4.5 <i>Skin-DC-Migration-Assay</i> .....	63
3.4.6 <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> (FACS).....	64
3.4.7 Immunhistochemische Darstellung von MHC-II <sup>+</sup> -Zellen .....	65
3.4.8 Immunhistochemische Darstellung von CD3 <sup>+</sup> - und GR-1 <sup>+</sup> -Zellen .....	66
3.4.9 Proteinextraktion .....	66
3.4.10 Bestimmung der IL-6-, IFN- $\gamma$ und IL-1 $\beta$ -Konzentration mittels ELISA .....	66
3.4.11 Histologie .....	67
3.4.12 Bestimmung der Blutplasmakonzentration von S1P.....	67

3.4.13 Bestimmung der Anzahl an weißen Blutkörperchen und Lymphozyten im Blut .....	68
<b>3.5 In-vitro-Versuche .....</b>	<b>69</b>
3.5.1 Migrations-Assay.....	69
3.5.2 Kultivierung von Primärzellreihen caniner Keratinozyten .....	71
3.5.2.1 Isolierung der Zellen aus Hautproben .....	71
3.5.2.2 Subkultivierung .....	72
3.5.2.3 Lagerung caniner Keratinozyten.....	73
3.5.3 Stimulation muriner und caniner Keratinozyten mit <i>Toll-like</i> -Rezeptor-Agonisten.....	73
3.5.4 Bestimmung der IL-8- bzw. der KC-Konzentration in Zellkulturüberständen mittels ELISA....	75
3.5.5 Statistische Auswertung.....	75
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>76</b>
<b>4.1 Ergebnisse der <i>In-vivo</i>-Versuche .....</b>	<b>76</b>
4.1.1 Einfluss der Testsubstanzen in der Sensibilisierungsphase.....	76
4.1.1.1 Ergebnis des <i>Mouse-Ear-Swelling-Tests</i> .....	76
4.1.1.2 Blutplasmakonzentration von S1P nach topischer Applikation .....	76
4.1.1.3 Einfluss der Testsubstanzen auf die Anzahl an weißen Blutkörperchen und Lymphozyten im Blut .....	77
4.1.1.4 Ergebnis des <i>Local-Lymph-Node-Assays</i> .....	78
4.1.1.4.1 Einfluss der Testsubstanzen auf das Lymphknotengewicht und die Zellzahl.....	78
4.1.1.4.2 Einfluss der Testsubstanzen auf den Anteil der CD 11c <sup>+</sup> - und CD 40 <sup>+</sup> -Zellen im Lymphknoten .....	80
4.1.1.4.3 Einfluss der Testsubstanzen auf die Zytokinproduktion.....	82
4.1.1.5 Ergebnis des <i>Skin-DC-Migration-Assays</i> .....	83
4.1.1.6 MHC-II <sup>+</sup> -Zellen in der Epidermis .....	84
4.1.2 Einfluss der Testsubstanzen in der Challengephase.....	86
4.1.2.1 Ergebnis des <i>Mouse-Ear-Swelling-Tests</i> .....	86
4.1.2.2 Ergebnis des <i>Local-Lymph-Node-Assays</i> .....	88
4.1.2.2.1 Einfluss der Testsubstanzen auf das Lymphknotengewicht und die Zellzahl.....	88
4.1.2.2.2 Einfluss von S1P auf die Zytokinproduktion.....	90
4.1.2.3 Ergebnis des <i>Skin-DC-Migration-Assays</i> .....	91
4.1.2.4 MHC-II <sup>+</sup> -Zellen im Mausohr .....	92
4.1.2.5 CD3 <sup>+</sup> - und GR-1 <sup>+</sup> -Zellen im Mausohr .....	93
4.1.2.6 Ergebnis der histologischen Untersuchung .....	96
4.1.2.7 Einfluss von S1P auf die IL-1 $\beta$ -Konzentration in der Haut .....	97

<b>4.2 Ergebnisse der <i>In-vitro</i>-Versuche</b> .....	<b>98</b>
4.2.1 Einfluss von W146 und VPC23019 auf die Migration dendritischer Zellen im Migrations-Assay .....	98
4.2.2 Einfluss von S1P und FTY720 auf die Zytokinproduktion muriner und caniner Keratinozyten	99
4.2.2.1 Einfluss von S1P auf die KC-Sekretion muriner Keratinozyten.....	99
4.2.2.2 Einfluss der Testsubstanzen auf die IL-8-Sekretion normaler caniner Keratinozyten....	101
4.2.2.2.1 Einfluss von S1P .....	101
4.2.2.2.2 Einfluss von FTY720 .....	102
4.2.2.3 Einfluss der Testsubstanzen auf die IL-8-Sekretion atopischer caniner Keratinozyten .	103
4.2.2.3.1 Einfluss von S1P .....	103
4.2.2.3.2 Einfluss von FTY720 .....	104
<b>4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse</b> .....	<b>105</b>
<b>5 DISKUSSION</b> .....	<b>107</b>
5.1 Wirkung der Testsubstanzen in der Sensibilisierung .....	108
5.2 Wirkung der Testsubstanzen in der Challenge .....	114
5.3 Wirkung der Testsubstanzen auf die Zytokinsekretion stimulierter Keratinozyten <i>in vitro</i>	117
5.4 Schlussfolgerung und Ausblick .....	119
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>121</b>
<b>7 SUMMARY</b> .....	<b>124</b>
<b>8 LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>126</b>
<b>9 ANHANG</b> .....	<b>157</b>
9.1 Anhangstabellen.....	157
9.2 Veröffentlichungen.....	171
9.2.1 Tagungsposter .....	171
9.2.2 Zeitschriftenartikel .....	171



## Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatcyclase
AD	Atopische Dermatitis
ACD	Allergische Kontaktdermatitis
Ag	Antigen
APAAP	Alkaline Phosphatase Anti-Alkaline Phosphatase
APC	Antigenpräsentierende Zelle(n)
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CCR7	CC-Chemokinrezeptor 7
CD	Cluster of Differentiation
CK	Canine Keratinozyten
CLP	Common lymphoid progenitor
CMP	Common myeloid progenitor
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
ConA	Concanavalin A
DAG	Diacylglycerol
DC	Dendritische Zelle(n)
DNFB	Dinitrofluorbenzen
EC <sub>50</sub>	Effective Concentration 50%
Edg	Endothelial differentiation gene
EGF	Epithelial growth factor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular-regulated kinase
et al.	et alii, und Andere
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting

FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FLT-3	Fms-like-tyrosinkinase-3-Ligand
FTY720-P	FTY720-Phosphat
g	Gramm oder Erdschwerebeschleunigung
ggr.	Geringgradig
GK	Gewebekultur
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
hgr.	Hochgradig
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IDEC	Inflammatorische dendritische epidermale Zellen
i.e.	id est. lat.: das ist
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
imDC	immature Dendritische Zelle(n)
i.p.	Intraperitoneal
IP3	Inositoltriphosphat
KC	murines IL-8-Homolog
KCl	Kaliumchlorid
Kd	Dissoziationskonstante
kD	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
kg	Kilogramm
LC	Langerhans-Zelle(n)
LFA	Leucocyte function associated antigen
LPS	Lipopolysaccharid

Ln./Lnn.	Lymphonodus, Lymphknoten
LLNA	Local-Lymph-Node-Assay
MAP	Mitogen activated protein
MCK	Murine Keratinozyten
mDC	mature Dendritische Zelle(n)
MEST	Mouse-Ear-Swelling-Test
mg	Milligramm
MHC	Major-Histocompatibility-Complex
ml	Milliliter
MIP-3 $\beta$	Macrophage-inflammatory-protein-3- $\beta$
MMP-9	Matrix Metalloproteinase-9
MoDC	Monocyte derived dendritic cells
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Versuche
ng	Nanogramm
NaCl	Natriumchlorid
Nmol	Nanomol
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PGN	Peptidoglykan
PI3	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PTX	Pertussis-Toxin
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1P1-5	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor(en)1-5
s.c.	Subcutan

S.D.	Standardabweichung
SLC	Secondary lymphoid tissue chemokine
SphK	Sphingosinkinase
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
TDI	Toluene-2,4,-diisocyanate
Th	T-Helferzelle
TLR	Toll-like-Receptor
TMA	Trimellitanhydrid
TMB	Tetramethylbenzidine
TNCB	Trinitrochlorobenzene
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
TNP	Trinitrophenyl
WBC	Weiße Blutkörperchen

## 1 Einleitung

Das Lysophospholipid Sphingosin-1-Phosphat (S1P) ist ein wichtiger Lipidmediator mit einer Vielzahl von zum Teil gegensätzlichen zellulären Wirkungen. Die Bedeutung von S1P in der Immunzellregulation wurde mit der Entdeckung der Wirkung des Immunsuppressivums FTY720, einem synthetischen Strukturanalogon von Sphingosin, deutlich. FTY720-Phosphat verursacht über S1P-Signale eine Lymphopenie, führt allerdings im Gegensatz zu klassischen Immunsuppressiva nicht zu einer Beeinträchtigung der T-Zellproliferation und zur Apoptose (MANDALA et al. 2002). Es konnte nachgewiesen werden, dass S1P sowohl extrazellulär über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (S1P1-S1P5) als auch über intrazellulär vermittelte Effekte an der Regulation von Migration, Chemotaxis, Wachstum und Lebensdauer unterschiedlicher Zelltypen maßgeblich beteiligt ist. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde beschrieben, dass die lokale Applikation von S1P oder FTY720 die Wanderung von DC aus der Lunge und somit die Ausbildung von experimentell ausgelöstem Asthma verhindern kann (IDZKO et al. 2006). Die Rolle von S1P und FTY720 bei allergischen Hauterkrankungen wie der atopischen Dermatitis ist jedoch noch nicht hinreichend geklärt. Es ist eingehend beschrieben worden, dass einige zentrale Funktionen dendritischer Zellen, wie Migration und Zytokinsekretion, von S1P und FTY720 moduliert werden können (RENKL et al. 2004; MÜLLER et al. 2005). Dendritische Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der zellvermittelten und humoralen Immunantwort und somit auch bei der Initiierung und Auslösung von allergischen Erkrankungen. Sie werden als antigenpräsentierende Zellen bezeichnet und haben die Fähigkeit, eindringende Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und im drainierenden Lymphknoten antigenspezifische T-Zellen zu aktivieren. Es konnte nachgewiesen werden, dass die mRNA für die Rezeptoren S1P1, S1P2, S1P3 und S1P4 auf der murinen Langerhans-Zell-Linie XS52 exprimiert wird. Diese Daten konnten durch eine Studie über unreife und reife murine Knochenmark-DC bestätigt werden. Es wurde jedoch gezeigt, dass nur S1P1- und S1P3-Rezeptoren in die S1P-induzierte Chemotaxis involviert sind (CZELOTH et al. 2005; RADEKE et al. 2005). Die vorliegende Studie wird durchgeführt, um die Auswirkungen von topisch

verabreichtem S1P, FTY720 und dem selektiven S1P1-Agonisten SEW2871 auf die dendritische Zellmigration in der Induktionsphase, sowie auf die entzündliche Reaktion in der Auslösephase in einem Kontaktallergiemodell der Maus zu prüfen. Zusätzlich wird die Wirkung der Testsubstanzen *in vitro* an dendritischen Zellen und Keratinozyten untersucht. *In vivo* werden die Substanzen an BALB/c Mäusen im Modell der Toluene-2,4,-diisocyanat-induzierten allergischen Kontaktdermatitis getestet, wobei die allergische Reaktion an den Mausohren ausgelöst wird (Ohrschwellung). Wichtige Parameter sind dabei die Inhibition der Entzündung, die Migration der DC sowie das Gewicht und die Zellzahl der regionalen Lymphknoten, um auf die DC-induzierte T-Zellproliferation schließen zu können. Über die Migration der DC aus der Haut geben der *Skin-DC-Migration-Assay*, die Anzahl der MHC-II<sup>+</sup>-Zellen in der Epidermis sowie die in der FACS-Analyse ermittelte Verteilung der CD 11c<sup>+</sup>- und CD 40<sup>+</sup>-Zellen im regionären Lymphknoten Aufschluss. Zusätzlich wird mit *in vitro* aus dem Knochenmark von Mäusen generierten DC die Wirkung der S1P-Antagonisten W146 (S1P1) und VPC23019 (S1P1/S1P3) auf die DC-Migration untersucht. Da der erste Kontakt mit einem Hapten über die Keratinozyten stattfindet, werden die Wirkungen von S1P und FTY720 auf die Funktion muriner und caniner Keratinozyten überprüft. Die Zellen werden mit den S1P-Rezeptor-Agonisten inkubiert und anschließend mit Lipopolysaccharid (LPS) und Peptidoglykan (PGN) stimuliert. Die Kulturüberstände werden auf eine Hemmung der LPS- bzw. PGN-stimulierten Zytokinproduktion untersucht.

## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Aufbau und Funktion der Haut**

Die Haut bildet als äußere Körperbedeckung sowohl eine schützende Grenzfläche als auch eine breite Kontaktfläche zur Außenwelt. Sie erfüllt wesentliche Aufgaben als Sinnesorgan, bietet Schutz vor chemischen und physikalischen Einwirkungen sowie Krankheitserregern, regelt den Wärmehaushalt des Körpers und spielt eine wichtige Rolle bei Stoffwechselprozessen. Ferner dient die Haut durch das Fettgewebe in der Unterhaut als Energiespeicher und durch die Einlagerung von Immunzellen als immunologische Barriere. Die äußere Haut der Säugetiere ist in drei Schichten unterteilt: Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut) und Hypodermis (Unterhaut) (LIEBICH et al. 1999).

#### **2.1.1 Epidermis**

Die Epidermis bildet als mehrschichtiges, an der Oberfläche verhorntes Plattenepithel die äußerste Grenzschicht der Haut. Die Keratinozyten machen neben Langerhans-Zellen, Lymphozyten, Melanozyten und Merkelzellen den Hauptanteil der Epidermis aus. Während der Migration der Keratinozyten von der Epithelbasis zur Oberfläche verändern diese ihre Morphologie und Funktion und verhornen schließlich. Aufgrund dessen unterteilt sich die Epidermis in fünf verschiedene Schichten (FRITSCH 2004). Alle Zellschichten sind untereinander durch sogenannte Desmosomen fest verbunden. Die oberen Schichten bilden die eigentliche Schutzschicht der Haut, während in den tieferen Zellschichten die zyklische Erneuerung der Keratinozyten gesichert wird.

Das Stratum basale (Basalschicht) ist die unterste Schicht der Epidermis, welche gut mit Nährstoffen versorgt ist. Es besteht aus iso- bis hochprismatischen Zellen, die durch Hemidesmosomen fest mit der Basalmembran und somit auch mit der Dermis verbunden sind (RICHTER u. LINSS 1998). Im Stratum basale beginnt die Neubildung der Keratinozyten aus den Stammzellen durch Mitose, wobei Zellgewinn im Gleichgewicht mit Zellverlust steht (FRITSCH 2004).

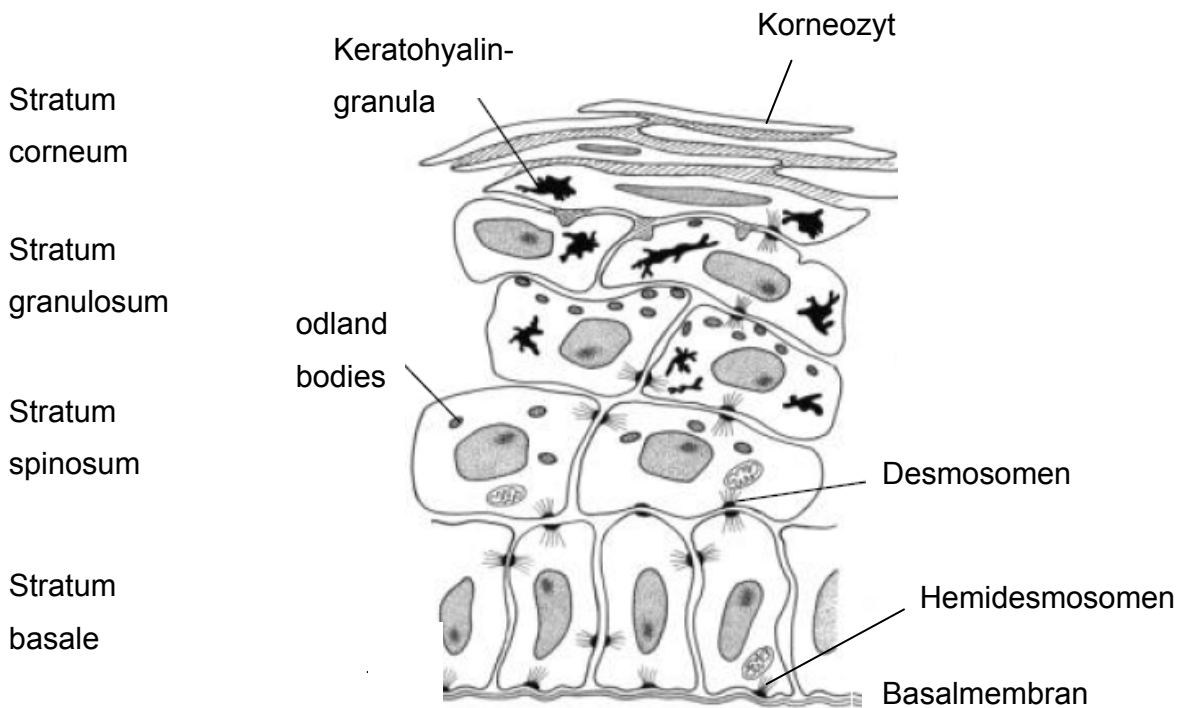
Das Stratum spinosum (Stachelzellschicht) ist durch große, polygonale Keratinozyten charakterisiert, die am Übergang zum Stratum granulosum weiter abflachen und durch stachelförmige Fortsätze über Desmosomen miteinander verbunden sind (LEONHARD 1990). Hier beginnt die Keratinisierung der Zellen, vereinzelt können auch noch Mitosen stattfinden (LIEBICH et al. 1999). Im oberen Stratum spinosum befinden sich kleine Zellorganellen, die sogenannten „*odland bodies*“ (Synonyme: Keratinosomen, *lamellar bodies*), welche Lipide (Ceramide, Cholesterinsulfat) und Enzyme enthalten.

Im Stratum granulosum (Körnerzellschicht) beginnt die Abflachung der Keratinozyten sowie die Degeneration der Zellkerne und Zellorganellen. Weiterhin kommt es zur Dehydrierung sowie zur Bildung einer stabilen Membran um die keratinisierten Keratinozyten („*cornified envelope*“) und schließlich zur Verhornung. Die Zellen werden starr und in einer streng geometrischen („*brick and mortar model*“) Anordnung aneinander fixiert (FRITSCH 2004). Durch die in die Keratinozyten eingelagerte basophile Keratohyalin granula erscheint diese Hautschicht lichtmikroskopisch körnig.

Das Stratum lucidum (Glanzschicht) ist als eigenständige Schicht nur in Epidermisschnitten stark verhornter Hautpartien (z.B. Fußsohle) ausgebildet und verbindet das Stratum granulosum mit dem Stratum corneum.

Die äußerste Schicht ist das Stratum corneum (Hornschicht), welche sich etwa alle zwei bis drei Wochen erneuert. Sie besteht aus 10 - 20 Zelllagen abgestorbener Korneozyten, deren Überreste ein verhorntes Plattenepithel aus Keratin bilden. An der Oberfläche lösen sich die flachen Hornzellen aus dem Epithelverband und schilfern ab (LIEBICH et al. 1999).





**Abbildung 2-1: Schematischer Aufbau der Epidermis** nach FRITSCH (2004)

### 2.1.2 Dermis

Die Dermis (Lederhaut) stellt ein Bindegewebe zwischen der Epidermis und der Unterhaut dar und wird von Nerven, Blutgefäßen und Lymphbahnen durchzogen. Die Dermis übernimmt wichtige biologische Funktionen wie die Versorgung der Epidermis und die Bereitstellung von Immunzellen. Sie wird in zwei Schichten unterteilt, das dünne Stratum papillare und das dickere Stratum reticulare (SMOLLE 1998). Das subepidermale Stratum papillare ist aus lockerem Bindegewebe zusammengesetzt und zell- und gefäßreich. Es ist mit der Epidermis über fingerförmige, papillenartige Verzahnungen, dem sogenannten Papillarkörper verbunden und verleiht den äußeren Hautschichten die mechanische Festigkeit (RICHTER u. LINSS 1998; SMOLLE 1998). Das tiefer liegende Stratum reticulare ist faserreich und zellarm. Es stellt ein Netz aus kollagenen und elastischen Fasern dar und ist für die hohe Zugfestigkeit und Plastizität der Haut verantwortlich (LIEBICH et al. 1999).

### **2.1.3 Hypodermis**

Die Hypodermis ist ein lockeres Bindegewebe, welches hauptsächlich aus Fettzellen besteht. Es verbindet die Haut verschieblich mit den tiefer liegenden Faszien, Muskeln oder Knochen. Die Funktion der Unterhaut liegt in der Speicherung von Wasser und Nährstoffen, dem Kälteschutz und dem Schutz vor mechanischen Einwirkungen (LIEBICH et al. 1999).

## **2.2 Dendritische Zellen**

Dendritische Zellen (DC, *dendritic cells*) wurden bereits 1868 von Paul Langerhans in der Epidermis der Haut entdeckt und als Langerhans-Zellen (LC, *langerhans cells*) bezeichnet (LANGERHANS 1868). Sie wurden anfangs jedoch für Zellen des Nervensystems gehalten und die wirkliche Funktion dieser Zellen blieb lange unbekannt. Dendritische Zellen in ihrer heutigen Funktion und Bedeutung wurden erstmals 1973 von Steinmann und Cohn in der Milz von Mäusen beschrieben (STEINMANN u. COHN 1973) und konnten bald darauf mit den bereits entdeckten LC ein und demselben Zellsystem zugeordnet werden. Benannt wurden die DC nach ihren baumartig verzweigten Zytoplasmafortsätzen (griechisch: dendron = der Baum). Dendritische Zellen kommen in allen lymphatischen, aber auch in nahezu allen nicht lymphatischen Geweben von Säugetieren vor und erfüllen hier ihre lebenswichtige Aufgabe (HART u. FABRE 1981). Neben Makrophagen und B-Lymphozyten zählen DC zu den antigenpräsentierenden Zellen (APC, *antigen presenting cells*) des Immunsystems und nehmen eine zentrale Rolle in der Induktion der Immunantwort ein (BANCHEREAU u. STEINMAN 1998). Sie werden oft als Wächter des Organismus bezeichnet, da sie Fremdantigene aufnehmen, prozessieren und anschließend im regionalen Lymphknoten den T-Zellen das Antigen präsentieren, um dort die Immunantwort zu induzieren.

### 2.2.1 Herkunft, Entwicklung und Subtypen dendritischer Zellen

Bei dendritischen Zellen handelt es sich um eine sehr heterogene Gruppe von Zellen, welche sich in ihrer anatomischen Lokalisation, ihrer Expression unterschiedlicher Oberflächenmoleküle und in ihrer Funktion voneinander unterscheiden (SHORTMAN 2000; LIPSCOMB u. MASTEN 2002). Unreife DC (sogenannte *progenitor* DC) entwickeln sich kontinuierlich aus hämatopoetischen Stammzellen (CD34<sup>+</sup>) des Knochenmarks. Für die Entwicklung und Differenzierung humaner DC sind der *fms-like-tyrosinkinase-3*-Ligand (FLT-3) und GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) von entscheidender Bedeutung (PULENDRAN et al. 2001; BJÖRCK 2001). Unter deren Einfluss differenzieren aus den CD34<sup>+</sup>-hämatopoetischen Stammzellen einerseits *common lymphoid progenitors* (CLP) und andererseits *common myeloid progenitors* (CMP), welche den Ausgangspunkt für die verschiedenen DC-Subtypen darstellen. Noch im Knochenmark bilden sich aus den humanen CMP-Vorläufern CD34<sup>+</sup>CLA<sup>+</sup> (*cutaneous lymphocyte antigen*) und CD34<sup>+</sup>CLA<sup>-</sup> Vorläufer aus, welche sich wiederum zu CD11c<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup> und CD11c<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> immature DC (imDC) weiterentwickeln (STRUNK et al. 1997). Es existieren vier verschiedene Subtypen von DC: epitheliale, interstitielle, Monozyten-abgeleitete und plasmazytoide DC. Die epithelialen DC (CD11c<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup>) wandern als immature LC in die Epidermis, während die CD11c<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> immature DC als interstitielle DC die Dermis und andere Gewebe besiedeln (CAUX et al. 2000). Die interstitiellen DC kommen in fast allen Organen vor (z.B. Herz, Leber, Niere, Pankreas, Darm, Haut, Urogenitaltrakt und Schilddrüse) (HART u. FABRE 1981). Aus den hämatopoetischen Stammzellen entwickeln sich noch zwei weitere DC-Vorläuferformen: Monozyten-abgeleitete (pre-DC1) und plasmazytoide DC (pre-DC2). CMP dienen dabei den Monozyten und CLP den plasmazytoiden DC als Vorläuferzellen. Die Monozyten entwickeln sich *in vitro* unter Einfluss von GM-CSF und IL-4 zu DC (MoDC, *monocyte derived dendritic cells*) (AKAGAWA et al. 1996). Die plasmazytoiden DC, welche sich unter Einfluss von IL-3 zu immaturren DC (imDC2) entwickeln, findet man vorwiegend in der T-Zell-Region der lymphatischen Organe (LIU 2001). Da sie in der Lage sind, große Mengen an

IFN- $\alpha$  auszuschütten, wird ihnen eine zentrale Rolle bei der Abwehr von Viren zugeschrieben (CELLA et al. 1999).

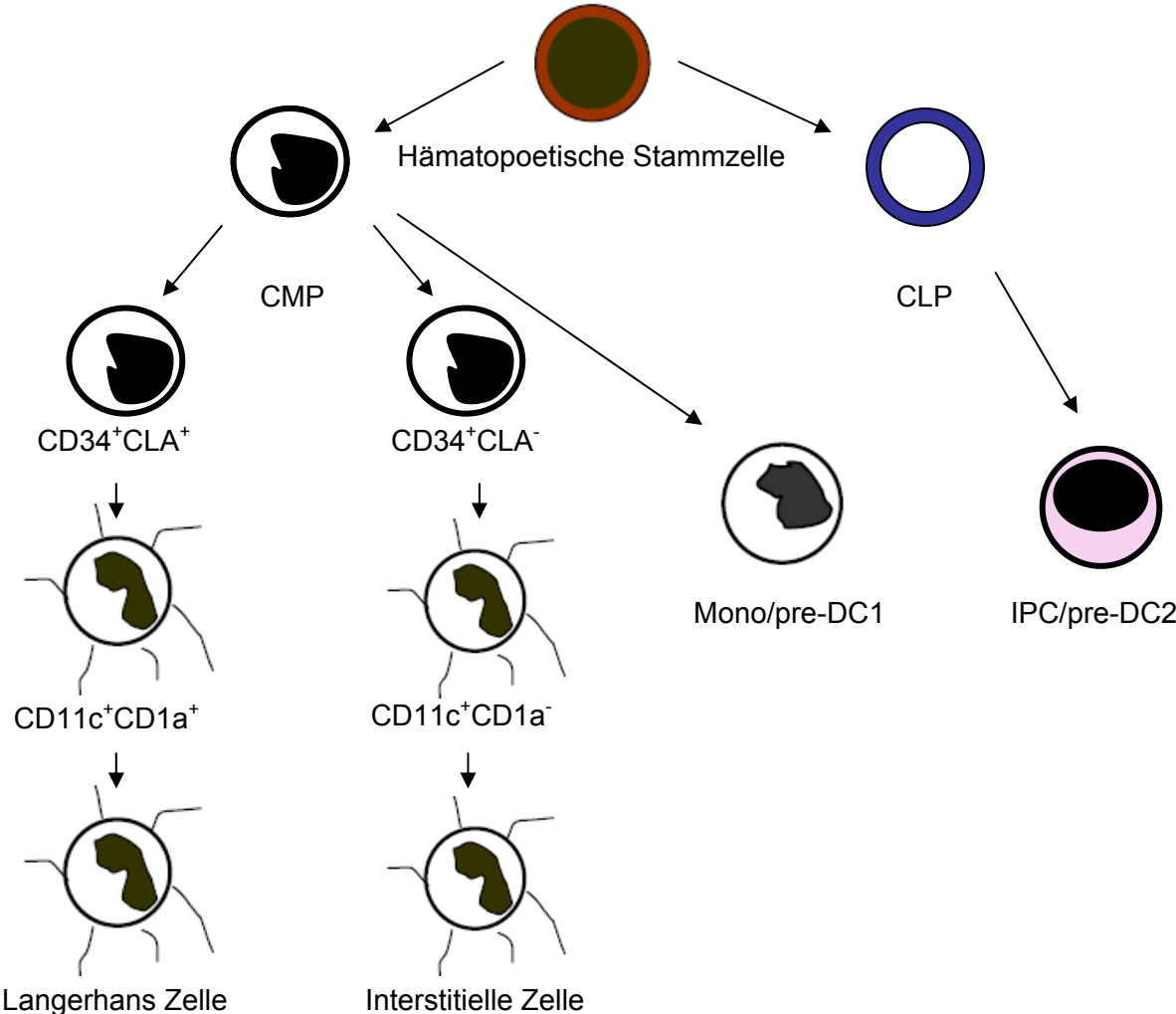


Abbildung 2-2: Entwicklung humaner dendritischer Zellen nach LIU (2001)

### 2.2.2 Langerhans-Zellen und interstitielle DC

In der Epidermis und Dermis der Haut sind epitheliale DC, welche als Langerhans-Zellen (LC) bezeichnet werden und interstitielle oder auch dermale DC vertreten (ROMANI et al. 2003). Der Anteil der LC an allen Zellen der nicht entzündlich veränderten Epidermis beträgt lediglich 1-2 %. In entzündlich veränderter Haut von Menschen sind CD1a-positive Zellen epidermal mit bis zu 5 % vertreten. Charakteristisch für die LC sind die spezifische Expression des Langerin/CD207-Rezeptors sowie die Präsenz der sogenannten Birbeck-Granula. Die Funktion der Birbeck-Granula ist unklar, sie stellen wahrscheinlich eine Art Phagosom dar und sind an der Antigenpräsentierung beteiligt (JANEWAY u. TRAVERS 2001). Da sie ausschließlich in Langerhans-Zellen vorkommen, lassen sich diese in der Haut gut identifizieren und von anderen Zellarten unterscheiden. Der Langerin/CD207-Rezeptor ist für die Antigenbindung und Migration wichtig. Bei dem Langerin/CD207-Molekül handelt es sich um ein Mannose-spezifisches Typ-C-Lektin. Neben der Expression als Zelloberflächenmolekül wird es auch intrazellulär synthetisiert, wobei die intrazelluläre Expression stark an das Vorhandensein von Birbeck-Granula gekoppelt ist (ROMANI et al. 2003). Die dermalen DC exprimieren den C-Typ-Lektin-Rezeptor DC-SIGN/CD209, dieser bindet ICAM-3 und führt zur Stabilisation der DC/T-Zell-Kontaktzone. LC und dermale DC bilden eine wichtige zelluläre Komponente der Haut, indem sie nach Antigenkontakt über die Blut- oder Lymphgefäße in die drainierenden Lymphknoten wandern, wo sie zu mDC differenzieren und durch Präsentation des Antigens an naive T-Zellen die spezifische Immunantwort einleiten. Die immaturren LC und immaturren interstitiellen DC sind auch fähig, antigenunabhängig zu migrieren (*steady state*). Wurden sie nicht durch eine Infektion aktiviert, wandert ein Teil von ihnen ebenfalls in die Lymphknoten und präsentiert dort körpereigene Antigene von apoptotischen Zellen (STEINMAN et al. 2000). Somit findet kontinuierlich ein geringer Austausch der dendritischen Zellen in der Haut statt (MERAD et al. 2002). Diese DC werden als semi-maturierte DC, also DC die nicht vollständig gereift sind, bezeichnet. Sie unterscheiden sich von den maturierten DC durch die geringe Expression von kostimulatorischen Molekülen. Im Lymphknoten erkennen die naiven CD4<sup>+</sup>- und

CD8<sup>+</sup>-T-Zellen das präsentierte Antigen als körpereigen und entwickeln sich zu IL-10 produzierenden regulatorischen T-Zellen (TREG), welche eine Toleranz gegen die präsentierten Autoantigene vermitteln (STEINBRINK et al. 1997; STEINMAN et al. 2000).

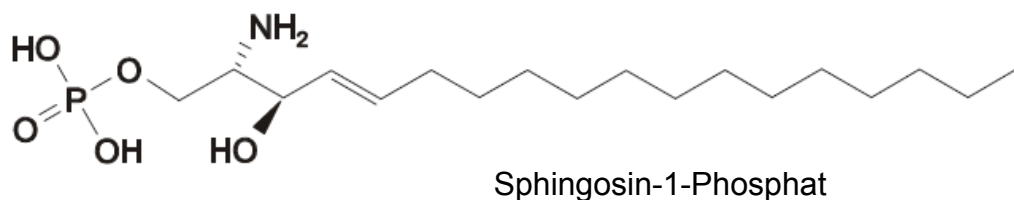
## **2.3 Sphingosin-1-Phosphat (S1P)**

### **2.3.1 Struktur, Vorkommen sowie Synthese und Abbau von S1P**

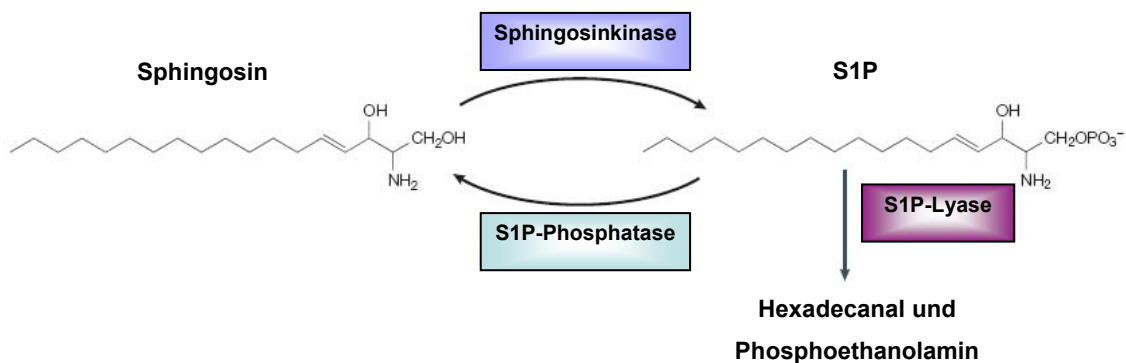
Das Lysophospholipid Sphingosin-1-Phosphat (S1P) besteht aus dem langkettigen Aminoalkohol Sphingosin, dessen freie OH-Gruppe mit Phosphorsäure verestert ist. Abbildung 2-3 zeigt die Strukturformel von S1P. Im Serum ist S1P hauptsächlich in Albumin-gebundener Form in Konzentrationen von bis zu 0,5 µM vorhanden, im Plasma ist die Konzentration etwa halb so hoch (YATOMI et al. 1997; RUWISCH et al. 2001). In lymphatischen Geweben ist die Konzentration von S1P deutlich geringer als im Blut. Dieser Konzentrationsgradient ist für die Steuerung immunologischer Prozesse von Bedeutung. S1P wird vor allem von aktivierten Thrombozyten gebildet und freigesetzt (YATOMI et al. 1995). Auch andere Zellen wie Mastzellen und Monozyten bilden, wenn sie von extrazellulären Stimulantien wie Wachstumsfaktoren oder Zytokinen aktiviert werden, geringe Mengen und sorgen für einen konstanten Level an S1P im Plasma (YANG et al. 1999). S1P entsteht aus Ceramid über das Zwischenprodukt Sphingosin. Die Bildung des benötigten Ceramids erfolgt entweder direkt durch *de novo* Biosynthese im endoplasmatischen Retikulum aus Palmitoyl-CoA und Serin (SABA u. HLA 2004) oder indirekt durch Hydrolyse von Membranlipiden. Dem letztgenannten Weg kommt eine weitaus größere Bedeutung zu. Hierbei wird Ceramid durch enzymatische Spaltung von gespeichertem Sphingomyelin aus Zellmembranen mit Hilfe verschiedener Sphingomyelinasen gewonnen (SPIEGEL u. MERRILL 1996). Die Ceramide werden durch Ceramidasen zu Sphingosin umgesetzt, welches durch die Sphingosinkinase (SphK) zu S1P phosphoryliert wird. Für die Sphingosinkinase sind bislang zwei Isoformen (SphK1 und SphK2) beschrieben worden (KOHAMA et al. 1998; LIU et al. 2000a). Der Abbau des S1P erfolgt in erster Linie durch die spezifische S1P-Lyase (PYNE u. PYNE

2000). Diese katalysiert die irreversible Spaltung des Sphingosin-1-Phosphats zu Hexadecanal und Phosphoethanolamin. Die S1P-Lyase wird in fast allen Geweben und Zellen mit Ausnahme der Thrombozyten exprimiert. Da Thrombozyten keine S1P-abbauenden Enzyme besitzen, akkumuliert S1P in den Blutplättchen und wird nach deren Aktivierung freigesetzt (YATOMI et al. 1995). Weiterhin erfolgt der Abbau von S1P durch die enzymatische Umsetzung von S1P zu Sphingosin durch die S1P-Phosphatase. Diese wird hauptsächlich in Leber und Niere gebildet und liegt vorzugsweise an Plasmamembranen assoziiert vor.

Die Sphingosinkinase bestimmt zusammen mit der S1P-Lyase das Verhältnis von Sphingosin bzw. Ceramid zu S1P. Dieses Verhältnis scheint entscheidend für das weitere Schicksal der Zelle zu sein. So hat S1P im Gegensatz zu Sphingosin und Ceramiden eher wachstumsfördernde und antiapoptotische Eigenschaften, während Ceramid inhibierend auf Zellwachstum und fördernd auf Apoptose-Prozesse wirkt (CUVILLIER et al. 1996).



**Abbildung 2-3: Strukturformel von Sphingosin-1-Phosphat**



**Abbildung 2-4: Vereinfachte Darstellung von Bildung und Abbau des S1P** nach SPIEGEL und MILSTIEN (2003)

### 2.3.2 S1P-Rezeptoren und rezeptorvermittelte Signaltransduktion

S1P vermittelt eine Vielzahl seiner Wirkungen über membranständige, G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Die Rezeptoren-Familie für Lysophospholipide wurde ursprünglich als Edg(*endothelial differentiation gene*)-Rezeptor-Familie bezeichnet (GOETZL u. AN 1998). Dieser Begriff leitet sich vom ersten Mitglied der Familie ab, das 1990 erstmals aus in der Differenzierungsphase befindlichen Endothelzellen der Nabelschnur isoliert werden konnte und daher *endothelial differentiation gene 1* (Edg1) genannt wurde (HLA u. MACIAG 1990).

Dieser erste von insgesamt fünf hochaffinen S1P-Rezeptoren wurde erst 1998 von LEE et al. (1998) als S1P-Rezeptor identifiziert. Insgesamt gehören zu der Familie der Edg-Rezeptoren acht Rezeptor-Subtypen, von denen Edg1, 3, 5, 6 und 8 S1P-Rezeptoren bilden. Die Rezeptoren Edg2, 4 und 7 werden durch die Lysophosphatidsäure (LPA) aktiviert (CHUN et al. 2002) und werden daher nicht näher erläutert. Die Abkürzung Edg hat lediglich einen direkten Bezug zum Edg1-Rezeptor und besitzt wenig Relevanz für die übrigen sieben Rezeptoren. Dementsprechend erfolgte nach den Empfehlungen der „International Union Of Pharmacology“ (IUPHAR) eine Umbenennung der Rezeptoren in S1P1-5 (CHUN et al. 2002), das entsprechende Schema ist Tabelle 2-1 zu entnehmen. Die vorliegende Arbeit richtet sich ebenfalls nach diesen Empfehlungen.



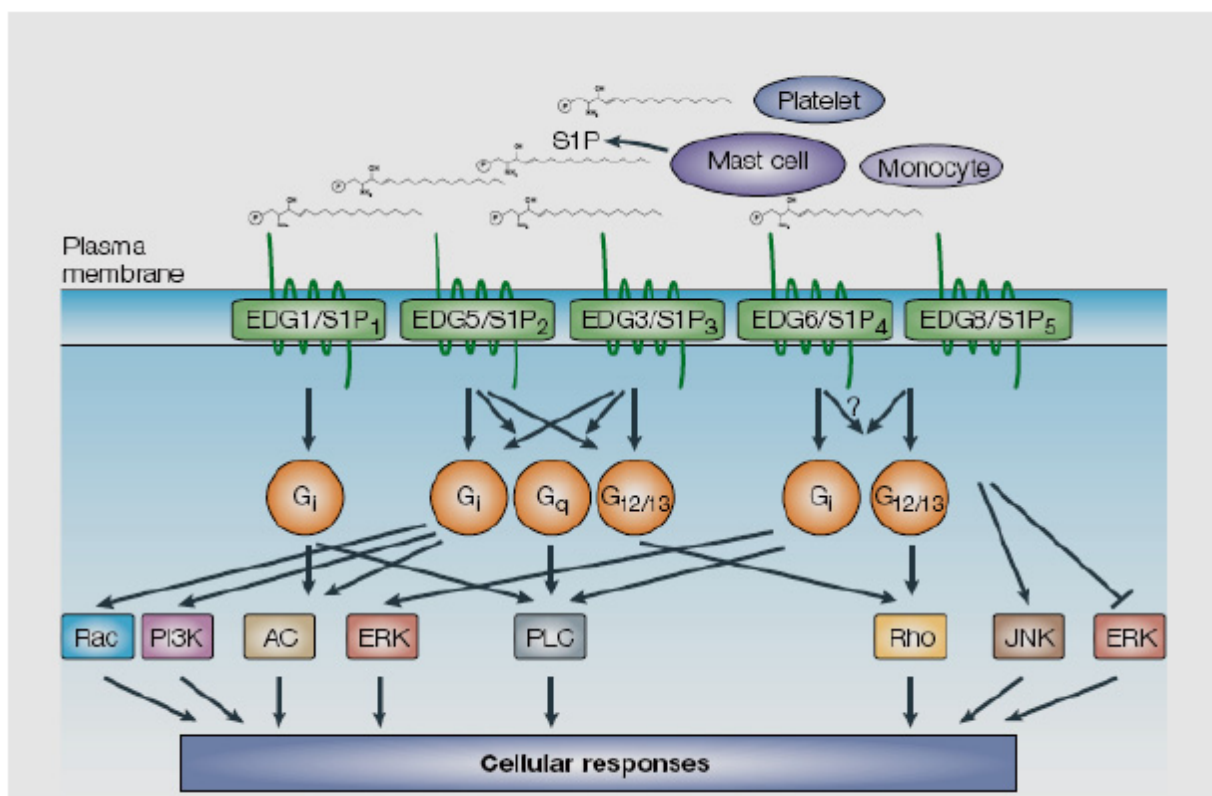
**Tabelle 2-1: Nomenklatur der Edg-/S1P-Rezeptoren**

Edg-Name	Edg1	Edg5	Edg3	Edg6	Edg8
IUPHAR Nomenklatur	S1P1	S1P2	S1P3	S1P4	S1P5

Die fünf S1P-Rezeptoren sind strukturverwandt und zeigen starke Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz. Sie werden zell- bzw. gewebespezifisch exprimiert und sind zudem an unterschiedliche Signalwege gekoppelt, so dass S1P in verschiedenen Geweben unterschiedliche Wirkungen hat.

Die S1P-Rezeptoren sind an G-Proteine aus der Familie der Pertussis-Toxin (PTX)-sensitiven  $G_i$ - und  $G_q$ -Proteine oder der Pertussis-Toxin-insensitiven  $G_{12/13}$ -Proteine gekoppelt. Den Rezeptoren sind vielfältige Signalwege nachgeschaltet, die z.B. über Ras/ERK zur Zellproliferation oder durch Rac und Rho zur Zellmigration führen (siehe Abbildung 2-5) (PYNE u. PYNE 2000; SIEHLER u. MANNING 2002; SPIEGEL u. MILSTIEN 2003). Nach SPIEGEL und MILSTIEN (2003) koppelt S1P1 über  $G_i$ , S1P2 und S1P3 über  $G_i$ ,  $G_q$  und  $G_{12/13}$  und S1P4 und S1P5 über  $G_i$  und  $G_{12/13}$ . Über die  $\alpha$ -Untereinheit des inhibitorischen G-Proteins  $G_i$  wird die Adenylatcyclase (AC) gehemmt, was zu einer Erniedrigung der intrazellulären cAMP-Konzentration und zur Inhibition der Proteinkinase A (PKA) führt. Dies bewirkt wiederum eine Steigerung von Zellwachstum und -proliferation (GOODEMOTE et al. 1995). Auch über die  $\beta\gamma$ -Untereinheit von  $G_i$  wird ein Signalweg aktiviert, der für die proliferationsfördernde Eigenschaft von S1P von Bedeutung ist. Es kommt zur Aktivierung des kleinen G-Proteins Ras und darüber zur Aktivierung der MAP (*mitogen activated protein*)-Kinase-Kaskade. Die MAP-Kinasen modulieren die Aktivität von Transkriptionsfaktoren und sind für Zellwachstum und -differenzierung von Bedeutung (SPIEGEL u. MERRILL 1996). An die Proteine  $G_i$  und  $G_q$  sind weitere Effektorsysteme gekoppelt, die für die Regulation der Zellproliferation wichtig sind. So wird über die  $\alpha$ -Untereinheit des  $G_q$ -Proteins die Phospholipase C (PLC) aktiviert,

welche die Bildung von Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP3) katalysiert. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC) und darüber ebenfalls die MAP-Kinase-Kaskade. IP3 vermittelt die Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus den Speichern des endoplasmatischen Retikulums und führt somit zur Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (ZHANG et al. 1991; GHOSH et al. 1994; GOETZL u. AN 1998; RADEFF-HUANG et al. 2004). Über das Protein  $\text{G}_{12/13}$  wird eine Aktivierung der kleinen GTPase Rho bewirkt. Rho führt zur Aktivierung der Phospholipase D (PLD) und der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3) und reguliert die Aktivierung der ERK(*extracellular-regulated kinase*)/MAP-Kinase.  $\text{G}_{12/13}$  nimmt Einfluss auf die Transkription und reguliert Zytoskelettveränderungen (FROMM et al. 1997). Durch die Vielzahl der möglichen Signaltransduktionswege übt S1P wichtige Effekte wie Entwicklung, Wachstum und Überleben verschiedener Zelltypen aus.



**Abbildung 2-5: Signaltransduktionswege der unterschiedlichen S1P-Rezeptoren** nach SPIEGEL und MILSTIEN (2003)

### **2.3.2.1 Der S1P1-Rezeptor**

Der S1P1-Rezeptor wird von S1P mit hoher Affinität ( $K_d = 8 \text{ nM}$ ) aktiviert und vermittelt seine Effekte ausschließlich über  $G_i$  (ZONDAG et al. 1998; WINDH et al. 1999; HLA et al. 2000). S1P1-Rezeptoren sind vor allem in der Plasmamembran lokalisiert. Unter Einfluss von S1P werden sie innerhalb von 15 Minuten internalisiert und kehren nach Beendigung des Stimulus durch S1P mit einer Halbwertszeit von etwa 30 Minuten in die Plasmamembran zurück (LIU et al. 1999). Der S1P1-Rezeptor induziert migratorische Effekte und spielt bei der Migration von Immunzellen eine bedeutende Rolle. Er ist entscheidend für die Auswanderung von T-Zellen aus dem Thymus und den peripheren lymphatischen Organen (ALLENDE et al. 2004). Auch für die Migration der DC ist der S1P1-Rezeptor von zentraler Bedeutung (CZELOTH et al. 2005). Die Aktivität des S1P1-Rezeptors führt zu einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, zu einer Aktivierung von Rac sowie zur Bildung von IP3 (LEE et al. 1998; OKAMOTO et al. 1998; ZONDAG et al. 1998). Die Aktivierung des S1P1 führt zur Stimulation der ERK und damit zur Förderung der Proliferation. Zusätzlich aktiviert das S1P1-Signal die PLC und inhibiert die Akkumulation von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP). LEE et al. (1999) postulierten einen Zusammenhang zwischen dem S1P1-Rezeptor und der Vaskularisierung und Angiogenese in Säugern. Bei S1P1-defizienten Mäusen kommt es aufgrund einer defekten Blutgefäßreifung zur embryonalen Letalität (LIU et al. 2000b). S1P1-mRNA wurde in den verschiedensten Geweben gefunden. Die Hauptexpressionsorte sind Endothelzellen und zerebrale Zellen (LIU u. HLA 1997).

### **2.3.2.2 Der S1P2-Rezeptor**

An den S1P2-Rezeptor bindet S1P ebenfalls mit recht hoher Affinität ( $K_d = 20 - 27 \text{ nM}$ ). Im Gegensatz zum S1P1-Rezeptor koppelt der S1P2-Rezeptor an mehrere G-Proteine wie  $G_q$ ,  $G_i$  und  $G_{12/13}$ . (WINDH et al. 1999). Die Rezeptoren S1P1 und S1P2 sind ein Beispiel für zwei Rezeptoren der gleichen Familie, deren Effekte entgegengesetzt sind. So inhibiert S1P2 im Gegensatz zu S1P1 die Aktivierung von Rac und führt zu einer Migrationshemmung (OKAMOTO et al. 2000). In humanen

Keratinocyten konnte eine Beteiligung des S1P2-Rezeptors an der antiproliferativen Wirkung des S1P nachgewiesen werden (SCHÜPPEL et al. 2008). Auch S1P2 vermittelt eine ERK- und PLC-Aktivierung. S1P2 defiziente Mäuse sind überlebensfähig und zeigen keine auffälligen anatomischen oder histologischen Veränderungen, es können jedoch epilepsieartige Anfälle auftreten (MACLENNAN et al. 2001). Der S1P2-Rezeptor wird vorherrschend in der Lunge und im Herzen exprimiert, besitzt aber vermutlich auch eine Bedeutung in der neuronalen Entwicklung während der Embryogenese (MACLENNAN et al. 1994; MACLENNAN et al. 1997; ZHANG et al. 1999).

### **2.3.2.3 Der S1P3-Rezeptor**

Die Bindungsaffinität des S1P3-Rezeptors zu S1P ist vergleichbar mit der des S1P2-Rezeptors ( $K_d = 23 - 26 \text{ nM}$ ) (KON et al. 1999; VAN BROCKLYN et al. 1999). Auch die Signaltransduktionswege stimmen mit denen des S1P2-Rezeptors überein, wobei hier noch die GTPase Rho hinzukommt. Der humane Rezeptor kommt in Herz-, Nieren- und Lungengewebe vor (YAMAGUCHI et al. 1996). Die genaue Funktion dieses Rezeptors ist bislang unklar, wie auch S1P1 erhöht der S1P3-Rezeptor die Aktivität von Rac und löst dadurch migratorische Effekte aus (ISHII et al. 2004). So ist neben dem S1P1-Rezeptor auch der S1P3-Rezeptor an der Migration von DC beteiligt (CZELOTH et al. 2005).

### **2.3.2.4 Der S1P4-Rezeptor**

Auch an den S1P4-Rezeptor bindet S1P mit hoher Affinität ( $K_d = 13 - 63 \text{ nM}$ ) (ISHII et al. 2004). Das Signal wird über  $G_i$  und  $G_{12/13}$  vermittelt und bewirkt ebenfalls die Induktion der PLC, die Aktivierung des ERK/MAP-Kinase-Weges und intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung (VAN BROCKLYN et al. 2000; YAMAZAKI et al. 2000). Seine Expression beschränkt sich auf lymphatische und hämatopoetische Gewebe wie Milz, Leukozyten, Lymphknoten und Thymus sowie auf die Lunge (GRÄLER et al. 1998). Dem Rezeptor wird eine wichtige Rolle bei der Regulation von immunologischen Prozessen zugeschrieben. Er besitzt vor allem

zytokinmodulierende Eigenschaften, so kommt es in T-Zellen nach Stimulation mit S1P zur Reduktion der INF- $\gamma$ -Synthese und zur erhöhten Sekretion von IL-10 (WANG et al. 2005).

#### **2.3.2.5 Der S1P5-Rezeptor**

Die Affinität des S1P5-Rezeptors zu S1P ist sehr hoch ( $K_d = 2 \text{ nM}$ ) (IM et al. 2000). Der Rezeptor vermittelt seine Effekte über  $G_i$  und  $G_{12/13}$ -Signaltransduktionswege. S1P5 inhibiert die Akkumulation von cAMP sowie die serum-induzierte ERK-Aktivierung und ruft somit eine Hemmung der Proliferation hervor (SANCHEZ u. HLA 2004). Insgesamt ist über den Rezeptor jedoch nur sehr wenig bekannt. Exprimiert wird der Rezeptor in peripheren Geweben sowie in Gehirn, Leukozyten und Milz (IM et al. 2000).

#### **2.3.3 Biologische Funktionen von S1P**

Die Rolle der Lysophospholipide wurde lange Zeit als Strukturkomponente der Zellmembran gesehen. Erst in den letzten 15 Jahren wurde die Bedeutung von S1P als Regulator einer Vielzahl zellulärer Prozesse erkannt und untersucht. Es wurde eine Vielzahl von Zelltypen identifiziert, die auf S1P reagieren. Hierzu gehören beispielsweise glatte Muskelzellen, Thrombozyten, Keratinozyten, Endothelzellen, Lymphozyten, Makrophagen und Mastzellen. Als bioaktiver Sphingolipidmediator vermittelt S1P seine Effekte nicht nur über die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, sondern hat auch eine Bedeutung als intrazellulärer *Second Messenger* (PAYNE et al. 2002). Intrazellulär gebildetes S1P kann zwar nach seiner Ausschleusung auch extrazellulär wirken, es konnten aber auch rezeptorunabhängige S1P-Effekte nachgewiesen werden (OLIVERA et al. 2003). S1P hat somit vielfältige, zum Teil zelltypabhängige, intra- wie extrazelluläre Wirkungen und ist an der Steuerung zellulärer Funktionen wie  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung, Proliferation, Migration, Differenzierung, Apoptose und Morphogenese beteiligt (ZHANG et al. 1991; SPIEGEL u. MILSTIEN 2003). Zudem ist eine essentielle Rolle des S1P bei der Angiogenese, Embryogenese und Wundheilung gezeigt worden (LEE et al. 1999; LEE et al. 2000;

LIU et al. 2000b). Durch das ubiquitäre Vorkommen von S1P, die differenzierte Expression der einzelnen S1P-Rezeptorsubtypen je nach Zelltyp sowie deren Kopplung an unterschiedliche G-Proteine in den unterschiedlichen Geweben entsteht ein zum Teil aus gegensinnigen Funktionen aufgebautes komplexes Netzwerk. Eine der wichtigsten Funktionen von S1P ist der mitogene Effekt auf eine Vielzahl von Zelltypen wie z.B. glatte Gefäßmuskelzellen, Fibroblasten oder Endothelzellen sowohl über extra- als auch intrazelluläre Signalwege. In Swiss 3T3-Fibroblasten, welche die Rezeptoren S1P1-3 exprimieren, führt S1P beispielsweise zu einem deutlichen Anstieg der DNA-Synthese und der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (ZHANG et al. 1991). Neben der Zellteilung beeinflusst S1P auch das zelluläre Überleben. So führt eine vermehrte Bildung von S1P zur Verringerung der Ceramid-Konzentrationen und somit zu verlängertem Überleben der Zelle und zur Unterdrückung apoptotischer Prozesse (CUVILLIER et al. 1996). Als Gewebshormon spielt S1P eine wichtige Rolle bei der Vermittlung des gerichteten Wanderverhaltens unterschiedlicher Zelltypen (SPIEGEL u. MILSTIEN 2002). S1P wirkt chemotaktisch und kann beispielsweise die Migration von Epithel- und Endothelzellen stimulieren (LEE et al. 1999). Die Bedeutung von S1P für die zelluläre Migration wurde an S1P-Rezeptor-Knockout-Mäuseembryonen deutlich. Hier verhinderte eine Störung der Migrationsprozesse von Perizyten und glatten Gefäßmuskelzellen die Blutgefäßreifung (YANG et al. 2002). In diesem Zusammenhang konnte eine Wechselwirkung (*crosstalk*) zwischen S1P1 und dem PDGF (*platelet-derived growth factor*)-Rezeptor gezeigt werden, welche essentiell für die Bildung neuer Gefäße ist (SPIEGEL u. MILSTIEN 2003). S1P wird als einer der Hauptlipidmediatoren des Immunsystems angesehen und ist an einer Vielzahl immunregulatorischer Prozesse beteiligt. Die Zellen des Immunsystems sind durch ihr spezifisches S1P-Rezeptorprofil zur Vermittlung der rezeptorvermittelten Prozesse wie Migration und Chemotaxis befähigt. Tabelle 2-2 zeigt das Expressionsmuster der S1P-Rezeptoren und die Effekte auf Immunzellen, wobei das Expressionsschema durch Zellaktivierung verändert werden kann (ISHII et al. 2004; VON WENCKSTERN et al. 2006).

**Tabelle 2-2: Expressionsmuster der S1P-Rezeptoren und deren Effekte auf Immunzellen**  
 modifiziert nach VON WENCKSTERN et al. (2006)

	<b>T-Zellen</b>	<b>B-Zellen</b>	<b>DC</b>	<b>Makrophagen</b>	<b>Mastzellen</b>
<b>S1P1</b>	+ Chemotaxis↑	+ Chemotaxis↑	+ Chemotaxis↑	+ Chemotaxis↑	+ Chemotaxis↑
<b>S1P2</b>	-	-	+	+	+ Chemotaxis↓ Degranulation↑
<b>S1P3</b>	-	(+)	+ Chemotaxis↑	+	-
<b>S1P4</b>	+ IL-10↑ IL-2↓, IL-4↓ INF-γ↓	+	+	+	-
<b>S1P5</b>	-	-	-	-	-

### 2.3.4 S1P-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten

Die Bedeutung von S1P in der Immunzellregulation wurde mit der Entdeckung der Wirkung des Immunmodulators FTY720 (Fingolimod), einem synthetischen Struktur analogon von Sphingosin, deutlich (MANDALA et al. 2002). FTY720 wurde erstmals 1994 als chemisches Derivat des natürlichen Wirkstoffs Myriocin des Ascomyceten *Isaria sinclairia* synthetisiert (FUJITA et al. 1994). Es wird *in vivo* schnell in die aktive Form, das FTY720-Phosphat (FTY720-P) phosphoryliert und wirkt so als S1P-Rezeptor-Agonist. FTY720 dient wie Sphingosin der SphK als Substrat. Im Gegensatz zu Sphingosin, welches hauptsächlich durch die SphK1 umgesetzt wird, erfolgt die Phosphorylierung von FTY720 effizienter durch die SphK2 (BILLICH et al. 2003). FTY720-P bindet mit hoher Affinität an vier der fünf S1P-Rezeptoren, S1P1 und S1P3-5 (BRINKMANN et al. 2002; MANDALA et al. 2002),

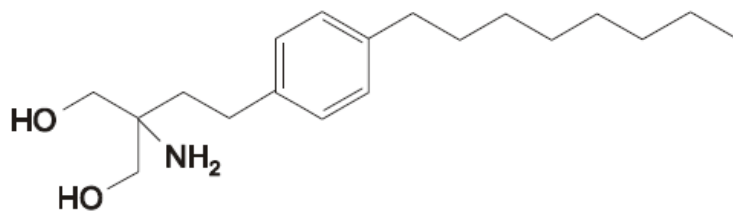
von denen S1P1 der dominierende Rezeptor auf Lymphozyten ist (MATLOUBIAN et al. 2004). Systemisch verabreicht verursacht FTY720-P über S1P-Signale eine reversible, dosisabhängige Lymphopenie und damit eine verminderte zellvermittelte Immunantwort. T- und B-Zellen sowie Thymozyten benötigen das S1P1-Signal für die Auswanderung aus den Lymphknoten und anderen lymphatischen Geweben bzw. aus dem Thymus in die Blutbahn (MANDALA et al. 2002; MATLOUBIAN et al. 2004). Im Gegensatz zu S1P bewirkt die FTY720-P-Bindung an den S1P1 eine irreversible Internalisierung und den anschließenden Abbau des Rezeptors (GRÄLER u. GOETZL 2004). Daher ist FTY720-P in der Lage, die Rezirkulation von Lymphozyten zu peripheren inflammatorisch veränderten Geweben zu verhindern. Die Konzentration autoreaktiver Lymphozyten im peripheren Blut wird hierdurch um mehr als 90 % verringert. Es erfolgt jedoch im Gegensatz zu anderen Immunsuppressiva keine massive Beeinflussung der Lymphozytenfunktion (z.B. keine Induktion von Apoptose). Erst nach zwei bis drei Tagen werden die S1P1-Rezeptoren erneut exprimiert und die aktivierten T-Zellen werden freigesetzt (BRINKMANN et al. 2004). Im Gegensatz zum natürlichen Mediator S1P ist FTY720 kein Substrat der S1P-Lyase und wird nur durch Phosphatasen metabolisiert bzw. dephosphoryliert (VON WENCKSTERN et al. 2006). Diese Diskrepanz ist ein entscheidender Faktor für das veränderte Verhalten von FTY720-P auf S1P-Rezeptoren und resultiert in einer länger anhaltenden Immunmodulation im Vergleich zu S1P. Die immunsuppressive Wirkung von FTY720 kann zusätzlich durch seine Wirkung auf Endothelzellen erklärt werden, da es die *adherens junctions* des Endothels durch Anreicherung von VE-Cadherin in den Zellmembranen verstärkt und somit die Migration von Lymphozyten durch das Endothel in die efferenten Lymphgefäße erschwert (BRINKMANN et al. 2004).

Als Immunmodulator wird große Hoffnung in die therapeutische Bedeutung von FTY720 gesetzt. So konnten beispielsweise in der Transplantationsmedizin sowie bei einer Reihe von experimentellen Autoimmunerkrankungen positive Effekte erzielt werden (YANAGAWA et al. 1998; CHIBA et al. 2005). Derzeit befindet sich FTY720 in Phase-III-Studien als Immunsuppressivum bei der Therapie der Multiplen Sklerose des Menschen (BROWN et al. 2007). Auch in einem etablierten Tiermodell zur

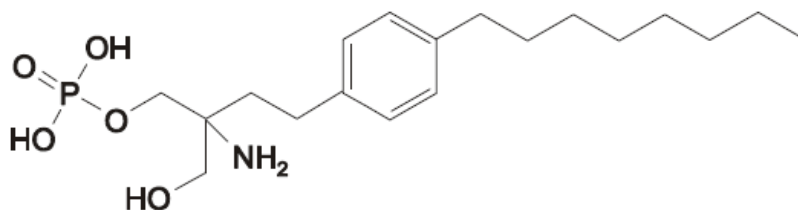


atopischen Dermatitis gibt es erste Hinweise auf eine mögliche Wirksamkeit von FTY720. So konnte die orale Verabreichung von FTY720 das Auftreten der spontanen Dermatitis in NC/Nga-Mäusen vollständig verhindern. Die über einen Zeitraum von sieben Tagen mit FTY720 behandelten Mäuse zeigten im Vergleich zur unbehandelten Gruppe eine deutlich verminderte Hypertrophie der Epidermis und eine verminderte Degranulation von Granulozyten. Auch eine Erhöhung der IgE-Konzentration blieb in der behandelten Gruppe aus. Die für die atopische Dermatitis typischen makroskopischen Hautläsionen konnten unter FTY720-Gabe ebenfalls fast vollständig aufgehoben werden (KOHNO et al. 2004). Als weiterer S1P-Rezeptor-Agonist wurde SEW2871 identifiziert. Es greift selektiv am S1P1-Rezeptor an ( $EC_{50} \sim 13 \text{ nmol/l}$ ) und induziert nach systemischer Verabreichung ähnlich wie der natürliche Ligand S1P eine vorübergehende Internalisierung des S1P1 (SANNA et al. 2004; GOLLMANN et al. 2008). *In vivo* verursacht es nach oraler Verabreichung durch Sequestration von Lymphozyten in sekundären lymphatischen Organen ebenfalls eine Lymphopenie, welche bei sinkenden Plasmawerten von SEW2871 reversibel ist (SANNA et al. 2004). Allerdings konnte nach systemischer Verabreichung von SEW2871 auch ein vorübergehender Anstieg von DC im Blut von Mäusen festgestellt werden (LAN et al. 2005). Wie S1P führt auch SEW2871 zu einer Freisetzung von intrazellulären  $Ca^{2+}$  und zur Zellmigration (JO et al. 2005). Neben den Rezeptor-Agonisten stehen auch Rezeptor-Antagonisten wie W146 und VPC23019 zur Verfügung. VPC23019 hemmt spezifisch S1P1 und S1P3, während W146 einen selektiven S1P1-Rezeptor-Antagonisten darstellt (DAVIS et al. 2005; SANNA et al. 2006). W146 ist ein synthetisches Strukturanalogon von S1P und entsteht durch Ersetzen der Phosphat-Gruppe von S1P mit Phosphanat. SANNA et al. (2006) konnten zeigen, dass W146 die S1P-Agonist-induzierte Hemmung der Lymphozytenmigration vom Lymphknoten in das lymphatische System umkehrt und die Zirkulation von T-Lymphozyten in der Medulla nach intravenöser Injektion von W146 deutlich erhöht ist. Des Weiteren konnte *in vivo* durch W146 eine erhöhte Gefäßpermeabilität gezeigt werden.

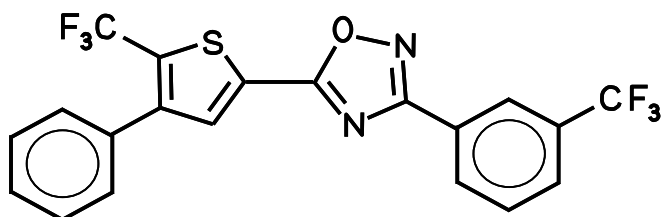
Abbildung 2-6 zeigt die Strukturformeln von FTY720, FTY720-P, SEW2871, W146 und VPC23019.



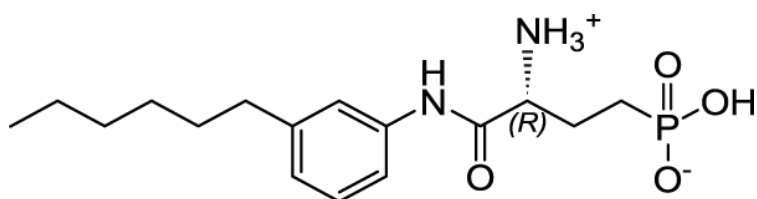
FTY720



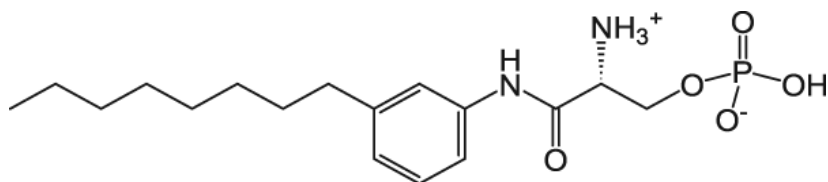
FTY720-P



SEW2871



W146



VPC23019

Abbildung 2-6: Strukturformeln von FTY720, FTY720-P, SEW2871, W146 und VPC23019

### **2.3.5 Wirkung der S1P-Rezeptor-Agonisten auf dendritische Zellen und Keratinozyten**

S1P ist für die Steuerung der Zirkulation von Lymphozyten zwischen dem Blut und dem Lymphsystem von zentraler Bedeutung (MATLOUBIAN et al. 2004). Neben seiner Wirkung auf Lymphozyten wirkt S1P auch chemotaktisch auf dendritische Zellen (DC). DC sind entscheidend für die Initiierung und Aufrechterhaltung allergisch-entzündlicher Erkrankungen wie der atopischen Dermatitis oder der allergischen Kontaktdermatitis. Als antigenpräsentierende Zellen sind sie für die Regulation der T-Zell-Antwort zuständig. Es wurde mehrfach bestätigt, dass einige zentrale Funktionen von dendritischen Zellen wie Migration, Zytokinsekretion und T-Zell-Stimulation durch S1P und FTY720 moduliert werden können (IDZKO et al. 2002; RENKL et al. 2004; MÜLLER et al. 2005). Die Expression von S1P-Rezeptoren durch dendritische Zellen wiesen IDZKO et al. (2002) nach. Humane DC exprimieren die mRNA für die S1P1-, S1P2-, S1P3- und S1P4-Rezeptoren (IDZKO et al. 2002). Auch auf der murinen Langerhans-Zell-Linie XS52 wurde die Expression der mRNA für die Rezeptoren S1P1-4 nachgewiesen (RADEKE et al. 2005). Diese Daten konnten durch eine Studie über unreife (immature) und reife (mature) murine Knochenmark-DC bestätigt werden. Die mRNA für S1P2, S1P3 und S1P4 wurde auf unreifen und reifen, die mRNA für S1P1 hingegen nur auf reifen DC gefunden (CZELOTH et al. 2005). Nur S1P1 und S1P3-Rezeptoren sind an der Zellmigration in Richtung S1P involviert, während über S1P2 die S1P-induzierte Migration gehemmt wird (CZELOTH et al. 2005; RADEKE et al. 2005). In der Literatur bestehen Unstimmigkeiten darüber, ob immature DC gleichermaßen wie mature DC auf S1P antworten (RENKL et al. 2004; CZELOTH et al. 2005). Nach CZELOTH et al. (2005) migrieren *in vitro* generierte murine mature DC (mDC), nicht aber immature DC (imDC) in Richtung S1P. Dies steht im Kontrast zu RENKL et al. (2004), welche zeigten, dass sowohl murine mDC als auch imDC auf S1P-Signale ansprechen. Humane *in vitro* aus Monozyten generierte DC migrieren hingegen im immaturren, nicht aber im maturen Zustand auf S1P (IDZKO et al. 2002). Des Weiteren zeigten IDZKO et al. (2002) *in vitro* eine veränderte Zytokinsekretion S1P-behandelter humaner dendritischer Zellen mit einem Wechsel von einer Th1- zu einer Th2-

Antwort und schlossen so auf die Bedeutung von S1P als Regulator der durch dendritische Zellen gesteuerten T-Zell-Antwort. In reifen dendritischen Zellen führte S1P zu einer verminderten Produktion von IL-12 und TNF- $\alpha$  sowie zu einer verstärkten Sekretion von IL-10 (MÜLLER et al. 2005). In unreifen dendritischen Zellen bewirkt S1P eine Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, eine verstärkte Aktin-Polymerisierung sowie die Erhöhung der chemotaktischen Aktivität (IDZKO et al. 2002; MÜLLER et al. 2005). Mature DC, welche in Anwesenheit von FTY720 generiert wurden, antworten ebenfalls mit einer verminderten Produktion von IL-12 und einer gesteigerten Synthese von IL-10. *In vitro* konnte durch Zugabe von FTY720 behandelten mDC zu allogenen T-Zellen zudem eine schwächere Aktivierung von naiven T Zellen mit verminderter IFN- $\gamma$  Sekretion und vermehrter Produktion von IL-4 gezeigt werden, so dass in Anwesenheit von S1P eher eine Th2-basierte Immunantwort zu erwarten ist (MÜLLER et al. 2005).

Auch die DC-Migration wird durch Behandlung mit FTY720 *in vitro* und *in vivo* beeinflusst. So konnte ein inhibitorischer Effekt von FTY720 auf die FITC-induzierte DC-Migration vier Tage nach oraler Gabe von FTY720 gezeigt werden. Dies gilt jedoch nicht für die Epidermis. So wurde die Anzahl an epidermalen DC in FITC-behandelter Haut durch FTY720- oder Vehikel-Gabe nicht verändert (CZELOTH et al. 2005). In einer anderen Studie führte die systemische (i.p.) Behandlung von Mäusen mit FTY720 zu einer reduzierten Anzahl der DC in den Lymphknoten sowie zu einer Zunahme der DC im Blut. Begleitet wurde dieser Effekt durch eine Herunterregulierung des Chemokinrezeptors 7 (CCR7), welcher für die transendotheliale Migration der DC zu den Lymphknoten von großer Bedeutung ist (LAN et al. 2005). An Mäusen mit experimentellem Asthma konnte gezeigt werden, dass eine intratracheale Applikation von FTY720 oder S1P immunsuppressive Wirkung hat und zu einer reduzierten allergisch-entzündlichen Reaktion führt (IDZKO et al. 2006). Der Wirkmechanismus dieser topischen Applikation beruht auch hier in einer Beeinflussung der dendritischen Zellfunktion. Hohe Konzentrationen von topisch verabreichtem FTY720 und S1P reduzieren die Migration der Lungen-DC zum regionären Lymphknoten. Die DC-Migration in Richtung anderer Chemokine wie CCL19 oder CCL21 wird nicht beeinflusst (CZELOTH et al. 2005; IDZKO et al. 2006).

In einer kürzlich veröffentlichten Studie beeinträchtigte die systemische Verabreichung von FTY720 zwar die Einleitung, nicht aber die Auslösephase der Dinitrofluorobenzen-induzierten allergischen Kontaktdermatitis (NAKASHIMA et al. 2008). Die Autoren konnten durch die systemische Verabreichung von FTY720 keine Modulation der Migration der Haut-DC feststellen. Sie folgerten, dass systemisch verabreichtes FTY720 vor allem die naive T-Zell-Zirkulation beeinträchtigt, welche die Einleitung einer allergischen Kontaktdermatitis bewirkt. Der spezifische S1P1-Rezeptor-Agonist SEW2871 hat ebenfalls Einfluss auf verschiedene extra- und intrazelluläre dendritische Zellfunktionen. SEW2871 vermindert die Chemotaxis von *in vitro* generierten unreifen und reifen humanen DC ohne die Aktin-Polymerisation zu beeinflussen. Unter inflammatorischen Bedingungen vermindert die intradermale Behandlung mit SEW2871 von TNCB-sensibilisierten Mäusen die Migration von murinen LC und CD11c<sup>+</sup> Haut-DC zum drainierenden Lymphknoten signifikant. Allerdings ist die Reduktion nicht vollständig und erreicht ein Maximum von etwa 75 % Hemmung. Dies zeigt, dass S1P eine bedeutende Rolle in der DC-Migration von der Haut zum Lymphknoten spielt (GOLLMANN et al. 2008). LAN et al. (2005) konnten durch i.p. Injektion von SEW2871 in B10-Mäusen einen vorübergehenden deutlichen Anstieg an zirkulierenden DC im Blut zeigen. Allerdings waren nach systemischer Applikation von SEW2871 keine signifikanten Veränderungen in der Anzahl der DC im Lymphknoten ersichtlich (LAN et al. 2005).

Neben den DC spielen Keratinozyten ebenfalls eine zentrale Rolle bei immunologisch modulierten Hauterkrankungen. Es handelt sich um überaus aktive Zellen, welche die Hauptzellpopulation in der Epidermis darstellen. Auch auf die Keratinozytenfunktion konnten direkte Wirkungen der S1P-Rezeptor-Agonisten nachgewiesen werden. S1P hat eine proliferative Wirkung auf eine Vielzahl von Zellen. Auf humane Keratinozyten hingegen übt S1P einen antiproliferativen Effekt aus (VOGLER et al. 2003). Dies geschieht über eine Inaktivierung der Akt/Protein-Kinase B (KIM et al. 2004). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass S1P die mitogene Wirkung des Insulins auf Keratinozyten über eine Blockade der Akt-Kinase hemmt. Darüber hinaus wurde die Beteiligung des S1P2-Rezeptors an der antiproliferativen Wirkung des S1P in humanen Keratinozyten nachgewiesen (SCHÜPPEL et al.

2008). Die topische Verabreichung von S1P reduziert die epidermale Hyperplasie, welche durch wiederholtes *Tape-Stripping* bei Mäusen ausgelöst wird (HONG et al. 2008). Wiederholtes *Tape-Stripping* wird von einer Sekretion mehrerer proinflammatorischer Zytokine und Chemokine wie  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ , IL-6, IL-8 und Histamin begleitet (WOOD et al. 1992; AMANO et al. 2007). Somit könnte die topische Verabreichung von S1P auch Auswirkungen auf die Zytokinsekretion von Keratinozyten haben.

## **2.4 Allergisch-entzündliche Hauterkrankungen**

Allergisch-entzündliche Hauterkrankungen erfahren sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin eine stetige Zunahme (HILLIER u. GRIFFIN 2001; AKDIS et al. 2006). Von großer klinischer Bedeutung sind unter anderem die atopische Dermatitis (AD) wie auch die allergische Kontaktdermatitis (ACD). Die Pathophysiologie dieser Hauterkrankungen wird nachfolgend erläutert.

### **2.4.1 Atopische Dermatitis**

Der Begriff der Atopie (griech. a topos = nicht am Ort) bezeichnet eine familiär auftretende Überempfindlichkeit von Haut und Schleimhäuten, die bei einem Großteil der Patienten mit erhöhter IgE-Bildung einhergeht (RING 1983). Die atopische Dermatitis (AD) ist eine chronisch-entzündliche Hauterkrankung, die klinisch in erster Linie durch extremen Juckreiz und eine typische ekzematoide Morphologie und Körperverteilung gekennzeichnet ist. In den letzten Jahrzehnten ist ein starker Anstieg der Atopie-Prävalenz zu verzeichnen gewesen. So leiden ca. 10-20 % der Kinder und 1-3 % aller Erwachsenen an einer atopischen Dermatitis (LEUNG u. BIEBER 2003). Beim Hund zählt die AD ebenfalls zu einer häufig vorkommenden Erkrankung, bei anderen Spezies wie Pferden und Katzen spielt sie eine eher untergeordnete Rolle (GUTERMUTH et al. 2004). Im Rahmen einer großen klinischen Studie (> 30 000 Hunde) in den USA zeigte sich, dass beinahe 10 % der Hundepopulation von dieser Überempfindlichkeit betroffen sind (HILLIER u. GRIFFIN 2001). Es handelt sich um eine genetisch prädisponierte Erkrankung, die bei einem

Großteil der Hunde im Alter von 6 Monaten bis 3 Jahren zum ersten Mal in Erscheinung tritt (GRIFFIN u. DEBOER 2001). Die Symptome gehen beim Hund mit einer typisch lokalisierten Dermatitis (Gesicht, Ohren, Pfoten, Bauch, Achseln, Innenschenkel) und starkem Juckreiz einher. Der starke Juckreiz und die kutane Hyperreaktivität führen zu einem Circulus vitiosus aus Selbstverletzung durch Kratzen, Zerstörung der Hautbarriere, Eindringen von Bakterien und Dysregulation der Zytokinfreisetzung. Komplikationen stellen Infektionen wie sekundäre Pyodermie, Malassezia- oder Staphylococcus-spp.-Dermatitis und Leckdermatitis der Extremitäten dar (DEBOER u. MARSELLA 2001). Im Zusammenhang mit der AD finden sich häufig IgE-Antikörper gegen Antigene wie Hausstaubmilben, Pollen, Insekten und andere Allergene im Blut (HILL u. DEBOER 2001). Beim Menschen weisen 70-80 % der AD-Patienten erhöhte Plasma-IgE-Spiegel und eine Typ-I-Sensibilisierung (Soforttyp) gegenüber Umweltallergenen auf (extrinsische AD/allergische Form), während bei 20-30 % der Patienten die Erkrankung durch niedrige IgE-Spiegel und eine fehlende Sensibilisierung (intrinsische AD/nicht allergischen Form) gekennzeichnet ist (SCHMID-GRENDELMEIER et al. 2001; GUTERMUTH et al. 2004).

Die AD äußert sich als rezidivierende Ekzemerkrankung, welche bei Hund und Mensch viele klinische als auch histopathologische Übereinstimmungen zeigt (NUTTALL et al. 2002). Die pathogenetischen Mechanismen, die zur Etablierung der Erkrankung beitragen, sind bis heute nicht vollständig geklärt. Aufgrund ihrer Dominanz im zellulären Infiltrat in läsionierter Haut spricht vieles für eine bedeutende Rolle der dendritischen Zellen und der T-Zellen (OLIVRY u. HILL 2001). Die Allergene werden über die Haut von dermalen dendritischen Zellen und Langerhans-Zellen aufgenommen. Die nachfolgende Aktivierung von T- und B-Zellen führt zur Produktion von IgE-Antikörpern sowie zur Freisetzung von Histamin, Serotonin und anderen entzündlichen und juckreizfördernden Faktoren. In dem Verlauf der atopischen Dermatitis sind beide T-Helferzell-Populationen involviert. Beim Menschen lassen sich in akuten Läsionen vermehrt aktivierte Th2-Lymphozyten mit einer gesteigerten Expression der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 nachweisen. Chronische Hautläsionen zeichnen sich durch einen Anstieg an IFN- $\gamma$ -

produzierenden Th1-Zellen aus, die eine Persistenz der Entzündungsreaktion bewirken (WERFEL et al. 1996; GUTERMUTH et al. 2004). Auch beim Hund ist ein Wechsel des Zytokinmusters von Th2 zu Th1 in chronischen Läsionen wahrscheinlich (NUTTALL et al. 2002). Der exakte Mechanismus, der diesem Switch zugrunde liegt, ist noch unbekannt. Die dendritischen Zellen weisen in läsionaler Haut von Menschen und Hunden mit atopischer Dermatitis eine erhöhte Dichte auf (WOLLENBERG et al. 1996; OLIVRY u. HILL 2001). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die DC bei der atopischen Dermatitis eine erhöhte Kapazität für die Stimulation von T-Zellen besitzen (TAYLOR et al. 1991). Neben den klassischen Langerhans-Zellen, die auch in gesunder Haut zu finden sind, zeigen Patienten mit atopischer Dermatitis eine erhöhte Anzahl an FcεRI-positiven Langerhans-Zellen, welche den hochaffinen IgE-Rezeptor (FcεRI) als IgE-bindende Struktur tragen (NOVAK et al. 2004). Zusätzlich wurde in entzündlich veränderter, läsionaler Haut eine zweite Population von DC gefunden, welche im Gegensatz zu den LC das Adhäsionsmolekül CD11b sehr stark exprimieren und die höchste FcεRI-Expression in der Haut aufweisen. Diese Zellen wurden erst vor wenigen Jahren von den LC abgegrenzt und als „Inflammatorische dendritische epidermale Zellen“ (IDEC) bezeichnet (WOLLENBERG et al. 1996). Des Weiteren spielen auch andere pathogenetische Faktoren wie die Störung von Keratinozyten-Funktionen oder Barrierefunktionsstörungen der Haut eine Rolle, jedoch ist die Ursache bzw. die Wirkung dieser Funktionsstörungen nicht hinreichend geklärt. Das Vorliegen einer Barrierefunktionsstörung gilt bei Patienten mit atopischer Dermatitis als gesichert. Wichtig für eine intakte Barrierefunktion sind unter anderem die interzellulären Lipide. Die aus normaler Haut extrahierbaren Lipide setzen sich aus Ceramiden, Cholesterin und freien Fettsäuren zusammen. Ceramide machen dabei 30-40 % der Stratum-corneum-Lipide aus. Für die physiologische Bereitstellung von Ceramiden im Stratum corneum stellt die durch saure Sphingomyelinase katalysierte Ceramidbildung wahrscheinlich den bedeutendsten Stoffwechselweg dar. Eine verminderte Hydrolyse von epidermalen Sphingomyelinen durch die in ihrer Aktivität verminderte saure Sphingomyelinase ist die wichtigste bekannte Störung, die zu einem Mangel an Stratum-corneum-Ceramiden führt und die Störung der



Barrierefunktion bei atopischer Dermatitis bedingt (JENSEN et al. 2004; MELNIK 2006). Eine weitere interessante Entdeckung machten SEO et al. (2006). Sie fanden heraus, dass die Sphingosin-1-Phosphat-Lyase bei Patienten mit atopischer Dermatitis im Vergleich zu gesunder Haut deutlich erhöht ist (SEO et al. 2006). Während Sphingosin-1-Phosphat (S1P) aus Sphingosin, einem Ceramid-Abkömmling, gebildet wird, katalysiert die Sphingosin-1-Phosphat-Lyase die irreversible Spaltung des Sphingosin-1-Phosphats zu Hexadecanal und Phosphoethanolamin. Die Keratinozyten spielen ebenfalls eine Rolle in der Pathogenese der AD. Für die gestörte Hautbarriere bei Patienten mit AD könnte ein intrinsischer Defekt der Keratinozyten ursächlich sein, der mit einer vermehrten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine einhergeht (GIROLOMONI u. PASTORE 2001). In Läsionen von atopischer Haut konnte eine erhöhte Produktion von GM-CSF der epidermalen Keratinozyten nachgewiesen werden (PASTORE et al. 1997). GM-CSF wirkt stimulierend auf die Monozyten, Langerhans-Zellen und Eosinophilen und ist für die Entwicklung und Differenzierung dendritischer Zellen von entscheidender Bedeutung. Zusätzlich produzieren Keratinozyten von Patienten mit atopischer Dermatitis nach mechanischer Stimulation wie Kratzen größere Mengen der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1, was die Migration inflammatorischer Zellen induziert (GIROLOMONI u. PASTORE 2001).

#### **2.4.2 Allergische Kontaktdermatitis**

Die allergische Kontaktdermatitis (ACD) ist als Prototyp einer Antigen-spezifischen T-Zell-vermittelten Immunantwort ein oft verwendetes experimentelles Modell für zelluläre Immunantworten. Bei der ACD handelt es sich um eine häufig vorkommende Hauterkrankung, basierend auf einer Intoleranzreaktion der Haut gegen äußerlich einwirkende nichtinfektiöse Noxen, sogenannte Kontaktallergene. Bei den Kontaktallergenen handelt es sich im Allgemeinen um niedermolekulare Substanzen, sogenannte Haptene, die aufgrund ihrer geringen Größe (unter 1 kD) leicht in die Epidermis eindringen. Erst durch Bindung an körpereigene Proteine, sogenannte *carrier*, werden sie in "körperfremde" Moleküle verwandelt und können eine Immunantwort induzieren (EISEN et al. 1952; KRASTEVA et al. 1999).

In Abhängigkeit vom Allergen manifestiert sich die allergische Kontaktdermatitis als IgE-vermittelte Hypersensibilitätsreaktion vom Typ I (Soforttyp) oder als zellvermittelte Reaktion vom Typ IV (verzögerter Typ). In den meisten Fällen handelt es sich jedoch um die zellvermittelte Reaktion, deren maximale Ausprägung ca. 48-72 Stunden nach vorangegangenem Allergenkontakt eintritt oder um Mischformen (KRASTEVA et al. 1999). Die Überempfindlichkeitsreaktionen werden durch das Zusammenwirken von DC, T-Zellen und Zytokinen vermittelt (NASORRI et al. 2002). Die allergische Kontaktallergie verläuft grundsätzlich in zwei Phasen. Die Auslösung der allergischen Kontaktdermatitis setzt eine spezifische Sensibilisierung, also einen Erstkontakt mit dem Kontaktallergen voraus. In der meist asymptomatisch verlaufenden Sensibilisierungsphase wird das Allergen von den antigenpräsentierenden Zellen wie LC oder dermale DC aufgenommen, prozessiert und dann über MHC-Moleküle im regionalen Lymphknoten den naiven T-Zellen präsentiert. Diese werden aktiviert und differenzieren zu T-Gedächtniszellen aus. Die erneute Applikation mit dem gleichen Antigen bei sensibilisierten Individuen wird als Auslösephase oder auch Challengephase bezeichnet (KRASTEVA et al. 1999). Es kommt zur schnellen Rekrutierung und Aktivierung der hapten-spezifischen T-Zellen (T-Gedächtniszellen) mit der Ausschüttung diverser Zytokine und Chemokine, welche den inflammatorischen Prozess und die klinische Ausprägung der allergischen Kontaktdermatitis induzieren.

### **2.4.3 Sensibilisierung**

Die Sensibilisierung auf ein Allergen ist ein sehr komplexer pathophysiologischer Vorgang, bei dem eine Überempfindlichkeit des Organismus gegen körperfremde Substanzen nach Erstkontakt mit dem jeweiligen Allergen erzeugt wird. Sie ist beim Menschen nach 8-15 Tagen, bei der Maus nach 5-7 Tagen abgeschlossen und Voraussetzung für eine allergische Reaktion nach erneutem Antigenkontakt (KRASTEVA et al. 1999). In der Sensibilisierungsphase werden naive T-Zellen aktiviert und differenzieren in Antigen-spezifische Gedächtnis- bzw. Effektorzellen.

### 2.4.3.1 Antigenaufnahme und DC-Migration

Die durch die Haut penetrierenden Allergene werden von den antigenpräsentierenden Zellen der Haut (vor allem immature Langerhans-Zellen und dermale DC) aufgenommen, prozessiert und im drainierenden Lymphknoten den naiven T-Zellen präsentiert (BANCHEREAU u. STEINMAN 1998; CAUX et al. 2000). Die Antigenaufnahme kann dabei durch verschiedene Mechanismen wie Endozytose, Makropinozytose oder Phagozytose stattfinden. Als immature Zellen können dendritische Zellen zunächst noch keine T-Zellen stimulieren, da auf ihrer Oberfläche nur wenige MHC-Moleküle und kostimulatorische Moleküle vorhanden sind. Ihre Hauptaufgabe liegt in der Aufnahme und dem Prozessieren des Antigens. Während ihrer Wanderung in den Lymphknoten vollzieht sich eine Reifung der DC vom ruhenden zum aktivierten Zustand, welche als Maturation bezeichnet wird (KRASTEVA et al. 1999). Erst durch die erfolgte Antigenaufnahme und durch die Zytokinfreisetzung (vor allem TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ ) aus Keratinozyten verändern sich die DC morphologisch, phänotypisch und funktionell und sind nun in der Lage, ihr Antigen naiven T-Zellen im Lymphknoten zu präsentieren (GRABBE u. SCHWARZ 1998). TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  scheinen bei dem Prozess der Aktivierung und Migration der DC eine wichtige Rolle einzunehmen. So ist bei Mäusen, welche keinen TNF- $\alpha$ -Rezeptor exprimieren, die DC-Migration gestört (WANG et al. 1997). IL-1 $\beta$ -defiziente Mäuse zeigen eine beeinträchtigte allergische Reaktion auf Haptene (SHORNICK et al. 1996). Während der Reifung der DC kommt es zur Heraufregulation von Adhäsions- und kostimulatorischen Oberflächenmolekülen wie LFA-1 und ICAM sowie des MHC-Komplexes, welcher den wichtigsten Marker für die maturierenden Zellen darstellt (GRABBE u. SCHWARZ 1998). Damit die DC in die parakortikalen Bereiche der regionalen Lymphknoten migrieren und den dort ansässigen T-Zellen die Allergene über MHC-I bzw. MHC-II präsentieren können, müssen sie zunächst die Basalmembran durchdringen. Dies geschieht mit Hilfe der Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9), die durch TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  auf der Oberfläche der DC exprimiert wird und ihnen durch Proteolyse von Collagen IV das Durchdringen der Basalmembran ermöglicht (KOBAYASHI et al. 1999; RATZINGER et al. 2002). Des Weiteren kommt es zur Expression des Chemokinrezeptors 7

(CCR7) auf der Oberfläche der dendritischen Zellen, welcher ihnen den Eintritt in die Lymphgefäße und die Wanderung aus der Haut zu den Lymphknoten ermöglicht. In den Lymphknoten werden die chemotaktischen CCR7-Liganden SLC (*secondary lymphoid tissue chemokine*, CCL21) und MIP-3 $\beta$  (*macrophage-inflammatory-protein-3-beta*, CCL19) gebildet, die an den Oberflächenrezeptor CCR7 binden und damit die DC anlocken. Dendritische Zellen von CCR7-defizienten Mäusen sind nicht fähig, gezielt in den regionalen Lymphknoten zu wandern (FÖRSTER et al. 1999; LIPSCOMB u. MASTEN 2002).

#### **2.4.3.2 Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung**

Im regionalen Lymphknoten wird das Allergen, gebunden an MHC-I oder MHC-II, den naiven T-Zellen präsentiert. Dieser Vorgang wird als *priming* bezeichnet (BANCHEREAU u. STEINMAN 1998; CAUX et al. 2000; WALLET et al. 2005). Unreife T-Zellen zirkulieren fortwährend im Blut und von dort in die lymphatischen Organe. Sie tragen alle einen T-Zell-Rezeptor (TCR) an ihrer Oberfläche, der für die Erkennung von Antigenen verantwortlich ist. Trifft nun die T-Zelle auf eine DC mit passendem Antigen, so beendet sie ihre Wanderung und interagiert mit der DC. Die von den DC selbst sezernierten Zytokine und Chemokine können ebenfalls zu einer Rekrutierung von T-Zellen führen, wodurch die Art der Immunantwort der T-Zellen von den DC direkt beeinflusst wird (LIPSCOMB u. MASTEN 2002). Die Interaktion führt zu einer verstärkten Adhäsion zwischen der T-Zelle und der antigenpräsentierenden Zelle und zu einer Aktivierung der T-Zelle. Die Aktivierung der T-Zellen erfordert zwei unterschiedliche Signale. Zum einen erkennen die TCR keine freien, sondern nur zellgebundene Antigene, welche ihnen als Peptid in den MHC-Klasse-I (für CD8<sup>+</sup>-T-Zellen) oder in den MHC-Klasse-II (für CD4<sup>+</sup>-T-Zellen) Molekülen gebunden präsentiert werden (KRASTEVA et al. 1999). Zum anderen werden zur Aktivierung der T-Zellen kostimulatorische Moleküle wie B7-1, B7-2 (= CD 80/86) und ICAM-1 benötigt, deren Expression durch Reifung in den DC induziert wird (LIPSCOMB u. MASTEN 2002; NGUYEN et al. 2002). ICAM-1 induziert zusammen mit LFA-1 den festen Kontakt zwischen den T-Zellen und den DC, welcher für die Proliferation der T-Zellen nötig ist (BACHMANN et al. 1997). Die

beiden Signale führen zu einer IL-2-Produktion seitens der T-Zellen und zur Expression hochaffiner IL-2-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche (JUNE et al. 1989). Die Bindung von IL-2 an seinen Rezeptor führt zur Proliferation der T-Zelle. Nur wenn die T-Zelle beide Signale erhält, führt dies zur klonalen Expansion von T-Gedächtniszellen. Das Ausbleiben eines der Signale führt zur fehlenden Reaktion auf das Antigen und somit zur Toleranz der T-Zelle. Als Konsequenz der T-Zell-Aktivierung erfolgt die Teilung und Vermehrung der Zelle (Proliferation) sowie ihre Reifung und Differenzierung in aktive T-Zellen, den sogenannten Gedächtnis- bzw. Effektorzellen (KRAMER et al. 1997). Diese Allergen-spezifischen T-Zellen sind aufgrund der Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle und Chemokinrezeptoren fähig, den Lymphknoten zu verlassen und über den Blutstrom zum Ort der Infektion oder der Haptenapplikation zu migrieren.

#### **2.4.3.3 Differenzierung von Th1- und Th2-Zellen**

In der Sensibilisierungsphase wird entweder eine Th1- oder eine Th2-vermittelte Immunantwort ausgelöst. Die Th-1-/Th-2-Polarität wird dabei vom Allergen, dem umgebenden Zytokinmilieu und der Dauer der T-Zellrezeptor-Stimulation bestimmt. Th1-Zellen aktivieren eine zellvermittelte Immunantwort, während Th2-Zellen die Immunantwort in eine humoral (IgE-Produktion durch B-Lymphozyten) betonte Richtung steuern (CUMBERBATCH et al. 2003; BIEDERMANN et al. 2004). Eine Th1-vermittelte Immunantwort entsteht durch die Präsentation des Haptens zusammen mit MHC-I an naive CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in Abwesenheit von T-Helferzellen. Es entwickeln sich CD8<sup>+</sup>-Gedächtnis- und Effektorzellen. Eines der wichtigsten Zytokine für die Differenzierung von CD8<sup>+</sup>-Zellen und somit der Induktion einer Th1-Antwort ist das von den dendritischen Zellen produzierte IL-12 (CARTER u. DUTTON 1996). Von Th1-Zellen wird vor allem IFN- $\gamma$  gebildet, welches unter anderem zur Makrophagenaktivierung und damit zu einer zellulären Immunität führt.

Wird das Allergen hingegen über MHC-II präsentiert, werden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen geprimt. Durch Mediatoren wie IL-4 und PGE<sub>2</sub> kommt es zur Stimulation der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und zur Induktion einer Th2-Antwort (HILKENS et al. 1996; KAPSENBERG et al. 1998; CUMBERBATCH et al. 2003). Von Th2-Zellen werden vor allem die Zytokine

IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 gebildet. Dies führt zur Aktivierung von antigenspezifischen B-Lymphozyten und somit zur humoralen Immunantwort. Die B-Lymphozyten werden daraufhin unter dem Einfluss von IL-4 und Stimulation durch CD40L zur Produktion von IgE-Antikörpern angeregt (JANEWAY u. TRAVERS 2001). Kontaktallergene die eine Th1-Antwort auslösen sind z.B. Dinitrofluorbenzen (DNFB), Trinitrophenyl (TNP) und Oxazolone (KRASTEVA et al. 1999). Kontaktallergene wie Trimellitanhydrid (TMA) oder Toluendiisocyanat (TDI) stimulieren eine Th2-Antwort (DEARMAN et al. 1996; CUMBERBATCH et al. 2003).

#### **2.4.4 Challenge**

Ein erneuter Antigenkontakt nach abgeschlossener Sensibilisierungsphase führt zur Auslöse- oder Challengephase. Die in der Sensibilisierung differenzierten Gedächtniszellen entwickeln sich zu Effektorzellen und werden in das Gebiet des Antigenkontakts rekrutiert.

Die Auslösephase ist durch das Auftreten klinischer Symptome gekennzeichnet und führt zu einer zeitlich begrenzten Entzündungsreaktion in der Epidermis und Dermis (KRASTEVA et al. 1999). Bei der Auslösephase wird zwischen einer Antigen-unspezifischen und einer Antigen-spezifischen Phase unterschieden (RIEMANN et al. 2003). In der Antigen-unspezifischen Phase führt ein Hapten-induziertes inflammatorisches Signal innerhalb weniger Stunden nach Zweitkontakt mit dem Antigen zur Freisetzung entzündlicher Mediatoren wie IL-1 und TNF- $\alpha$  aus Keratinozyten und zur Aktivierung der unspezifischen Immunantwort. Mastzellen werden aktiviert und Chemokine und andere Entzündungsmediatoren freigesetzt. Dies führt zur Aktivierung von Endothelzellen und einer verstärkten Expression von MHC-Molekülen und Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 (BARKER et al. 1991; GOEBELER et al. 2001; RIEMANN et al. 2003). Durch die Ausbildung von Selektinen, Integrinen und Chemokinen regulieren die aktivierten Keratinozyten zusammen mit dem aktivierten Endothel in den postkapillären Venolen die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und T-Zellen aus dem Blut in die Haut und initiieren so das Entzündungsgeschehen. Nach der Extravasation

erfolgt eine erneute Antigenpräsentation mit anschließender Aktivierung der Hapten-spezifischen Immunität. In der Antigen-spezifischen Phase kommt es zur Rekrutierung antigenspezifischer T-Zellen, welche sich in T-Effektorzellen umwandeln und inflammatorische Zytokine wie z.B. IFN- $\gamma$  freisetzen. Es kommt zur Bildung eines unspezifischen entzündlichen Infiltrates in der Haut und zur klinischen Manifestation der Entzündungsreaktion mit der Ausbildung typischer Symptome der Kontaktdermatitis (Erythem, Ödem, Vesikulation) (GOEBELER et al. 2001; RIEMANN et al. 2003).

#### **2.4.5 TDI-Kontaktallergiemodell**

Das in dieser Arbeit verwendete Kontaktallergen Toluol-2,4-diisocyanat (TDI) zählt zur Stoffgruppe der Diisocyanate und wird aufgrund seiner haut- und atemwegssensibilisierenden Eigenschaften auch als "*chemical respiratory antigen*" bezeichnet (SCHEERENS et al. 1999). Aufgrund seiner Sensibilisierungsstärke von nahezu 100 % in allen Individuen gehört es zu den starken Kontaktallergenen („*strong hapten*“). Im Mausmodell wurde das Auftreten einer dermalen Kontaktallergie nach Sensibilisierung mit TDI erstmals von YASUDA et al. (1980) beschrieben und seitdem für zahlreiche pharmakologische Untersuchungen verwendet. TOMINAGA et al. (1985) benutzen das TDI-Kontaktallergiemodell für pharmakologische Untersuchungen zur Beeinflussung des Entzündungsgeschehens. Durch wiederholte TDI-Verabreichung auf die Ohrhaut von sensibilisierten Mäusen konnte neben der Allergie vom verzögerten Typ auch eine Sofortreaktion in Form einer Ohrschwellung begleitet von einem Anstieg antigenspezifischer IgE-Antikörper im Serum gezeigt werden. BÄUMER et al. (2004) konnten bei ihren Untersuchungen feststellen, dass das Entzündungsgeschehen im TDI-Modell neben den CD8<sup>+</sup>-Zellen vorherrschend durch CD4<sup>+</sup>-Zellen vermittelt wird. Des Weiteren wurden eine TDI-induzierte entzündliche Ohrschwellung anhand eines *Mouse-Ear-Swelling-Tests* (MEST) sowie eine gesteigerte Interaktion mit naiven T-Zellen in den lokalen Lymphknoten und eine erhöhte Migrationsbereitschaft stimulierter DC anhand eines *Local-Lymph-Node-Assays* (LLNA) gezeigt (BÄUMER et al. 2004; BÄUMER et al.

2005). In der vorliegenden Arbeit soll anhand eigener Untersuchungen der Fragestellung nachgegangen werden, welchen Einfluss die Testsubstanzen S1P, FTY720 und SEW2871 auf das allergische Entzündungsgeschehen in der Sensibilisierung und der Challenge im TDI-Kontaktallergiemodell haben.



## 3 Material und Methoden

### 3.1 Geräte und Reagenzien

#### 3.1.1 Geräte für Versuche in der Zellkultur

Brutschrank	US AutoFlow, Zapf, Sarstedt
Mikroskop	Axiovert 25, Zeiss, Jena
Kühlzentrifuge	Eppendorf 5804 R, Hamburg
Sterilbank	Dynatech Laboratories, Denkendorf
Neubauer-Zählkammer	Albert Sass, Sigma, Steinheim
Feinwaage	Sartorius 2002 MP1, Sartorius, Göttingen
Pipetten	Eppendorf, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Eppendorf, Frickenhausen
Polypropylen-Röhrchen 15 ml/50 ml	Greiner, Frickenhausen
Polystyrol-Petrischalen 100 mm x 20 mm	tissue culture dish cell+, Sarstedt
Sterilfilter	Minisart, Sartorius, Göttingen
25 cm <sup>2</sup> Kulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
6-, 12-, 24-, 96-Well-Kulturplatten	Greiner, Frickenhausen
12-Well-Kulturplatten mit Einsätzen (8,0 µm Porengröße)	Greiner, Frickenhausen
Einmalspritzen 2/10 ml	Omnifix, Braun, Melsungen
CRYO-Röhrchen 1 ml	Greiner, Frickenhausen
Rundschüttler	Reax 2000, Heidolph, Kelheim
Magnetrührer	Ika, Staufen
Wasserbad	Büchi, Laboratoriumstechnik, Flawil, Schweiz

#### 3.1.2 Reagenzien für Versuche in der Zellkultur

Williams-Medium E	Biochrom, Berlin
-------------------	------------------

RPML-1640-Medium	Biochrom, Berlin
GM-CSF-Medium	Biochrom, Berlin
Amphotericin-B	Biochrom, Berlin
EDTA (Versen) 1 %	Biochrom, Berlin
Fetales Kälberserum 10 %	Biochrom, Berlin
Gentamicin	Biochrom, Berlin
Glutamin	Biochrom, Berlin
Penicillin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Streptomycin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypsin/EDTA (0,05 % / 0,02 %)	Biochrom, Berlin
Trypsin (Trockensubstanz)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Lipopolysaccharid (LPS)	E.coli O127 B8, Sigma, Steinheim
Peptidoglykan (PGN)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Concanavalin A (ConA)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Polyvidon-Iod-Lösung	Braunol, Braun, Melsungen
Trypan-Blau	Sigma, Steinheim
Ethanol	Sigma, Steinheim
Epithelial Growth Factor (EGF)	Biochrom, Berlin
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma, Steinheim

### 3.1.3 Testsubstanzen

Sphingosin-1-Phosphat (S1P)	Biozol, Eching und York Pharma, Homburg/Ohm
FTY720	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
SEW2871	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
W146	Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama USA
VPC23019	Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama USA

### 3.1.4 Geräte/Reagenzien für ELISA

DuoSet Mouse IL-6-ELISA	R&D Systems, Wiesbaden
DuoSet Mouse IL-8-ELISA	R&D Systems, Wiesbaden
DuoSet Mouse IL-1 $\beta$ -ELISA	R&D Systems, Wiesbaden
DuoSet Mouse KC-Mouse-ELISA	R&D Systems, Wiesbaden
DuoSet Mouse IFN- $\gamma$ -ELISA	R&D Systems, Wiesbaden
Polystyrol-Nunc-Immuno-Platte	Nunc GmbH, Wiesbaden
Photometer	Microplate Reader MRX, Dynatech
Pipetten	Eppendorf, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Eppendorf, Frickenhausen
Tween <sup>®</sup> 20	Sigma, Steinheim
3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)	Sigma, Steinheim
Stop-Puffer (2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt

### 3.2 Geräte und Reagenzien für *In-vivo*-Versuche

Pipetten	Eppendorf, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Eppendorf, Frickenhausen
Cutimeter	Mitutoyo, Neuss
Tesafilm	Beiersdorf, Hamburg
Homogenisator, Duall, mit Glaspistill	Omnilab, Gehrden
Pasteurpipette	Brand GmbH, Wertheim
24-Well-Kulturplatten	Greiner, Frickenhausen
Kühlzentrifuge	Eppendorf 5804 R, Hamburg
Enthaarungscreme	AS Anton Schlecker, Maxim, Pulheim
Methanol	LAB Scan Ltd., Dublin, Ireland
Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Toluene-2,4,-diisocyanate (TDI)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Aceton	Sigma-Aldrich, Steinheim
Concanavalin A (ConA)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

### 3.2.1 Geräte für FACS-Analyse

96-Well-Kulturplatten, round bottom  
Coulter Epics XL  
Expo 32 ADC Analysis

Greiner, Frickenhausen  
Beckmann Coulter Company,  
Miami, USA

### 3.2.2 Reagenzien für FACS-Analyse

Anti-mouse CD 11c  
(hamster IgG<sub>1</sub>, PE-conjugated, HL3)  
CD40  
(rat IgG<sub>2a</sub>, FITC-conjugated, 3/23)  
Isotypkontrollen  
(hamster IgG<sub>1</sub>, PE-conjugated und  
rat IgG<sub>2a</sub>, FITC-conjugated)

BD Bioscience, Pharmingen, Hamburg

BD Bioscience, Pharmingen, Hamburg

BD Bioscience, Pharmingen, Hamburg

### 3.2.3 Geräte für Immunhistochemie

24-Well-Kulturplatten  
Adhäsionsobjektträger 75 x 25 x 1 mm  
Deckgläser 24 x 60 mm  
Fluoreszenzmikroskop  
Tischschüttler

Greiner, Frickenhausen  
Histobond Superior, Marienfeld  
Roth, Karlsruhe  
Axioskop, Zeiss, Jena  
Vibra, Ika, Staufen

### 3.2.4 Reagenzien für Immunhistochemie

MHCII (I-A/I-E, rat IgG2b)  
Biotinylated rabbit-anti-rat IgG  
Carbocyanin 3  
  
Triton X 100  
Ammoniumthiocyanat  
Entellan

Pharmingen, Hamburg  
DAKO, Hamburg,  
Jackson Immunoresearch  
Laboratories, USA  
Serva Feinbiochemica, Heidelberg  
Riedl de Haen, Hannover  
Merck, Darmstadt

Toluol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tissue Freezing Medium	Leica Microsystems GmbH, Nussloch
Anti-GR-1, -CD3, -CD4	Dianova, Hamburg
Rat anti-mouse IgG Z494	Dako, Hamburg
APAAP complex (D 488)	Dako, Hamburg
Fast Blue	Sigma, Deisenhofen

### 3.2.5 Geräte/Reagenzien für Proteinextraktion

Photometer	Microplate Reader MRX, Dynatech
Pefa-Block	Roche, Basel
RPMI-1640-Medium	Biochrom, Berlin
Biorad Protein Assay	Biorad, München

### 3.2.6 Geräte für Histologie

Wasserbad, WBL 793	Vogel GmbH, Gießen
Mikrotom, Hn40	MICROM International GmbH, Walldorf
Objektträger, geschnitten, Mattrand	Engelbrecht, Medizin- und Labortechnik, Edermünde
Heiztisch, ST 893	Vogel GmbH, Gießen
Färbeautomat Varistain 24-4	Shandon, Pittsburgh, PA
Eindeckautomat Consul	Shandon, Pittsburgh, PA
Einbettkassetten	Engelbrecht, Medizin- und Labortechnik, Edermünde

### 3.2.7 Reagenzien für Histologie

Alkohol (70, 80, 96 und 100 %)	Otto-Fischer GmbH, Saarbrücken
Glycerin Gelatine Eukitt	O-Kindler GmbH, Freiburg
Xylol	Otto-Fischer GmbH, Saarbrücken

Hämalaun nach Meyer	Zentralapotheke Klinikum Region Hannover
Eosin-Gebrauchslösung	Zentralapotheke Klinikum Region Hannover
Glycerin Gelatine Gel/Mount	Biomeda, Foster City, CA
Serum-Glycerin 3 T 013	Division Chroma. Münster

### **3.2.8 Geräte für Blutuntersuchungen**

Merck Hitachi LaChrom 842 HPLC System RP18 Kromasil column	Merck Hitachi, Darmstadt Chromatographie Service, Langerwehe
Merck System Manager Software Software Advia 120	Merck Hitachi, Darmstadt Siemens Medical Solutions Diagnostics, Eschborn

### **3.2.9 Hergestellte Puffer und Lösungen**

#### Williams-Medium E (1)

Dem Basismedium (Williams-Medium E) wurde hinzugefügt:

2 mM Glutamin

2,5 µg/ml Amphotericin B

50 µg/ml Gentamicin

10 ng/ml Epithelial Growth Factor (EGF)

20 % Fetales Kälberserum

100 µg/ml Penicillin/ Streptomycin

#### Williams-Medium E (2)

Dem Basismedium (Williams-Medium E) wurde hinzugefügt:

2 mM Glutamin

2,5 µg/ml Amphotericin B

50 µg/ml Gentamicin

10 ng/ml Epithelial Growth Factor (EGF)  
100 µg/ml Penicillin / Streptomycin  
10 mg/ml Trypsin

#### Williams-Medium E (3)

Dem Basismedium (Williams-Medium E) wurde hinzugefügt:

2 mM Glutamin  
2,5 µg/ml Amphotericin B  
50 µg/ml Gentamicin  
10 ng/ml Epithelial growth factor (EGF)  
20 % Fetales Kälberserum  
50 µg/ml Penicillin / Streptomycin

#### Williams-Medium E (4)

Dem Basismedium (Williams-Medium E) wurde hinzugefügt:

2 mM Glutamin  
10 ng/ml Epithelial growth factor (EGF)  
10 % Fetales Kälberserum  
100 µg/ml Penicillin / Streptomycin

#### Williams-Medium E (5) (Einfriermedium)

Dem Basismedium (Williams-Medium E) wurde hinzugefügt:

2 mM Glutamin  
10 ng/ml Epithelial growth factor (EGF)  
10 % Fetales Kälberserum  
10 % Glycerin

#### RPMI-Medium für LLNA

Dem Basismedium RPMI wurde hinzugefügt:

10 % Fetales Kälberserum  
1 % Penicillin / Streptomycin

### Gewebekultur-Medium (GK)

Dem Basismedium (DMEM-Medium) wurde hinzugefügt:

10 % Fetales Kälberserum

1 % Penicillin / Streptomycin

1 % Amphotericin-B

### PBS Puffer

8 g NaCl

0,2 g KCl

1,44 g Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Aqua bidest ad 1000 ml, Einstellung von pH 7,2 mit 1 mol/l HCl

### TBS Puffer

9 g NaCl

6,06 g Tris-HCl

1,39 g Tris-Base

Bidestilliertes Wasser

Einstellung von pH 7,4

### **3.2.10 Versuchstiere**

Die Tierversuche wurden durch die Bezirksregierung Hannover genehmigt (Aktenzeichen: 509.6-42502-03/711).

Es wurden klinisch gesunde, weibliche Balb/c-Mäuse für die Versuche verwendet. Zum Beginn der Versuche waren die Tiere acht Wochen alt und wogen ca. 20 g. Die Mäuse wurden zu fünf bis sechs Tieren auf die Käfige aufgeteilt und in einem 12-Stunden Hell-/Dunkel-Lichtzyklus bei 23°C Raumtemperatur gehalten. Altrumin-Standarddiät und Wasser standen zur freien Verfügung.



### 3.3 Versuchsübersicht

In den nachfolgend aufgeführten Versuchen wurde die Wirkung der S1P-Rezeptor-Agonisten S1P, FTY720 und SEW2871 sowie der S1P-Rezeptor-Antagonisten W146 und VPC23019 auf dendritische Zellen (DC), T-Lymphozyten und Keratinozyten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* untersucht.

*In vivo* wurde die Wirkung der Testsubstanzen im TDI-Kontaktallergiemodell auf die Migration der DC und auf die T-Zell-Stimulation während der Sensibilisierung und der Challenge untersucht. Um mögliche systemische Effekte nach topischer Applikation von S1P beurteilen zu können, wurde zunächst die Blutplasmakonzentration von S1P bestimmt. Da bekannt ist, dass S1P-Rezeptor-Agonisten im Blut eine Lymphopenie erzeugen (MANDALA et al. 2002), wurde die Anzahl an weißen Blutkörperchen und Lymphozyten im Blut nach topischer Applikation der Testsubstanzen ermittelt. Im MEST (*Mouse Ear Swelling Test*) wurde die TDI-induzierte allergische Reaktion sowie ihre Inhibition durch die Testsubstanzen bestimmt. Im LLNA (*Local-Lymph-Node-Assay*) konnte über das Lymphknotengewicht und die Gesamtzellzahl die Proliferation der T-Zellen und ihre Stimulation durch DC untersucht werden. Da von OHL et al. (2004) bestätigt werden konnte, dass die DC im Lymphknoten, welche aus der Haut stammen, sowohl CD 40 als auch CD 11c positiv sind, wurden die Lymphknotenzellen in der FACS-Analyse auf die Oberflächenmoleküle CD 40 und CD 11c untersucht. Des Weiteren wurden die Lymphknotenzellen *in vitro* mit Concanavalin A stimuliert und die Zytokinproduktion mittels ELISA gemessen. Um den Einfluss der Testsubstanzen näher auf das Migrationsverhalten der DC zu untersuchen, wurden die behandelten Mausohren *post mortem* abgetrennt und im *Skin-DC-Migration-Assay* die Anzahl der ausgewanderten Zellen pro mg Ohrgewebe bestimmt. Nach Proteinextraktion der Ohrhälften wurde die IL-1 $\beta$ -Konzentration per ELISA bestimmt. Durch Anfärben der MHC-II<sup>+</sup>-Zellen sowie von CD3<sup>+</sup>- und GR-1<sup>+</sup>-Zellen konnte die Anzahl der DC sowie der T-Zellen und der neutrophilen Granulozyten in der Haut bestimmt und verglichen werden. Durch die Anfertigung von histologischen Präparaten der Ohrhaut konnten

Unterschiede in den Entzündungszeichen wie Zellinflux und Ödematisierung der Gruppen beurteilt werden.

Zusätzlich wurde die Wirkung der S1P-Antagonisten W146 (S1P1) und VPC23019 (S1P1/S1P3) auf die DC-Migration untersucht. Mit *in vitro* aus dem Knochenmark von Mäusen generierten DC wurde ein Migrations-Assay durchgeführt. Da neben S1P1 auch S1P3 an der DC-Migration beteiligt ist (RADEKE et al. 2005), wurde insbesondere geprüft, ob der S1P1/S1P3-Antagonist VPC23019 einen stärkeren hemmenden Effekt auf die DC-Migration zeigt als der reine S1P1-Antagonist W146. *In vitro* wurden weiterhin Versuche mit murinen Keratinozyten durchgeführt. Die Zellen wurden mit der Testsubstanz S1P behandelt und mit den *Toll-like*-Rezeptor-Agonisten LPS bzw. PGN stimuliert. Die LPS- und PGN-induzierte Zytokinproduktion wurde mittels ELISA gemessen. Anschließend wurden Versuche mit caninen Keratinozyten durchgeführt. Es wurden Primärzellkulturen der caninen Keratinozyten erstellt und mit den Testsubstanzen S1P und FTY720 in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Nach Stimulation mit LPS bzw. PGN wurde die Zytokinproduktion ebenfalls mittels ELISA gemessen.

### **3.4 *In-vivo*-Versuche**

#### **3.4.1 TDI-Kontaktallergiemodell**

Zur Vorbereitung wurden weibliche BALB/c-Mäuse im Alter von 8 Wochen in der Abdominalregion enthaart. Hierfür wurde Enthaarungscreme auf die Bauchhaut aufgetragen und nach einigen Minuten mit einem feuchten Tuch wieder entfernt. Am darauf folgenden Tag begann die Sensibilisierung der Tiere mit Toluol-2,4-diisocyanat (TDI)-Lösung (in Aceton). Hierzu wurde die Bauchhaut zunächst zehnmal mit Tesafilmstreifen behandelt (*Tape-Stripping*) und daraufhin jeweils 100 µl 5 %iges TDI auf das Abdomen aufgetragen. Die Sensibilisierung erfolgte über drei weitere Tage mit jeweils 50 µl 5 %igem TDI. Durch die Behandlung der Bauchhaut mit Tesafilm an den ersten drei Tagen der Sensibilisierung wurden die oberen Hornschichten entfernt, wodurch eine Störung der Barrierefunktion und somit eine verbesserte Penetration des Kontaktallergens erreicht wird. An Tag 21 wurden die

Tiere geboostert indem 50 µl 0,5 %iges TDI auf das Abdomen aufgetragen wurde. An Tag 28 wurden die Ohrdicken der Tiere gemessen und anschließend 20 µl 0,5 %ige TDI-Lösung auf die Innen- und Außenseite des Ohres aufgetragen um eine allergische Kontaktdermatitis, die sogenannte Challenge zu induzieren. Diese manifestierte sich am folgenden Tag als Ohrschwellung. Die topische Behandlung der Tiere begann ab dem 19. Tag über einen Zeitraum von neun Tagen.

### **3.4.2 Untersuchungen zur Migration dendritischer Zellen im TDI-Kontaktallergiemodell**

#### **3.4.2.1 Sensibilisierung**

Im Sensibilisierungsversuch wurden zunächst unbehandelte Mäuse über einen Zeitraum von neun Tagen topisch mit den zu testenden Substanzen Sphingosin-1-Phosphat (S1P), FTY720 und SEW2871 behandelt. Hierfür gab es drei Gruppen mit jeweils sechs Tieren sowie eine Vehikelkontrolle und eine unbehandelte Kontrollgruppe als Negativkontrolle. Die Testsubstanzen wurden in Methanol gelöst (100 µg S1P bzw. SEW2871 in 80 µl Methanol und 10 µg FTY720 in 80 µl Methanol) und den Mäusen jeweils auf die Innen- und Außenseite des rechten Ohres aufgetragen.

Diese Behandlung erfolgte an den ersten drei Behandlungstagen einmal täglich und an den weiteren sechs Tagen zweimal täglich. Die Vehikelgruppe wurde nach dem gleichen Behandlungsschema mit Methanol behandelt. An den letzten drei Behandlungstagen wurden die behandelten Mausohren zusätzlich mit 20 µl einer 0,5 %igen TDI-Lösung sensibilisiert. Vor der ersten und 24 Stunden nach der letzten TDI-Gabe wurden die Ohrdicken mit einem Cutimeter gemessen. Anschließend wurden die Tiere mittels zervikaler Dislokation bzw. zur Blutgewinnung durch Kehlschnitt nach CO<sub>2</sub>-Betäubung getötet. Im Plasma wurden die S1P-Konzentration sowie die Anzahl an weißen Blutkörperchen bzw. Lymphozyten bestimmt. Mit den regionalen Lymphknoten wurde ein *Local-Lymph-Node-Assay* (LLNA) durchgeführt. Dafür wurde eine Zellsuspension aus den Lymphknoten hergestellt und die Gesamtzellzahl ermittelt. Ein Aliquot der mittels LLNA gewonnenen Zellsuspension

wurde in einer FACS-Analyse auf die Oberflächenmoleküle CD 11c und CD 40 untersucht. Ein weiteres Aliquot der Zellsuspension wurde kultiviert und mit Concanavalin A (ConA) stimuliert. Nach 48 Stunden wurden die Überstände genommen und mittels ELISA die Zytokine IL-6 und IFN- $\gamma$  gemessen. Die behandelten Ohren wurden in dorsale und ventrale Ohrhälften getrennt und es erfolgte ein *Skin-DC-Migration-Assay* sowie die immunhistochemische Darstellung von MHC-II<sup>+</sup>-Zellen in der Epidermis. Alle Versuche wurden in mindestens zwei unabhängigen Anläufen durchgeführt.

### **3.4.2.2 Challenge**

In der Challengephase wurden die Tiere zunächst wie unter 3.4.1 beschrieben vorbereitet und sensibilisiert. Die Mäuse wurden in vier Gruppen zu je sechs Tieren eingeteilt. Auch hier wurde eine unbehandelte Kontrollgruppe mitgeführt. Die Behandlung der Tiere begann ab dem 19. Tag der Sensibilisierung und erstreckte sich über einen Zeitraum von neun Tagen. S1P und FTY720 wurden wie oben beschrieben in Methanol gelöst und jeweils auf die Innen- und Außenseiten des rechten Ohres aufgetragen. Die Behandlung erfolgte auch hier an den ersten drei Behandlungstagen einmal täglich und an den weiteren sechs Tagen zweimal täglich. Eine Stunde vor der letzten Applikation der Testsubstanzen wurden die Mausohren mit 20  $\mu$ l 0,5 % TDI behandelt, wodurch eine allergische Entzündung induziert wurde. Die Ohrdicken der Mäuse wurden mit einem Cutimeter eine Stunde vor sowie 24 Stunden nach der TDI-Applikation bestimmt. Anschließend wurden die Tiere mittels zervikaler Dislokation getötet und ein LLNA sowie die Stimulierung der Lymphknotenzellen mit Concanavalin A und anschließender Bestimmung des Zytokins IL-6 durchgeführt. Die Ohren wurden in die dorsale und ventrale Ohrhälfte getrennt und anschließend ein *Skin-DC-Migration-Assay*, eine histologische Untersuchung, die immunhistochemische Darstellung von MHC-II<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> und GR-1<sup>+</sup> sowie die Bestimmung des Zytokins IL-1 $\beta$  durchgeführt. Alle Versuche erfolgten in mindestens zwei unabhängigen Anläufen.

**Tabelle 3-1: Behandlungsschema in der Sensibilisierung; X = 1xtächlich, XX = 2xtächlich**

S1P/FTY720/SEW2871/Veh.	X	XX	XX	XX	XX	XX	XX
Tag	1-3	4	5	6	7	8	9
TDI					X	X	X

**Tabelle 3-2: Behandlungsschema in der Challenge; X = 1xtächlich, XX = 2xtächlich**

S1P/FTY720/Veh.		X		XX	
Tag	1-4	19-21	21	22-27	28
TDI	X		X		X

### 3.4.3 *Mouse-Ear-Swelling-Test (MEST)*

Das Prinzip des MEST beruht auf der Erfassung der Ohrdicke vor und nach TDI-Gabe, welche eine entzündliche Ohrschwellungsreaktion hervorruft. Mit den Messungen konnte eine qualitative Aussage über die TDI-induzierte allergische Reaktion und ihre Inhibition durch die Testsubstanzen getroffen werden. Anhand der Vehikelkontrollen konnte der Effekt der Testsubstanzen verglichen werden. Die Messung der Ohrdicke erfolgte mit einem Cutimeter von Mitutoyo in Anlehnung an GAD et al. (1986) eine Stunde vor sowie 24 Stunden nach der TDI-Applikation. Die Differenz der Werte ergab die tatsächliche Ohrschwellung.

#### **3.4.4 Local-Lymph-Node-Assay (LLNA)**

Beim LLNA wurde das Gewicht sowie die Gesamtzellzahl der regionalen Lymphknoten bestimmt und als weiterer immunologischer Parameter gewertet (EHLING et al. 2005). Das Prinzip des LLNA beruht auf der Messung der Proliferationsrate der T-Zellen nach deren Stimulierung durch antigenpräsentierende Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurden den Versuchstieren *post mortem* die regionalen Lymphknoten (*Lnn. auriculares*) der behandelten Ohrseite (S1P, FTY720 und Vehikel) bzw. der unbehandelten Kontrollohren entnommen. Diese wurden zunächst jeweils in ein Well einer 24-Well-Platte mit PBS gelegt und schließlich vom umgebenden Gewebe befreit und mit einer Feinwaage gewogen. Danach wurde von jedem Lymphknoten eine Zellsuspension hergestellt und die Gesamtzellzahl ermittelt. Die Lymphknoten wurden hierfür in jeweils 500 µl PBS aufgenommen und in einem Homogenisator mit einem Glaspistill homogenisiert. Die so gewonnene Zellsuspension wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 500 g und 4°C für zehn Minuten zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstands wurde das Zellpellet in 1 ml RPMI-Medium resuspendiert. Anschließend wurden von jeder Probe 10 µl entnommen und mit 90 µl Trypanblau (1:10) gemischt. Das Zell-Trypanblau-Gemisch wurde auf eine Neubauerzählkammer pipettiert und die Gesamtzellzahl unter dem Mikroskop durch Auszählen aller vier Felder bestimmt. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde in einer FACS-Analyse auf die Oberflächenmoleküle CD 11c und CD 40 (= eingewanderte Haut-DC) untersucht. Ein weiteres Aliquot der mittels LLNA gewonnenen Zellsuspension wurde sowohl in der Sensibilisierung wie auch in der Challenge kultiviert und mit ConA stimuliert.

##### **3.4.4.1 In-vitro-Stimulierung der Lymphknoten-Zellen mit Concanavalin A**

Von der durch LLNA gewonnenen Zellsuspension wurden von jeder Probe  $5 \times 10^5$  Zellen entnommen, in jeweils ein Well einer 48-Well-Platte überführt und mit RPMI-Medium auf 500 µl aufgefüllt. Zu jeder Probe wurden 2 µg/ml ConA gegeben und resuspendiert. ConA fungierte hierbei als Mitogen, welches die T-Lymphozyten stimuliert. 48 Stunden nach der Stimulierung wurden die Überstände

entnommen und in Eppendorff-Röhrchen überführt. Bis zur Messung der Zytokine IL-6 und IFN- $\gamma$  mittels ELISA wurden die Proben bei -20°C gelagert.

### **3.4.5 Skin-DC-Migration-Assay**

Um den Einfluss von S1P und FTY720 auf das Migrationsverhalten der dendritischen Zellen (DC) aus dem Gewebe in das umgebende Medium zu untersuchen, wurde ein *Skin-DC-Migration-Assay* durchgeführt (BÄUMER et al. 2006). Das Prinzip des *Skin-DC-Migration-Assays* beruht auf der Auswanderung der DC aus der Epidermis bzw. Dermis von Mäusen (ORTNER et al. 1996).

Die im TDI-Kontaktallergiemodell behandelten Mausohren wurden *post mortem* abgetrennt und zunächst für 10 Minuten in 70 % Ethanol desinfiziert. Nach Trennung der dorsalen von der ventralen (knorpeligen) Ohrhälfte wurde die dorsale Ohrhälfte mit der Epidermis nach oben auf ein dreibeiniges, feinmaschiges Gitternetz ausgebreitet und in einer 24-Well-Platte mit GK-Medium überschichtet. Die Ohren wurden über drei Tage im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert, wobei täglich ein Mediumwechsel stattfand. Die Medien von Tag zwei und drei wurden an Tag drei gepoolt und bei 1000 g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Dekantierung des Überstands wurde das Zellpellet im verbleibenden Restvolumen resuspendiert und die Zellzahl mit einer Neubauerkammer mikroskopisch bestimmt.

Die Anzahl der ausgewanderten Zellen pro Ohr errechnet sich nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Gezählte Zellen} \times 3 \times 10\,000 \times \text{Restvolumen [ml]}}{4} = \text{ausgewanderte Zellen/Ohr}$$

Die dorsalen Ohrhälften wurden kurz getrocknet, mit einer Feinwaage gewogen und anschließend bei -80°C eingefroren.

Die Anzahl migrierter Zellen pro mg Ohrgewebe wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Ausgewanderte Zellen/Ohr}}{\text{Ohrgewicht [mg]}} = \text{ausgewanderte Zellen/mg Ohrgewebe}$$

### **3.4.6 Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)**

Bei der FACS-Analyse handelt es sich um ein Verfahren der Durchflusszytometrie zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Grundlage der Analyse ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, bei welcher das zu untersuchende Antigen (z.B. Zelloberflächenmarker) mittels eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers detektiert wird. Das Prinzip der Untersuchung beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Aliquot der aus dem LLNA gewonnenen Zellen auf die Oberflächenmoleküle CD 11c und CD 40 (= eingewanderte Haut-DC) untersucht. Somit konnte die Menge der aus der Haut in den Lymphknoten eingewanderten DC quantifiziert werden (BÄUMER et al. 2006) und der Einfluss der Testsubstanzen auf die Anzahl der CD 11c /CD 40 doppelpositiven Zellen im Lymphknoten ermittelt werden. Für die Doppelfärbung wurden 500 000 Zellen der Lymphknotenzellsuspension entnommen und bei 600 g für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Aufnahme des Zellpellets in 200 µl PBS/BSA-Lösung (10 mg/10 ml) wurde die Zellsuspension in eine *roundbottom*-Mikrotiterplatte überführt, erneut zentrifugiert (600 g, 5 Minuten, 4°C) und die Überstände wurden abgeschüttet. Nach einem weiteren Waschvorgang wurden die Zellen mit den Antikörpern für 30 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Danach erfolgten zwei weitere Waschschrte wie oben beschrieben und schließlich die Aufnahme der erhaltenen Zellpellets in 300 µl PBS. Nach Durchführung der FACS-Analyse wurden die Daten mit der Expo 32 ADC Analysis Software ausgewertet und als Säulendiagramme dargestellt.



### 3.4.7 Immunhistochemische Darstellung von MHC-II<sup>+</sup>-Zellen

Der Einfluss von S1P und FTY720 auf die Migration der DC wurde weiterhin anhand der Dichte der Langerhans-Zellen in der Ohrepidermis bestimmt. Die Ohren wurden nach BÄUMER et al. (2005) vorbereitet. Nach Trennung der Mausohren in die dorsale und die ventrale Ohrhälfte wurde die ventrale Hälfte für einige Tage bei -80°C eingefroren. Nach Wiederauftauen erfolgte eine Inkubation der Ohrhälften in 3,8 %iger Ammoniumthiocyanatlösung (mit PBS) im Hybridisierungssofen für zehn Minuten bei 37°C. Danach wurden die Ohrhälften mit TBS gewaschen und die Epidermis mit Hilfe eines Skalpell von der Dermis gelöst. Die Epidermis der Ohren wurde jeweils in ein Well einer 48-Well-Platte gelegt, mit PBS-Puffer bedeckt und für fünf Minuten auf einem Tischschüttler geschwenkt. Der PBS-Puffer wurde dreimal hintereinander alle fünf Minuten gewechselt. Der MHC-II<sup>+</sup>-Antikörper wurde in TBS mit 0,17 % Triton X im Verhältnis 1:100 gelöst. Danach wurden 200 µl der Antikörperlösung in jedes Well gegeben und die Platte über Nacht auf einem Schüttler im Kühlschrank bei 7°C inkubiert. Am folgenden Tag erfolgte die Fluoreszenzfärbung der MHC-II<sup>+</sup>-Zellen mit Streptavidin Cy3. Dafür wurde die Epidermis eines jeden Ohres zunächst dreimal hintereinander alle fünf Minuten mit TBS gewaschen und daraufhin wurden 200 µl des Streptavidin Cy3 im Verhältnis 1:4000 mit TBS in jedes Well gegeben. Die Platte wurde nun abgedunkelt für 90 Minuten auf einem Schüttler inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit TBS wurden die Epidermisproben für einige Minuten in eine Petrischale mit bidestilliertem Wasser gelegt und von dort mit Hilfe eines Pinsels auf Adhäsionsobjektträger aufgezogen. Nach Trocknen der Epidermis auf den Objektträgern wurden diese für drei Tage in Toluol gestellt und danach mit Entellan<sup>®</sup> und Deckgläschen eingedeckt. Die Auswertung der MHC-II<sup>+</sup>-Zellen in der Haut erfolgte nach der Methode von RATZINGER et al. (2002) an einem Fluoreszenzmikroskop mit integrierter Kamera. Von jedem Schnitt wurden mit einer 20-fachen Vergrößerung 16 Bilder angefertigt und die Anzahl der MHC-II<sup>+</sup>-Zellen mit Hilfe des Programms Axio Vision Rel. 4.6 ausgezählt. Anschließend erfolgte die Berechnung der MHC-II<sup>+</sup>-Zellen pro 1 mm<sup>2</sup> Epidermis.

### **3.4.8 Immunhistochemische Darstellung von CD3<sup>+</sup>- und GR-1<sup>+</sup>-Zellen**

Für die Gefrierschnitte wurden die behandelten Mausohren in flüssigem Stickstoff bei -196°C gefroren und dann in Tissue Freezing Medium eingebettet. An einem Kryotom wurden 7 µm dicke Schnitte angefertigt und anschließend bei -20°C in Aceton fixiert. Die Schnitte wurden mit der Alkaline Phosphatase Anti-Alkaline Phosphatase (APAAP)-Technik gefärbt. Es wurden Antikörper gegen CD3<sup>+</sup> (T-Zellen) und GR-1<sup>+</sup> (Neutrophile Granulozyten) verwendet (BÄUMER et al. 2004). Nach Inkubation mit den primären Antikörpern und nachfolgendem Waschschrift mit TBS wurden die Schnitte zunächst mit dem *bridging* Antikörper (rat anti-mouse immunoglobulin G, Z494) und nach einem weiteren Waschschrift mit dem APAAP-Komplex inkubiert. Fast Blue diente hierbei als Substrat für die Alkalische Phosphatase. Die Gegenfärbung der Proben erfolgte mit Hämalaun. Der Zellinflux wurde in einem semiquantitativen Verfahren anhand eines Scoresystems (0 = kein bzw. ggr. Zellinflux bis 3 = hgr. Zellinflux) ausgewertet.

### **3.4.9 Proteinextraktion**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration und anschließender Messung des Zytokins IL-1β wurden die behandelten Ohren sowie die Kontrollohren *post mortem* abgetrennt und in die dorsalen und ventralen Ohrhälften getrennt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von BRADFORD (1976). Dazu wurde ein kommerzielles Kit (*Biorad protein assay*) verwendet. Um die Degradierung der Proteine auf ein Minimum zu reduzieren, erfolgten alle Arbeitsschritte der Extraktion auf Eis und mit gekühlten Puffern.

### **3.4.10 Bestimmung der IL-6-, IFN-γ und IL-1β-Konzentration mittels ELISA**

Zur Bestimmung der Konzentrationen von IL-6 und IFN-γ nach Stimulierung der Lymphknoten-Zellen mit ConA bzw. von IL-1β in der Haut nach Proteinextraktion wurde ein enzymgebundener Immunadsorptionstest (ELISA, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) verwendet. Es handelt sich dabei um einen

Enzymimmunoassay, mit welchem geringste Mengen an Peptiden nachgewiesen werden können, wobei es zu einer Wechselwirkung zwischen Antigen und Antikörper kommt. Die Quantifizierung der Zytokingehalte in den Proben erfolgte mit einer photometrischen Extinktionsmessung bei 450 nm. Der ELISA wurde in einer 96-Well-Platte (Nunc) durchgeführt. Bei jedem Messansatz wurde eine Standardreihe mitgeführt.

### **3.4.11 Histologie**

Zur histologischen Untersuchung der behandelten Mausohren und der Kontrollohren wurden Paraffinschnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Die Ohren wurden *post mortem* abgetrennt und ein ca. 2 mm breiter Streifen aus der Mitte eines jeden Ohres bis zur weiteren Verarbeitung in Bouin`scher Lösung fixiert. Die Entwässerung der Gewebestreifen erfolgte über eine aufsteigende Alkoholreihe (45 Minuten in 80 %igem Ethanol, zwei Stunden in 96 %igem Ethanol und zwei Stunden in 100 %igem Ethanol). Anschließend wurden die entwässerten Proben für ca. drei Stunden in Xylol überführt und mit 60°C heißem Paraffin durchtränkt. Nach 12 Stunden wurden die Proben in Paraffinblöckchen eingebettet, mit einem Mikrotom ca. 7 µm dick geschnitten und auf Objektträger gebracht. Anschließend wurde das Material entparaffiniert und im Färbeautomaten nach HE gefärbt. Die sichtbaren Entzündungszeichen wie Zellinflux, Ödematisierung und Mikroabszesse wurden nach einem Scoresystem ausgewertet und auf Unterschiede zwischen den S1P-Rezeptor-Agonist- bzw. Vehikel-behandelten Ohren und den Kontrollohren untersucht.

### **3.4.12 Bestimmung der Blutplasmakonzentration von S1P**

Von jeweils sechs Vehikel- und S1P-Rezeptor-Agonist-behandelten Mäusen wurden nach CO<sub>2</sub>-Betäubung durch einen Kehlschnitt Blut gewonnen. Das Blut wurde in heparinisierte Röhrchen aufgefangen und anschließend bei 3000 g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Die Messung der Blutplasmakonzentration von S1P erfolgte in Anlehnung an RUWISCH et al. (2001). 100 µl des Plasmas wurden jeweils mit

900 µl PBS verdünnt. Dann wurde je Probe 1 ml Methanol, welches 2,5 µl konzentrierte Salzsäure (HCl) enthielt, sowie als interner Standard Dihydro-S1P (50 pmol) hinzugefügt. Die Lipide wurden durch Zugabe von 1 ml Chloroform und 200 µl 4 M NaCl extrahiert. Weiterhin wurden 100 µl 3 N NaOH zur Alkalisierung hinzugegeben. Die alkalische, wässrige Phase wurde in silikonisierte Glasröhrchen überführt, die organische Phase wurde mit 0,5 ml Methanol, 0,5 ml 1 M NaCl, und 50 µl 3 N NaOH re-extrahiert. Dann wurde die wässrige Phase mit 100 µl konzentrierter HCl angesäuert und zweimal mit 1,5 ml Chloroform extrahiert. Die organische Phase wurde verdampft und die getrockneten Lipide in 275 µl Methanol/0,07 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (9:1) gelöst. Ein Derivatisierungsgemisch aus 10 mg Ophthaldialdehyde, 200 µl Ethanol, 10 µl 2-Mercaptoethanol und 10 µl 3 % Borsäure wurde angefertigt und mit KOH auf einen pH-Wert von 10,5 eingestellt. 25 µl dieser Lösung wurden für 15 Minuten bei Raumtemperatur zu den gelösten Lipiden gegeben und die Derivate mit einem Merck Hitachi LaChrom 842 HPLC System analysiert. Die Separation erfolgte durch Methanol und 0,07 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Die Ergebnisse wurden mittels der Merck System Manager Software ausgewertet. Dihydro-S1P wurde als interner Standard mitgeführt.

### **3.4.13 Bestimmung der Anzahl an weißen Blutkörperchen und Lymphozyten im Blut**

Von jeweils sechs Vehikel- und S1P-Rezeptor-Agonist-behandelten Mäusen wurde Blut in heparinisierte Röhrchen aufgefangen und die Anzahl an weißen Blutkörperchen bzw. Lymphozyten im Blut mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Ergebnisse wurden mit einem speziellen Veterinär-Software-Paket ausgewertet (Advia 120, Siemens Medical Solutions Diagnostics), das auch für Mäuseblut validiert ist.

## 3.5 *In-vitro*-Versuche

### 3.5.1 Migrations-Assay

In einem Migrations-Assay wurde der Einfluss der S1P-Antagonisten W146 und VPC23019 auf die Migration dendritischer Zellen gemessen. Aus dem Knochenmark von Mäusen generierte DC wurden entsprechend eines Standard-Protokolls mit murinem GM-CSF-Medium kultiviert (LUTZ et al. 1999). Für den Migrations-Assay wurde ein *Transwell-System*, bestehend aus einer 12-Well-Polystyrol-Platte und Inserts mit 8,0 µm Porengröße, verwendet.

Aufgrund von Unstimmigkeiten in der Literatur ob immature DC gleichermaßen wie mature DC auf S1P antworten (RENKL et al. 2004; CZELOTH et al. 2005), wurde die Hälfte der DC mit LPS (500 ng/ml) stimuliert und der Migrations-Assay mit immaturren und maturaen DC im Verhältnis 1:1 durchgeführt. Die DC werden durch S1P, welches sich in dem unteren Kompartiment befindet, chemotaktisch angelockt und migrieren durch die Poren aus den Inserts in die Wells. Anschließend wird die Anzahl der migrierten Zellen ausgewertet.

Für die Migrationsversuche wurden die generierten DC an Tag 10 der Kultur ausgezählt und ein Teil der Zellen jeweils mit 1 µmol/l W146 bzw. 1 µmol/l VPC23019 für 30 Minuten im Brutschrank präinkubiert. Die Konzentrationen wurden gewählt, da die  $K_i$  Werte beider Antagonisten bezogen auf S1P1 im niedrig nanomolaren Bereich liegen (DAVIS et al. 2005; SANNA et al. 2006). Zur Hemmung von S1P1 werden somit hohe Konzentrationen der Antagonisten eingesetzt, wobei VPC23019 aufgrund der hinzukommenden S1P3 Hemmung eine zusätzliche Wirkung hat.

In die Wells der 12-Well-Platte wurde 1 µmol/l S1P bzw. in der Kontrollgruppe nur RPMI-Medium gegeben. Die Inserts wurden in die Wells eingesetzt und darauf 200 000 Zellen in 200 µl Volumen (nur RPMI-Medium bzw. präinkubiertes Zellmedium) pipettiert. Die Platte wurde anschließend für 90 Minuten im Brutschrank inkubiert.

Der Migrations-Assay bestand somit aus 4 Gruppen zu je 4 Wells:

Gruppe 1: Kontrolle

Well: RPMI-Medium

Insert: 200 000 Zellen in RPMI-Medium

Gruppe 2: S1P

Well: S1P 100 nmol/l

Insert: 200 000 Zellen in RPMI-Medium

Gruppe 3: W146

Well: S1P 100 nmol/l

Insert: 200 000 Zellen, mit W146 präinkubiert

Gruppe 4: VPC 23019

Well: S1P 100 nmol/l

Insert: 200 000 Zellen, mit VPC 23019 präinkubiert

Nach 90 Minuten wurden die Inserts entfernt, die Flüssigkeit aus den Wells in Eppendorfgefäße überführt und für 10 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Nach Dekantierung des Überstands wurde das Zellpellet im verbleibenden Restmedium resuspendiert und die Anzahl der durch die Inserts in die Wells migrierten DC in der Neubauerkammer mikroskopisch bestimmt. Das verbliebene Restvolumen wurde ebenfalls bestimmt.

Die Anzahl der ausgewanderten Zellen errechnet sich nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Gezählte Zellen} \times 3 \times 10\,000 \times \text{Restvolumen [ml]}}{4} = \text{ausgewanderte DC/ml}$$

4

## **3.5.2 Kultivierung von Primärzellreihen caniner Keratinozyten**

### **3.5.2.1 Isolierung der Zellen aus Hautproben**

An der Klinik für Kleintiere der Tierärztlichen Hochschule Hannover wurden in der Hautsprechstunde ca. 2 cm<sup>2</sup> große Hautstücke aus der Abdominalregion gesunder euthanasierter Hunde entnommen. Die betroffenen Hautareale wurden vor der Entnahme rasiert und jodiert.

Der Transport der Hautproben zum Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie erfolgte in Williams-Medium E (1). Durch die hohe Konzentration an antibiotisch und antimykotisch wirksamen Substanzen war auch eine kurzfristige Lagerung bis zu acht Stunden in diesem Medium möglich.

Zur Isolierung der Keratinozyten wurde zunächst unter sterilen Bedingungen das Unterhautfettgewebe mit dem Skalpell entfernt und die Haut in ca. 5 mm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten und schließlich in Williams-Medium E (1) gewaschen. Daraufhin wurden die Proben für 16 Stunden mit der Epidermis nach oben und für weitere vier Stunden mit der Epidermis nach unten bei 4°C in trypsinhaltigem Williams-Medium E (2) inkubiert. Für die Inkubation wurden 6-Well-Kulturplatten verwendet, wobei pro Well bis zu drei Hautstücke in 2 ml Medium (2) platziert werden konnten. Nach 20 Stunden erfolgte die vorsichtige Ablösung der Epidermis von der Dermis mit Hilfe einer Pinzette und eines sterilen Skalpells. Die Epidermisstücke wurden zweimal in Williams-Medium E (3) gewaschen (welches sich durch einen geringeren Anteil an Antibiotika und Antimykotika auszeichnet als das Medium 1) und nach Dekantierung des Medium 3 mit einer Schere weiter zerkleinert. Anschließend wurden 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung zu den Epidermisstreifen hinzupipettiert und die Suspension für 30 Minuten bei Raumtemperatur und gleichmäßiger Durchmischung inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension gesiebt und mit ca. 5 ml Medium 3 nachgespült. Die erhaltene Lösung wurde bei 1000 g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und das Zellpellet nach Dekantierung des Überstands in 1 ml Williams-Medium E (3) resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen anschließend in einer Dichte von 1,0-1,8 x 10<sup>6</sup> Keratinozyten je Kulturflasche ausgesät.

Um zu klären, ob die Keratinozyten atopischer Hunde empfindlicher auf Aktivierung (z.B. via *Toll-like-2* und 4-Rezeptoren) reagieren oder ob Keratinozyten atopischer Hunde bereits spontan erhöhte Sekretion von IL-8 aufweisen, wurden in einer Pilotstudie 6 mm große Hautstanzen aus der Abdominalregion von zwei lebenden atopischen Hunden entnommen. Die Proben wurden entsprechend aufbereitet. Aufgrund der geringeren Ausbeute an Zellen erfolgte hier zunächst die Aussaat der gesamten Zellsuspension in ein Well einer 6-Well-Kulturplatte. Die Subkultivierung erfolgte in einer Kulturflasche.

Die caninen Keratinozyten wurden bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Ein Mediumwechsel mit Medium 3 erfolgte jeweils nach drei Tagen. Die Zellen wurden bis zu 30 Mal passagiert.

### **3.5.2.2 Subkultivierung**

Eine Subkultivierung der normalen und der atopischen Keratinozyten erfolgte, sobald der Kulturflaschenboden konfluent bewachsen war. Hierfür wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen zunächst für 30 Sekunden mit 2 ml sterilem PBS und nach Absaugen des PBS für 5-7 Minuten mit 2 ml EDTA-Lösung je Kulturflasche bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen der Lösung wurden die Zellen für weitere 10 Minuten mit 1,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung je Kulturflasche bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Den abgelösten Zellen wurden 4 ml Williams-Medium E (4) hinzugefügt und die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Zentrifugation erfolgte für 10 Minuten bei 1000 g und 4°C. Danach wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 1 ml Williams-Medium E (4) resuspendiert. Nach Zugabe von weiteren 4 ml Williams-Medium E (4) wurde die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellzahl pro Flasche berechnet. Daraufhin erfolgte die Aussaat der Zellen in einer Dichte von  $2,5 \times 10^5$  Keratinozyten je Kulturflasche.

Ein Mediumwechsel erfolgte am nächsten Tag, hierfür wurde das alte Medium abgesaugt und 5 ml neues Williams-Medium E (4) hinzugefügt.



### **3.5.2.3 Lagerung caniner Keratinozyten**

Das Einfrieren der Zellen erfolgte frühestens ab der 3. Passage. Konfluent bewachsene Kulturflaschen wurden wie für die Subkultivierung beschrieben mit EDTA und Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert und dann ebenfalls für 10 Minuten bei 1000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 1 ml glycerinhaltigem Williams-Medium E (5) (Einfriermedium) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein CRYO-Röhrchen überführt und es folgte das fraktionierte Einfrieren bei -20°C für ein bis zwei Stunden, bei -80°C für ein bis zwei Stunden und schließlich in N<sub>2</sub> (l) bei -196°C, in welchem sie auch gelagert wurden.

### **3.5.3 Stimulation muriner und caniner Keratinozyten mit *Toll-like*-Rezeptor-Agonisten**

Zur Stimulation der Keratinozyten müssen diese zunächst auf eine 96-Well-Platte ausgesät werden. Hierfür wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.5.2.2 abgelöst, zentrifugiert und in 5 ml Williams-Medium E (4) resuspendiert. Nach Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden die Zellen in einer Dichte von 20 000 Zellen / Well ausgesät und im Brutschrank inkubiert.

Um den Einfluss des Sphingosin-1-Phosphats auf murine und canine Keratinozyten beurteilen zu können, wurden unterschiedliche Verdünnungsstufen von S1P hergestellt. Hierfür wurden zunächst 3 mg S1P-Pulver in 6 ml Methanol gelöst und für vier bis sechs Stunden im Hybridisierungssofen bei 60°C inkubiert. Die Lösung wurde ca. halbstündlich für einige Minuten auf einem Tischschüttler sowie bei schlechter Löslichkeit zusätzlich für einige Minuten im Ultraschallbad inkubiert. Daraufhin wurden 50 µl des gelösten S1P (0,5 mg/ml) in ein silikonisiertes Gefäß gegeben und das Methanol vollständig verdampft. Das S1P wurde dann in 250 µl steriler, 0,4 %iger BSA-Lösung gelöst und für 10 Minuten auf Eis in ein Ultraschallbad gegeben, um erneut eine homogene Lösung zu erhalten. Unter der Sterilbank wurde von dem S1P eine 0,1 / 1 / 5 und 10 mikromolare Lösung hergestellt.

Sobald der Boden der Wells konfluent bewachsen war, erfolgte die Behandlung der Keratinozyten mit den unterschiedlichen Verdünnungsstufen des S1P über vier Tage. Hierfür wurde das alte Medium abgesaugt und die Wells einmal pro Tag mit jeweils 100 µl S1P-Lösung laut Schema behandelt. Am vierten Tag erfolgte zusätzlich die Behandlung der Zellen mit Lipopolysaccharid (LPS) und Peptidoglykan (PGN). LPS fungiert dabei als *Toll-like-Rezeptor-4*-Aktivator, während PGN den *Toll-like-Rezeptor-2* anregt. Zunächst wurden 50 µl LPS (10 mg/ml) und 100 µl PGN (10 mg/ml) für fünf Minuten in ein Ultraschallbad gegeben um eine homogene Mischung zu erhalten. Daraufhin wurden die 50 µl LPS und die 100 µl PGN in jeweils 5 ml RPMI bzw. WE-Medium gelöst und die Zellen laut Schema mit jeweils 100 µl dieser Lösungen behandelt. Nach jeder Behandlung der Zellen erfolgte die Inkubation im Brutschrank. Um die LPS bzw. PGN-induzierte IL-8-Sekretion beurteilen zu können, wurde eine unbehandelte Kontrolle (Ko) mitgeführt.

Behandlungsschema auf der 96-Well-Platte (jeweils 6 Wells/Gruppe):

Ko	LPS	S1P 1 µmol/l +LPS	S1P 5 µmol/l +LPS	S1P 10 µmol/l +LPS	PGN	S1P 0,1 µmol/l +PGN	S1P 1 µmol/l +PGN	S1P 5 µmol/l +PGN	S1P 10 µmol/l +PGN
----	-----	----------------------------	----------------------------	-----------------------------	-----	------------------------------	----------------------------	----------------------------	-----------------------------

Vierundzwanzig Stunden nach der LPS bzw. PGN-Behandlung wurden von jedem Well 200 µl Überstand entnommen und bis zur weiteren Untersuchung bei -20°C gelagert.

Als Messparameter dienten IL-8 beim Hund und das IL-8 Analogon KC bei der Maus, welche im ELISA gemessen wurden.

Als weiterer S1P-Rezeptor-Agonist wurde FTY720 eingesetzt. Die Behandlung der murinen und caninen Keratinozyten erfolgte hier nach demselben Schema wie bereits für S1P beschrieben. Aufgrund der Wirksamkeit von FTY720 im nanomolaren Bereich unterscheiden sich lediglich die Verdünnungsstufen. Unter der Sterilbank wurde von dem FTY720 eine 0,01 / 0,1 / 0,5 und 1 mikromolare Lösung hergestellt.

### **3.5.4 Bestimmung der IL-8- bzw. der KC-Konzentration in Zellkulturüberständen mittels ELISA**

Zur Bestimmung der Konzentrationen von IL-8 beziehungsweise von murinem KC in Zellkulturüberständen wurde ein enzymgebundener Immunadsorptionstest (ELISA) verwendet. Der ELISA wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### **3.5.5 Statistische Auswertung**

Alle Versuche wurden in mindestens zwei unabhängigen Anläufen durchgeführt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte unter Angabe der Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardabweichung (S.D.). Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm GraphPadPrism. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen und den Kontroll- bzw. Vehikelgruppen wurden anhand einer parametrischen Varianz-Analyse (One-way-Anova) und anschließendem post-hoc-Test (Dunnetts Test) überprüft. Die Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % galt als schwach signifikant, die von 1 % als signifikant und die von 0,1 % als hoch signifikant. Zum Vergleich zweier Gruppen wurde der Mann-Whitney Rank Sum Test durchgeführt (Ohrschwellung). Die Einzelwerte der Ergebnisse sind in den Anhangstabellen aufgeführt.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Ergebnisse der *In-vivo*-Versuche**

#### **4.1.1 Einfluss der Testsubstanzen in der Sensibilisierungsphase**

Im TDI-Kontaktallergiemodell wurde die Wirkung der Testsubstanzen S1P, FTY720 und SEW2871 während der Sensibilisierung untersucht. Das genaue Behandlungsschema ist Kap. 3.4.2.1 zu entnehmen.

##### **4.1.1.1 Ergebnis des *Mouse-Ear-Swelling-Tests***

Im *Mouse-Ear-Swelling-Test* (MEST) wurden die Ohrdicken vor der ersten und 24 Stunden nach der letzten TDI-Gabe mit einem Cutimeter gemessen. In der Sensibilisierungsphase wurde durch die TDI-Applikation in keiner Behandlungsgruppe eine nennenswerte Ohrschwellung induziert. (Beispiel Ohrschwellung: Vehikel + TDI-behandelte Ohren:  $2 (\pm 14) \mu\text{m}$ , S1P + TDI-behandelte Ohren:  $3 (\pm 5) \mu\text{m}$ ). Bei der gewählten TDI-Konzentration handelt es sich also um eine nicht-irritative Dosierung. Die Einzelwerte der Ohrdicken der S1P-behandelten Gruppe sind in der Anhangstabelle 9.1 aufgeführt.

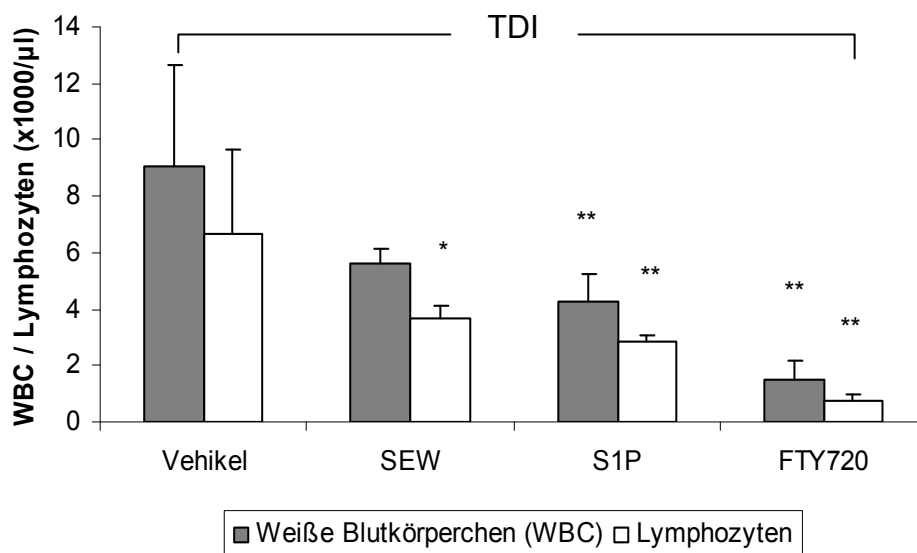
##### **4.1.1.2 Blutplasmakonzentration von S1P nach topischer Applikation**

Um mögliche systemische Effekte von S1P beurteilen zu können, wurde von sechs Mäusen, die über einen Zeitraum von neun Tagen topisch mit S1P behandelt wurden, sowie von sechs Vehikel-behandelten Mäusen die Blutplasmakonzentration von S1P gemessen. Die Tiere wurden 24 Stunden nach der letzten Behandlung mit S1P bzw. nach der dritten TDI-Sensibilisierung mittels CO<sub>2</sub>-Betäubung und anschließendem Kehlschnitt getötet. Anschließend wurde das S1P-Level im Plasma bestimmt. Es zeigte sich ein geringer aber schwach signifikanter Unterschied in der S1P-Plasmakonzentration zwischen der S1P- und der Vehikel-behandelten Gruppe

(Vehikel: 70 ( $\pm$  6) pmol/ml, S1P: 102 ( $\pm$  36) pmol/ml). Die Einzelwerte der Blutplasmakonzentrationen sind in Anhangstabelle 9.2 aufgeführt.

#### 4.1.1.3 Einfluss der Testsubstanzen auf die Anzahl an weißen Blutkörperchen und Lymphozyten im Blut

Vierundzwanzig Stunden nach der dritten Sensibilisierung mit TDI wurden die behandelten Tiere in zwei Versuchsdurchgängen mittels CO<sub>2</sub>-Betäubung und zur Blutgewinnung mittels anschließenden Kehlschnitts getötet. Anschließend wurde das Blut in heparinisierte Röhrchen aufgefangen und die Anzahl an weißen Blutkörperchen und Lymphozyten bestimmt. Da das Blut einiger Versuchstiere koaguliert und somit nicht auswertbar war, liegt die Anzahl der Versuchstiere bei n=3-6. Obwohl S1P im Plasma nur geringgradig erhöht ist, reduziert die topische Applikation von S1P sowie von FTY720 und SEW2871 die Anzahl der weißen Blutkörperchen und vor allem der Lymphozyten signifikant (Abbildung 4-1).



**Abbildung 4-1: Weiße Blutkörperchen und Lymphozyten [1000/µl] im Blut topisch mit S1P, FTY720 und SEW2871 behandelter Tiere**

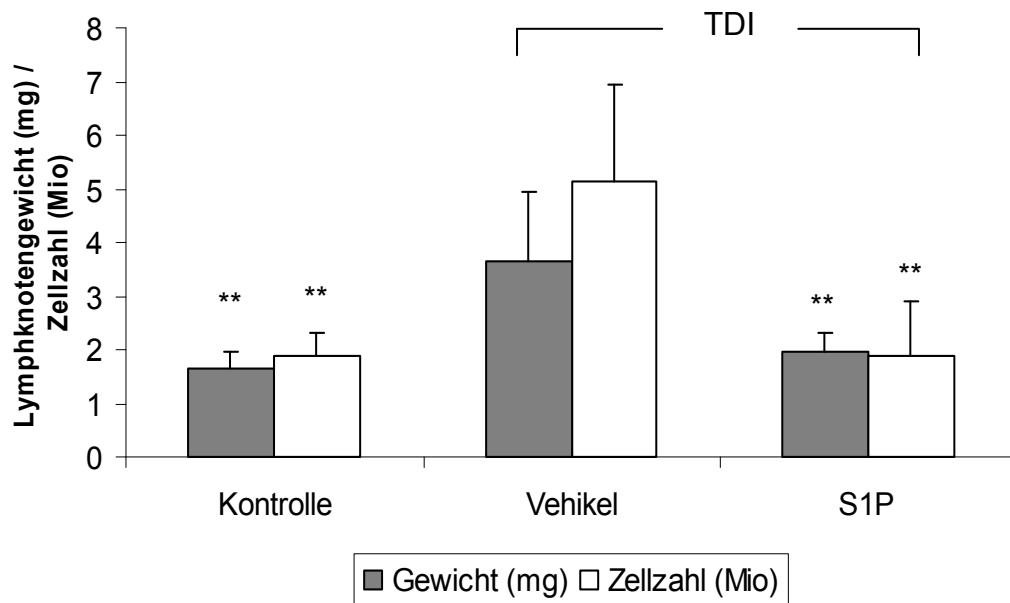
Signifikante Inhibition der Anzahl an weißen Blutkörperchen nach topischer Applikation von S1P und FTY720 über einen Zeitraum von neun Tagen im Vergleich zur Vehikel-behandelten Gruppe sowie schwach signifikante bzw. signifikante Inhibition der Anzahl an Lymphozyten im Blut SEW-, S1P- und FTY720-behandelter Tiere. Einzelwerte siehe Anhangstabelle 9.3; Darstellung der MW  $\pm$  S.D.; n=3-6, \*P<0.05, \*\*P<0.01.

#### **4.1.1.4 Ergebnis des *Local-Lymph-Node-Assays***

Nach Durchführung des MEST wurden die Tiere getötet und die regionalen Lymphknoten entnommen. Von jedem Lymphknoten wurden das Gewicht und die Gesamtzellzahl bestimmt. Die im *Local-Lymph-Node-Assay* (LLNA) gewonnenen Zellen wurden auf die Oberflächenmoleküle CD 11c und CD 40 untersucht und mit ConA stimuliert.

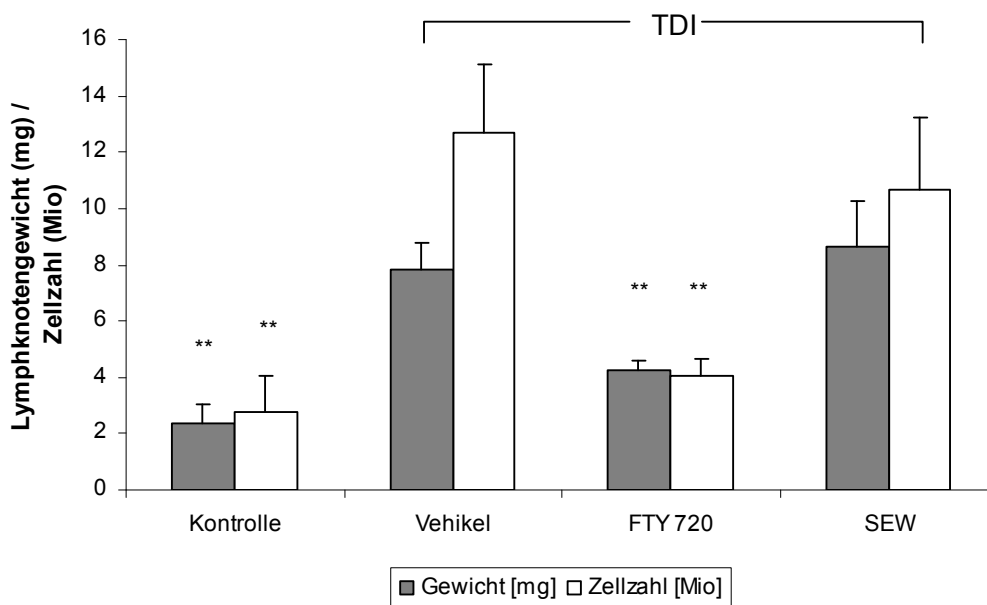
##### **4.1.1.4.1 Einfluss der Testsubstanzen auf das Lymphknotengewicht und die Zellzahl**

Die Abbildungen 4-2 und 4-3 zeigen, dass die topische Applikation von TDI im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe bei den Vehikel-behandelten Tieren zu einer signifikanten Zunahme des Lymphknotengewichts und der Gesamtzellzahl führt. Diese Zunahme konnte durch die topische Applikation von S1P und FTY720 signifikant gehemmt werden. Die topische Applikation des S1P1-Agonisten SEW2871 übt keinen signifikanten Effekt auf das Lymphknotengewicht und die Gesamtzellzahl aus. Da der regionale Lymphknoten eines S1P-behandelten Versuchstieres nicht präpariert werden konnte liegt die Anzahl der Versuchstiere hier bei n=5-6.



**Abbildung 4-2: Lymphknotengewicht [mg] und Zellzahl [Mio]**

Signifikante Inhibition des Lymphknotengewichts und der Zellzahl nach topischer Applikation von S1P über einen Zeitraum von neun Tagen im Vergleich zur Vehikel-behandelten Gruppe. Einzelwerte siehe Anhangstabelle 9.4; Darstellung der MW  $\pm$  S.D.; n=5-6, \*\*P<0.01.

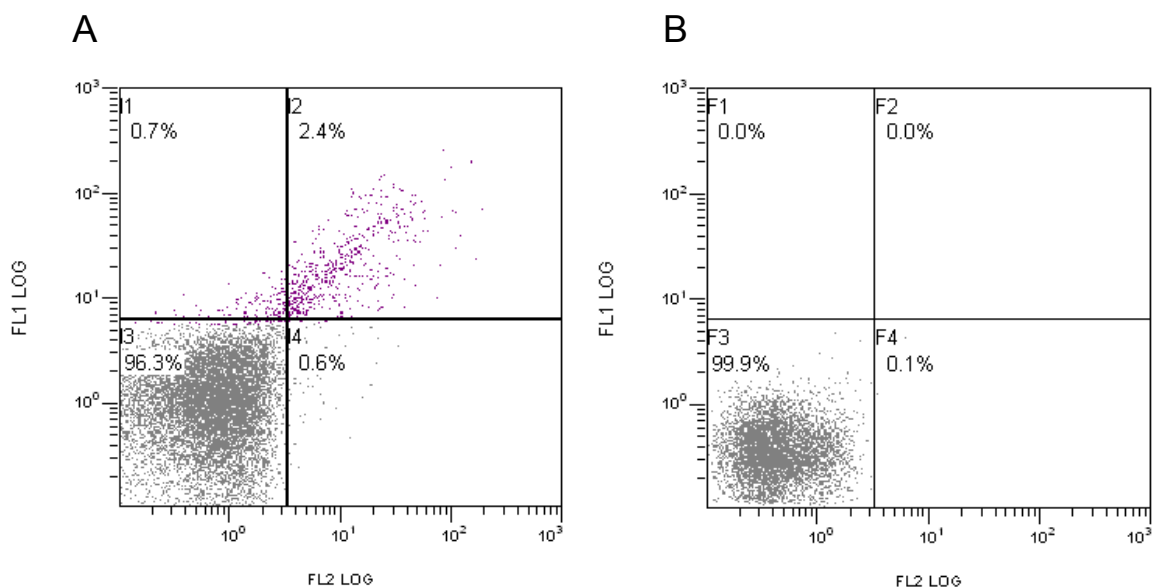


**Abbildung 4-3: Lymphknotengewicht [mg] und Zellzahl [Mio]**

Die TDI-induzierte T-Zellproliferation wird durch topische Applikation von FTY720 im Vergleich zur Vehikel-behandelten Gruppe signifikant gehemmt. SEW2871 übt keinen signifikanten Effekt auf das Lymphknotengewicht und die Zellzahl aus. Einzelwerte siehe Anhangstabelle 9.5; Darstellung der MW  $\pm$  S.D.; n=4, \*\*P<0.01.

#### 4.1.1.4.2 Einfluss der Testsubstanzen auf den Anteil der CD 11c<sup>+</sup>- und CD 40<sup>+</sup>- Zellen im Lymphknoten

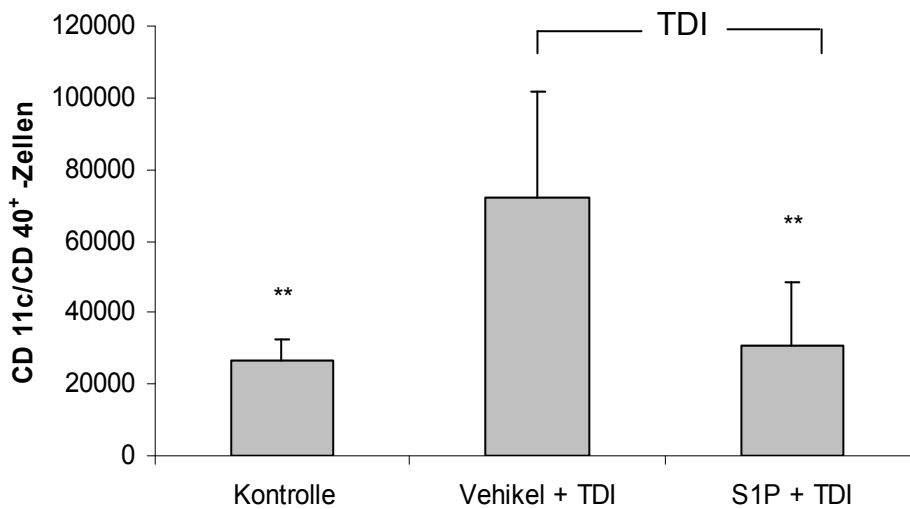
Abbildung 4-4 zeigt eine repräsentative DotPlot-Darstellung des Ergebnisses der FACS-Analyse. In den Abbildungen 4-5 und 4-6 wird der Einfluss von S1P, FTY720 und SEW2871 auf die Anzahl der aus der Haut in den Lymphknoten eingewanderten dendritischen Zellen (CD 11c/CD 40 doppelpositive Zellen) als Säulendiagramm dargestellt. S1P und FTY720 verringern signifikant die TDI-induzierte Auswanderung der DC aus der Haut in den regionalen Lymphknoten. Die topische Gabe von SEW2871 hat nur einen geringen Einfluss auf die Anzahl von CD 11c<sup>+</sup>- und CD 40<sup>+</sup>- Zellen im Lymphknoten.



**Abbildung 4-4: Repräsentative Darstellung einer Lymphknotenzellsuspension**

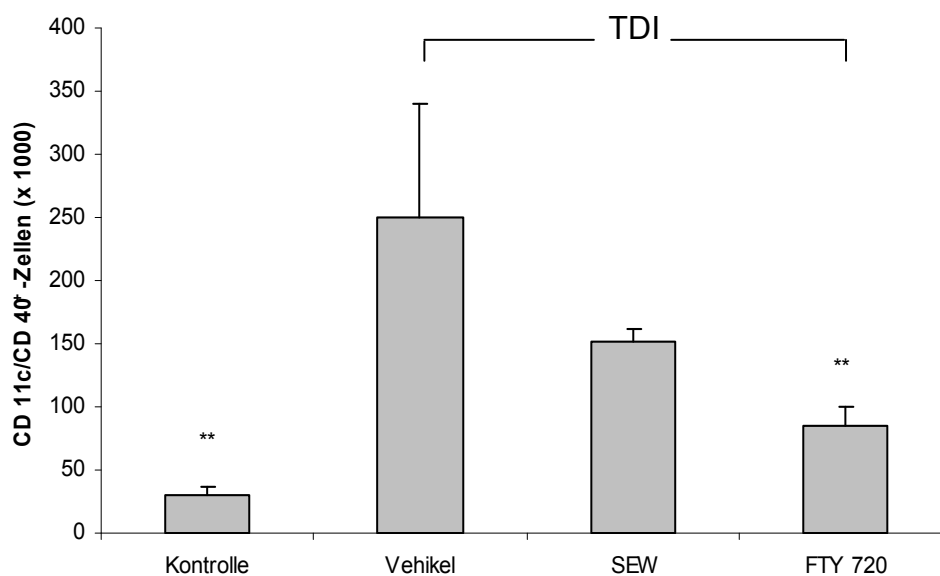
Auf der x-Achse ist CD 40, auf der y-Achse CD 11c aufgetragen. A = repräsentatives Vehikel, B = Isotypkontrolle. Im Gegensatz zur Kontrolle zeichnen sich beim Vehikel die CD 11c/CD 40 doppelpositiven Zellen im rechten oberen Quadranten als Zellwolke ab.





**Abbildung 4-5: CD 11c<sup>+</sup>- und CD 40<sup>+</sup>-Zellen in den Lnn. auriculares**

Signifikante Inhibition der Migration epidermaler und dermaler DC (CD 11c/CD 40<sup>+</sup>) aus der Haut nach topischer Applikation von S1P über einen Zeitraum von neun Tagen im Vergleich zur Vehikel-behandelten Gruppe. Einzelwerte siehe Anhangstabelle 9.6; Darstellung der MW ± S.D.; n=4-6, \*\*P<0.01.



**Abbildung 4-6: CD 11c<sup>+</sup>- und CD 40<sup>+</sup>-Zellen in den Lnn. auriculares**

Signifikante Inhibition der CD 11c<sup>+</sup>- und CD 40c<sup>+</sup>-Zellpopulation in den Lymphknoten durch FTY720 im Vergleich zur Vehikel-behandelten Gruppe. SEW2871 übt einen moderaten Effekt auf die Migration der DC aus. Einzelwerte siehe Anhangstabelle 9.7; Darstellung der MW ± S.D.; n=3-6, \*\*P<0.01.

#### 4.1.1.4.3 Einfluss der Testsubstanzen auf die Zytokinproduktion

Die im LLNA gewonnenen Zellen wurden für 48 Stunden mit ConA stimuliert. Danach wurden die Zytokine IL-6 und IFN- $\gamma$  in den Überständen gemessen. Tabelle 4-1 zeigt, dass die mit ConA stimulierten Lymphknotenzellen von TDI-sensibilisierten Mäusen mit einer erhöhten Sekretion der Zytokine IL-6 und IFN- $\gamma$  antworten (Vehikel). Die lokale Applikation von S1P und FTY720 moduliert das Zytokinmuster in den regionalen Lymphknoten. Die Lymphknotenzellen S1P- und FTY720-behandelter Tiere zeigen eine signifikant geringere Sekretion der Zytokine IL-6 und IFN- $\gamma$ . SEW2871 führt nicht zur Reduktion der ConA induzierten IL-6-Sekretion (Einzelwerte siehe Anhangstabelle 9.8). Eine Messung der IFN- $\gamma$ -Sekretion in den Lymphknotenzellen topisch mit SEW2871 behandelte Tiere wurde nicht vorgenommen.

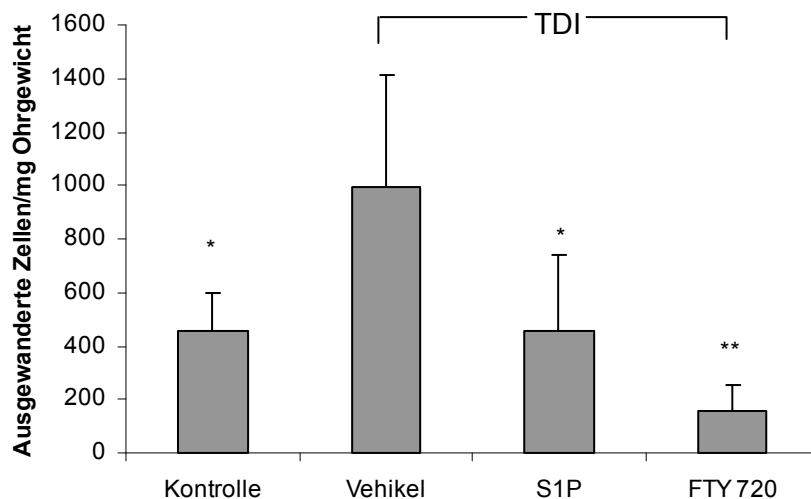
**Tabelle 4-1: IL-6- und IFN- $\gamma$ -Sekretion der Lymphknotenzellen nach ConA-Stimulation**

Die mittels ConA-stimulierte IL-6- und IFN- $\gamma$ -Sekretion in den Lymphknotenzellen TDI-sensibilisierter Mäuse wird durch lokale Gabe von S1P und FTY720 signifikant gehemmt. Einzelwerte siehe Anhangstabellen 9.9-9.12; Darstellung der MW  $\pm$  S.D.; n=4-6, \*P<0.05, \*\*P<0.01.

	IL-6 (pg/ml)	IFN- $\gamma$ (pg/ml)
Kontrolle	0 ( $\pm$ 2)**	181 ( $\pm$ 10)*
Vehikel + TDI	182 ( $\pm$ 108)	948 ( $\pm$ 593)
S1P + TDI	54 ( $\pm$ 37)**	237 ( $\pm$ 144)*
Kontrolle	4 ( $\pm$ 2)**	62 ( $\pm$ 17)**
Vehikel + TDI	327 ( $\pm$ 104)	2271 ( $\pm$ 743)
FTY720 + TDI	52 ( $\pm$ 3)**	844 ( $\pm$ 227)**

#### 4.1.1.5 Ergebnis des *Skin-DC-Migration-Assays*

Vierundzwanzig Stunden nach der letzten TDI-Applikation wurden die Tiere mittels zervikaler Dislokation getötet. Nach Abtrennung der Ohren wurden die mit S1P und FTY720 behandelten dorsalen Ohrhälften für drei Tage kultiviert und die in das Medium ausgewanderten DC gezählt. Abbildung 4-7 zeigt die ausgewanderten Zellen pro mg Ohrgewicht. Durch TDI kommt es im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zu einem signifikanten Anstieg der Migration der DC in das Medium. Die topische Applikation von S1P führt zu einer (auf Kontrollniveau) signifikanten Inhibition der Migration dendritischer Zellen in das Medium im Vergleich zur Vehikel-behandelten Gruppe. Die topische Applikation von FTY720 führt sogar zu einer signifikanten Inhibition der Migration dendritischer Zellen in das Medium unterhalb des Kontrollniveaus. Aufgrund der in den vorigen Versuchen erzielten moderaten Ergebnisse mit SEW2871, wurde die Testsubstanz in die folgenden Versuche nicht mehr mit einbezogen.



**Abbildung 4-7: TDI-induzierte Migration dendritischer Zellen pro mg Ohrgewicht**

Signifikante Inhibition der Migration dendritischer Zellen aus der Haut in das Medium durch topische Applikation von S1P und FTY720 im Vergleich zum Vehikel. Einzelwerte siehe Anhangstabelle 9.13; Darstellung der MW ± S.D.; n=4-6; \*P<0.05, \*\*P<0.01.

#### 4.1.1.6 MHC-II<sup>+</sup>-Zellen in der Epidermis

Nach Trennung der Ohren in die dorsale und ventrale Hälfte wurde mit der Epidermis der ventralen Hälfte eine immunhistochemische Färbung der MHC-II<sup>+</sup>-Zellen (i.e. Langerhans-Zellen) durchgeführt. Abbildungen 4-8, 4-9 und 4-10 zeigen, dass die topische Behandlung mit S1P bzw. FTY720 die TDI-induzierte Migration der LC aus der Haut signifikant hemmt. Im Vergleich zur Vehikel-behandelten Gruppe zeigen die S1P- bzw. FTY-behandelten Tiere signifikant höhere Langerhans-Zellzahlen in der Epidermis.

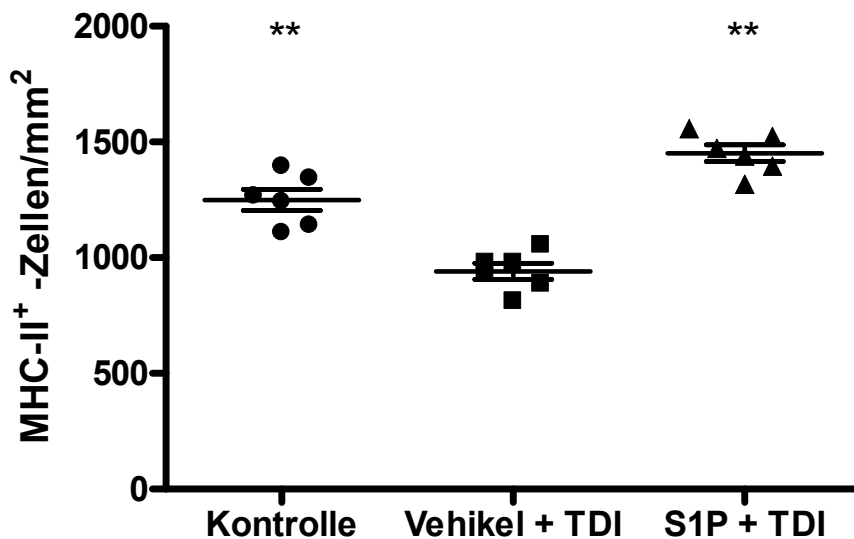
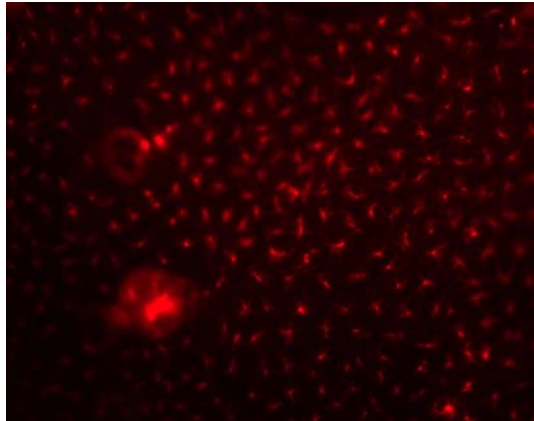


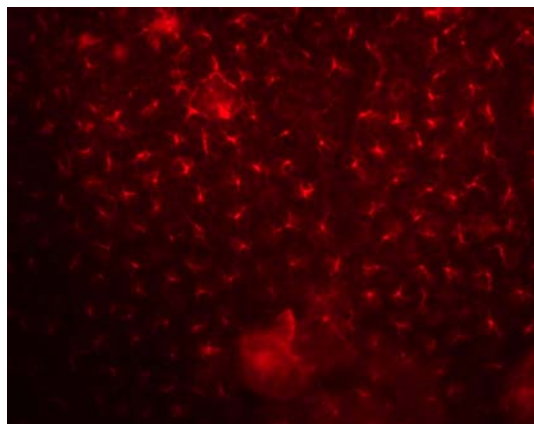
Abbildung 4-8: TDI-induzierte Migration der LC aus der Epidermis

Die Migration der LC aus der Epidermis wird durch topische Applikation von S1P im Vergleich zur Vehikel-behandelten Gruppe signifikant gehemmt. Darstellung der MW  $\pm$  S.D.; n=6; \*\*\*P<0.01.

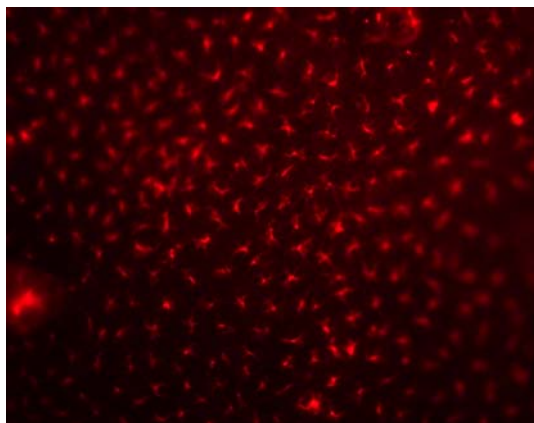
A)



B)



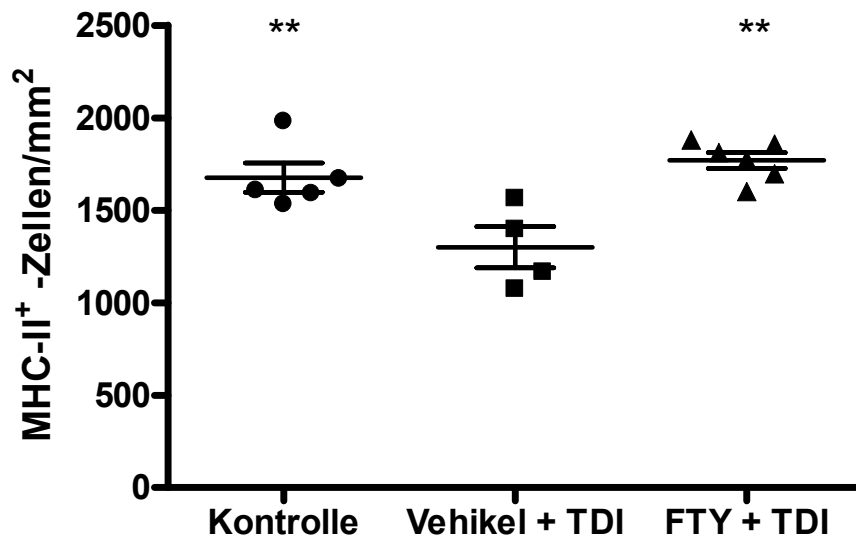
C)



C)

**Abbildung 4-9: MHC-II<sup>+</sup>-Zellen in der Epidermis**

Signifikante Inhibition der LC-Migration durch S1P im Vergleich zur Vehikel-behandelten Gruppe. A) Kontrolle, B) Vehikel, C) S1P. Vergrößerung 200-fach.



**Abbildung 4-10: TDI-induzierte Migration der LC aus der Epidermis**

Die topische Behandlung mit FTY720 hemmt signifikant die Migration der LC aus der Epidermis im Vergleich zur Vehikel-behandelten Gruppe. Darstellung der MW  $\pm$  S.D.; n=4-6; \*\*P<0.01.

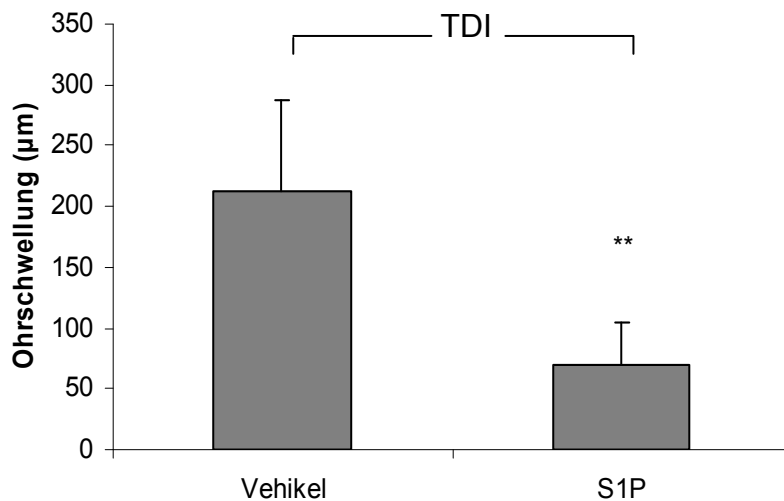
#### 4.1.2 Einfluss der Testsubstanzen in der Challengephase

Des Weiteren wurde im TDI-induzierten Kontaktallergiemodell der Einfluss der Testsubstanzen S1P, FTY720 und SEW2871 während der Challenge untersucht. Das genaue Behandlungsschema ist Kap. 3.4.2.2 zu entnehmen.

##### 4.1.2.1 Ergebnis des *Mouse-Ear-Swelling-Tests*

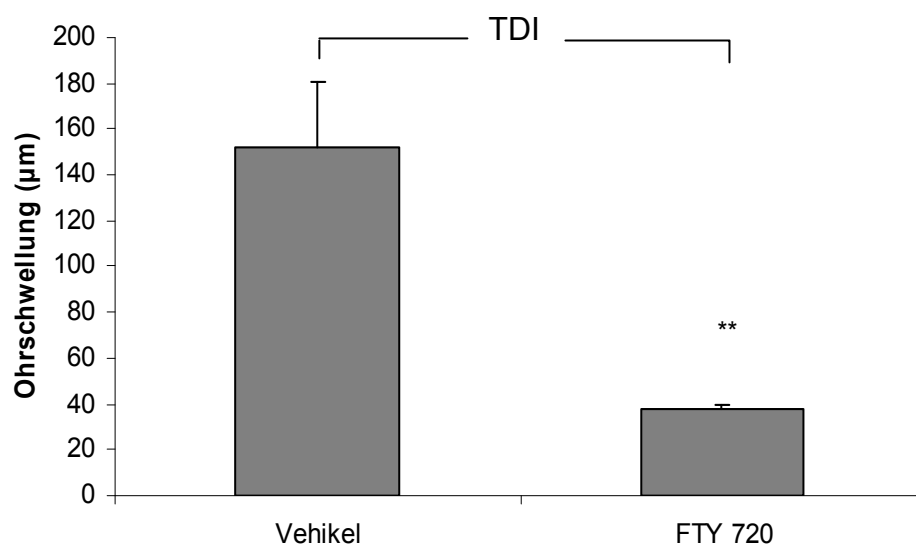
Abbildungen 4-11 und 4-12 zeigen den Einfluss von S1P und FTY720 auf die TDI-induzierte Ohrschwellung [ $\mu$ m] im Vergleich zur Vehikel-behandelten Gruppe. Die TDI-sensibilisierten Mäuse wurden über neun Tage topisch mit S1P, FTY720, SEW2871 und Vehikel behandelt. Am neunten Tag erfolgte die Challenge mit TDI. Die Ohrdicken wurden direkt vor sowie 24 Stunden nach der Challenge gemessen und es wurde die Ohrschwellung berechnet. Die topische Applikation von S1P und FTY720 führt zu einer signifikanten Inhibition der TDI-induzierten Ohrschwellung.

SEW2871 zeigt keine inhibitorische Wirkung, daher wurden keine weiteren Versuche mit SEW2871 durchgeführt (Einzelwerte siehe Anhangstabelle 9.14).



**Abbildung 4-11: TDI-induzierte Ohrschwellung [µm] in der Challengephase**

Signifikante Inhibition der Ohrschwellung durch topische Behandlung mit S1P. Einzelwerte siehe Anhangstabelle 9.15; Darstellung der MW ± S.D.; n=6; \*\*P<0.01.



**Abbildung 4-12: TDI-induzierte Ohrschwellung [µm] in der Challengephase**

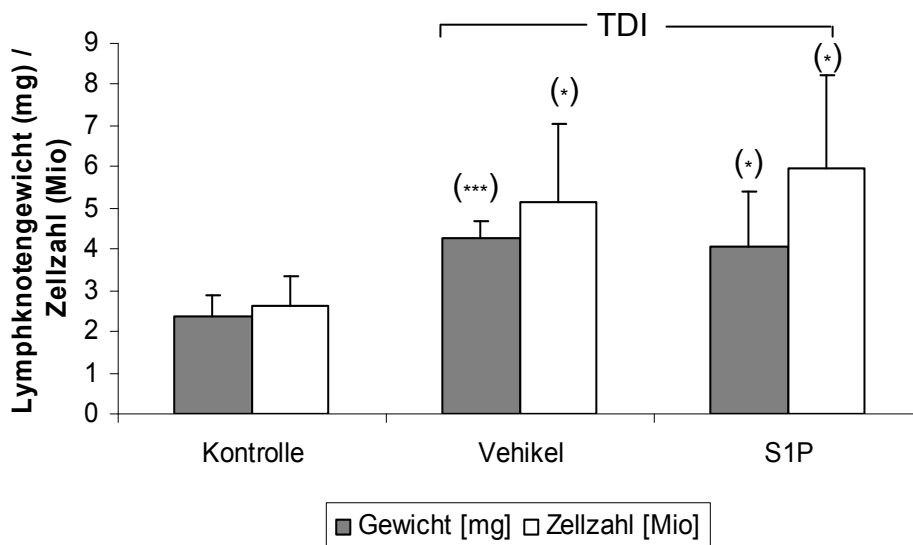
Die topische Applikation von FTY720 hemmt die TDI-induzierte Ohrschwellung signifikant. Einzelwerte siehe Anhangstabelle 9.16; Darstellung der MW ± S.D.; n=4; \*\*P<0.01.

#### 4.1.2.2 Ergebnis des *Local-Lymph-Node-Assays*

Vierundzwanzig Stunden nach der Challenge wurden die Tiere getötet und die regionalen Lymphknoten entnommen, gewogen und die Gesamtzellzahl bestimmt. Die im LLNA gewonnenen Zellen wurden mit ConA stimuliert. Anschließend wurde die IL-6-Konzentration im Überstand gemessen.

##### 4.1.2.2.1 Einfluss der Testsubstanzen auf das Lymphknotengewicht und die Zellzahl

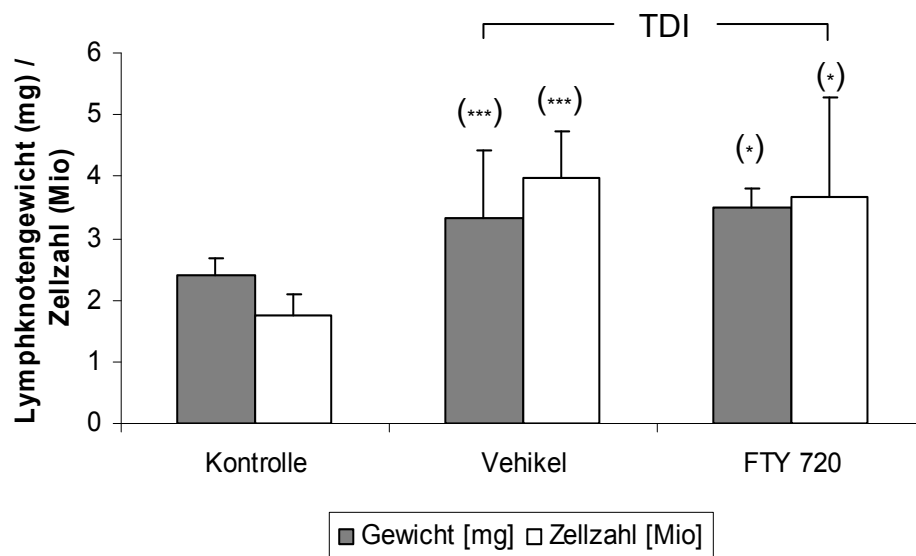
Die Abbildungen 4-13 und 4-14 zeigen das Lymphknotengewicht sowie die Gesamtzellzahl. Die topische Applikation von TDI führt bei direktem Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zu einer signifikanten Zunahme des Lymphknotengewichts und der Gesamtzellzahl. Zwischen den S1P- und FTY720-behandelten Gruppen und den Tieren, die nur das Vehikel verabreicht bekommen haben, zeigen sich jedoch kaum Unterschiede in Gewicht und Zellzahl der Lymphknoten.



**Abbildung 4-13: Lymphknotengewicht [mg] und Zellzahl [Mio]**

Signifikanter Anstieg des Lymphknotengewichts und der Zellzahl durch TDI bei direktem Vergleich zur Kontrolle (t-Test). Die topische Applikation von S1P zeigt im Vergleich zur Vehikel-behandelten Gruppe keine inhibitorische Wirkung auf das Gewicht und die Zellzahl der Lymphknoten. Einzelwerte siehe Anhangstabelle 9.17; Darstellung der  $MW \pm S.D.$ ;  $n=5-6$ ,  $***P<0.001$ ,  $*<0.05$ .





**Abbildung 4-14: Lymphknotengewicht [mg] und Zellzahl [Mio]**

Im direkten Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle führt die Applikation von TDI zu einem signifikanten Anstieg des Lymphknotengewichts und der Zellzahl (t-Test). Die topische Gabe von FTY720 hat im Vergleich zur Vehikel-behandelten Gruppe keinen inhibitorischen Effekt auf das Gewicht und die Zellzahl der Lymphknoten. Einzelwerte siehe Anhangstabelle 9.18; Darstellung der MW ± S.D.; n=6, \*\*\*P<0.001, \*<0.05.

#### 4.1.2.2.2 Einfluss von S1P auf die Zytokinproduktion

Nach 48stündiger Stimulation der im LLNA gewonnenen Zellen mit ConA wurde das Zytokin IL-6 im Überstand gemessen. In beiden Versuchen zeigt die lokale Applikation von S1P keine signifikante Inhibition der IL-6-Sekretion im Vergleich zur Vehikel-behandelten Gruppe (Tab. 4-2). Im Vergleich zur Sensibilisierung fallen in der Challenge schon bei der Vehikel-behandelten Gruppe die extrem niedrigen Werte der IL-6 Konzentration auf (Sensibilisierung: 182 ( $\pm$  108) und 327 ( $\pm$ 104)). Daher wurden Untersuchungen mit FTY720 nicht durchgeführt.

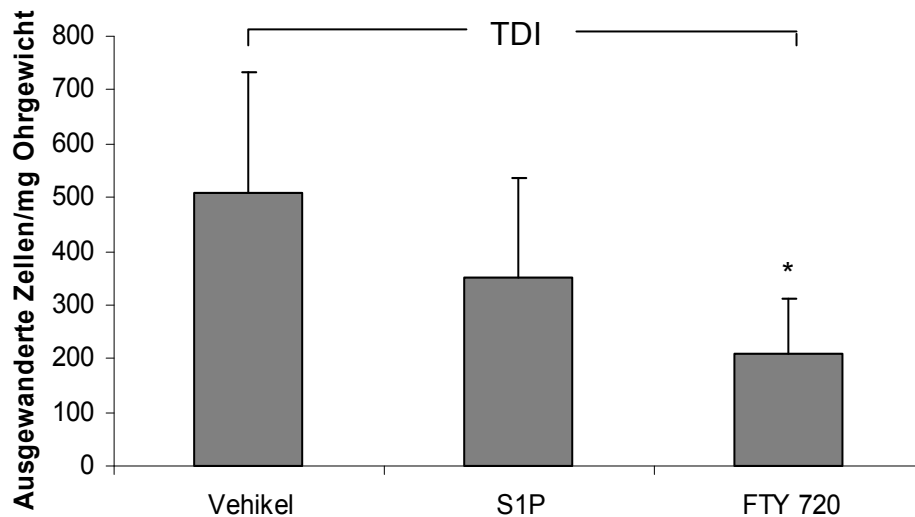
**Tabelle 4-2: IL-6-Sekretion der Lymphknotenzellen nach ConA-Stimulation**

Die durch ConA stimulierte IL-6-Sekretion in den Lymphknotenzellen TDI-sensibilisierter Mäuse wird durch die lokale Applikation von S1P nicht signifikant gehemmt. Einzelwerte siehe Anhangstabellen 9.19-9.20; Darstellung der MW  $\pm$  S.D.; n=6.

	IL-6 (pg/ml)
Vehikel + TDI	32 ( $\pm$ 33)
S1P + TDI	33 ( $\pm$ 23)
Vehikel + TDI	102 ( $\pm$ 36)
S1P + TDI	80 ( $\pm$ 29)

#### 4.1.2.3 Ergebnis des *Skin-DC-Migration-Assays*

Im *Skin-DC-Migration-Assay* wurden die Ohren *post mortem* (24 Stunden nach der Challenge) für drei Tage kultiviert. Anschließend wurde die Anzahl ausgewanderter Zellen ermittelt. Wie aus Abbildung 4-15 ersichtlich ist, wird die Auswanderung der DC in das Medium durch die lokale Applikation von S1P nur tendenziell, durch die lokale Gabe von FTY720 aber signifikant gehemmt.



**Abbildung 4-15: Migration dendritischer Zellen/mg Ohrgewicht in der Challenge**

Signifikante Inhibition der Migration dendritischer Zellen aus der Haut in das Medium durch topische Applikation von FTY720 im Vergleich zur Vehikel-behandelten Gruppe. Die topische Gabe von S1P führt nur zu einer tendenziellen Inhibition der Migration dendritischer Zellen. Einzelwerte siehe Anhangstabelle 9.21; Darstellung der MW  $\pm$  S.D.; n=6-8; \*P<0.05.

#### 4.1.2.4 MHC-II<sup>+</sup>-Zellen im Mausohr

Vierundzwanzig Stunden nach der TDI-Challenge wurden die Mäuse getötet und die Ohren abgetrennt. Die Anzahl der MHC-II<sup>+</sup>-Zellen im histologischen Querschnitt der Mausohren (vor allem in der Dermis) wurde von zwei Personen in einem semiquantitativen Verfahren nach einem Scoresystem bestimmt (0 = kein bzw. ggr. Zellinflux bis 3 = hgr. Zellinflux). Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle führt die lokale Behandlung der Ohren mit TDI zu einer Entzündungsreaktion und somit zu einer Einwanderung der MHC-II<sup>+</sup>-Zellen in die Haut. Abbildung 4-16 zeigt, dass die Anzahl der MHC-II<sup>+</sup>-Zellen in der Haut nach topischer Behandlung mit S1P bzw. FTY720 reduziert ist. Die lokale Gabe von S1P und FTY720 vermindert, dass eine große Anzahl der antigenpräsentierenden Zellen in das Entzündungsgebiet -also die Haut- gelockt wird.

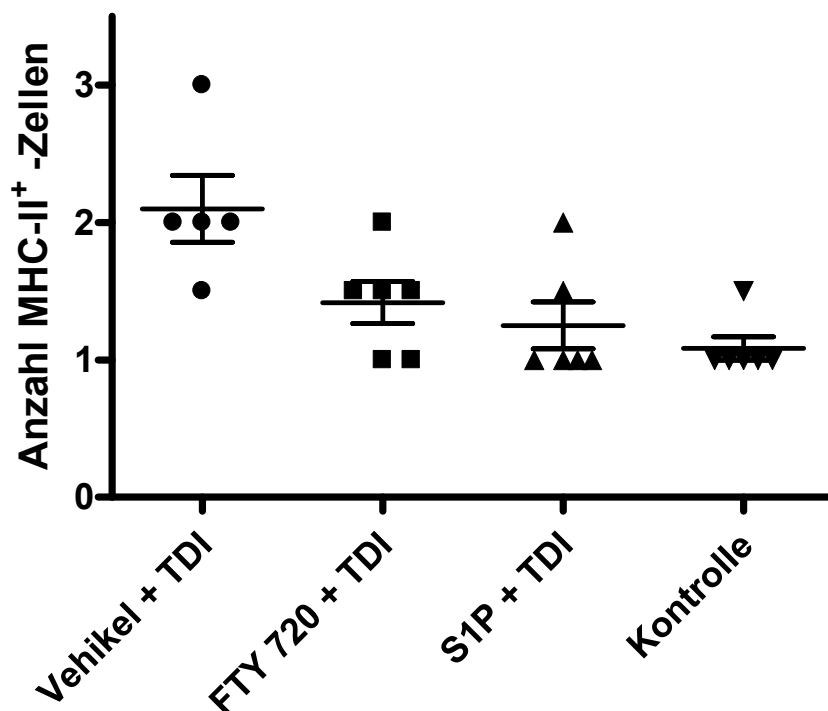


Abbildung 4-16: Anzahl MHC-II<sup>+</sup>-Zellen in der Haut

Inhibition der Migration von MHC-II<sup>+</sup>-Zellen in das Entzündungsgebiet durch lokale Applikation von S1P bzw. FTY720 im Vergleich zur Vehikel-behandelten Gruppe. Darstellung der MW  $\pm$  S.D.; n=5-6.

#### 4.1.2.5 CD3<sup>+</sup>- und GR-1<sup>+</sup>-Zellen im Mausohr

Des Weiteren wurden die Mausohren auf die Anzahl der CD3<sup>+</sup>- und GR-1<sup>+</sup>-Zellen beurteilt. Auch hier wurde die Auswertung von zwei Personen im semiquantitativen Verfahren mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt (0 = kein bzw. ggr. Zellaufstrom bis 3 = hgr. Zellaufstrom). Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe führt die topische Gabe von TDI zu einer erhöhten Anzahl an CD3<sup>+</sup>- und GR-1<sup>+</sup>-Zellen in der Haut. Wie in Abbildung 4-17 ersichtlich, wird der Anstieg der CD3<sup>+</sup>-Zellen durch topische Applikation von S1P und FTY720 im Vergleich zur Vehikel-behandelten Gruppe reduziert. Die Abbildung 4-18 (A-D) zeigt die immunhistologischen Schnitte der CD3<sup>+</sup>-gefärbten Ohren. Bei der Vehikel-behandelten Gruppe (B) sieht man einen deutlichen Influx der CD3<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zur Kontrolle sowie zu den mit S1P und FTY720 behandelten Ohren. Die Anzahl der GR-1<sup>+</sup>-Zellen (neutrophile Granulozyten) wird durch die Behandlung der Ohren mit den S1P-Rezeptor-Agonisten nicht reduziert (Abbildung 4-19).

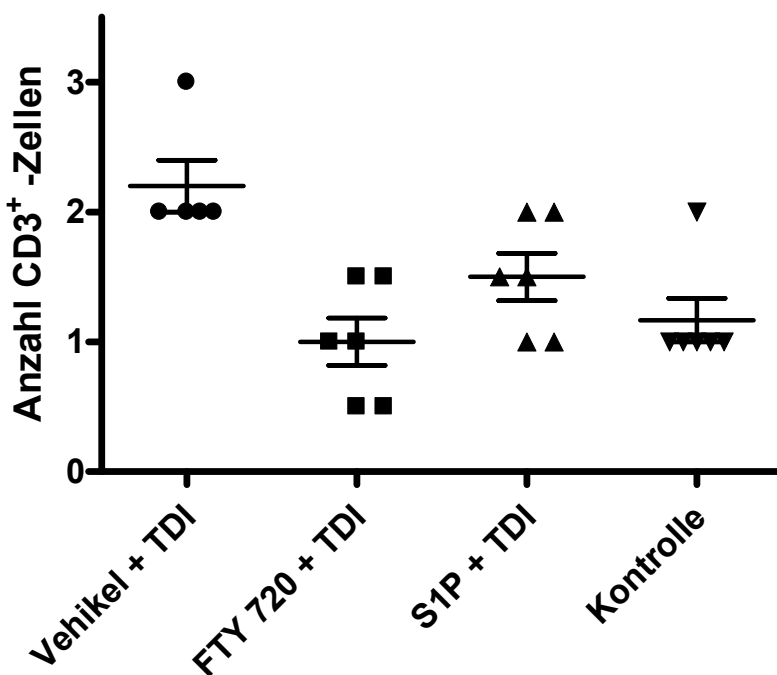
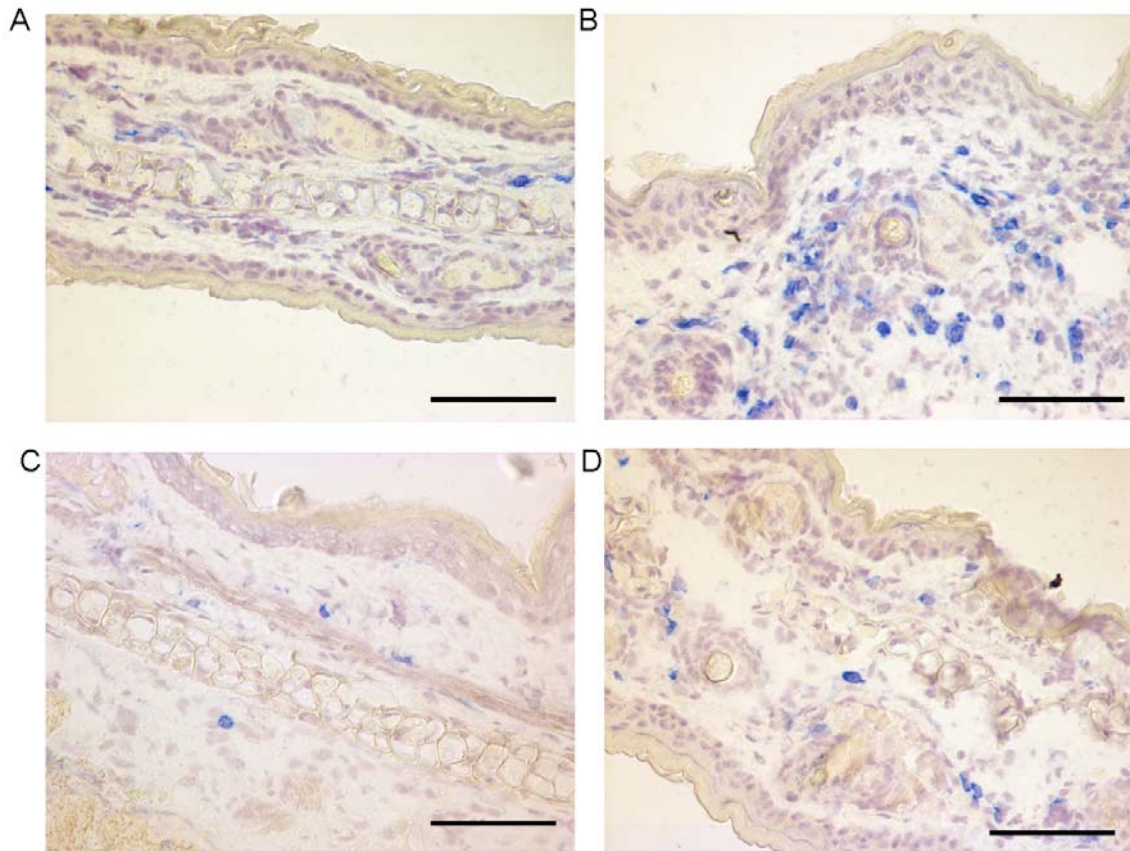


Abbildung 4-17: Anzahl CD3<sup>+</sup>-Zellen in der Haut

Inhibition des TDI-induzierten Anstiegs der CD3<sup>+</sup>-Zellen in der Haut durch topische Applikation von S1P und FTY720 im Vergleich zur Vehikel-behandelten Gruppe. Darstellung der MW ± S.D.; n=5-6.



**Abbildung 4-18: Anzahl CD3<sup>+</sup>-Zellen im Mausohr**

Influx der CD3<sup>+</sup>-Zellen bei den Gruppen: A) Kontrolle, B) Vehikel + TDI, C) FTY720 + TDI und D) S1P + TDI. Inhibition der Anzahl an CD3<sup>+</sup>-Zellen durch topische Applikation von S1P und FTY720 im Vergleich zur Vehikel-behandelten Gruppe. Maßstabballen 100 µm, n=6.

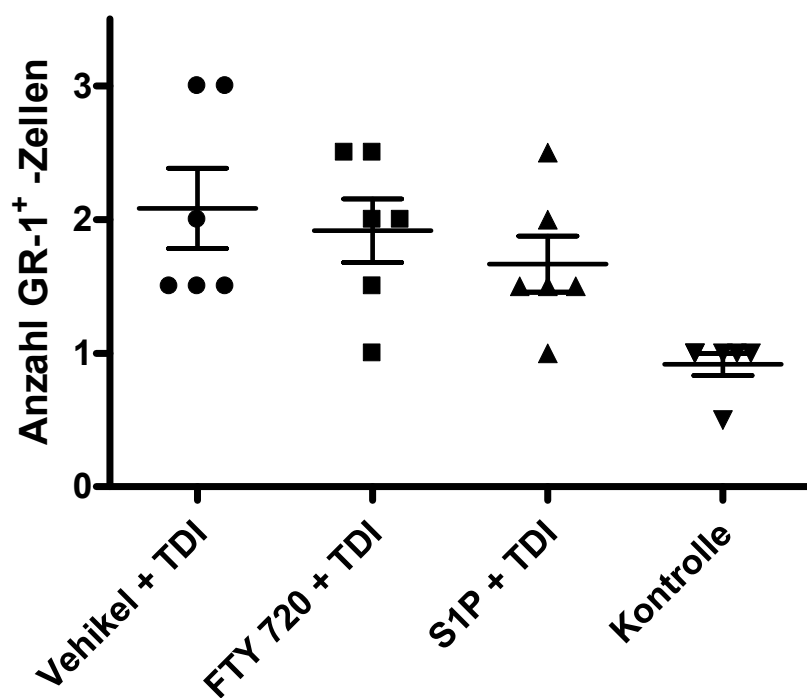


Abbildung 4-19: Anzahl GR-1<sup>+</sup>-Zellen in der Haut

Die topische Applikation von TDI führt zu einem deutlichen Anstieg der GR-1<sup>+</sup>-Zellen in der Haut im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dieser Anstieg wird durch die topische Gabe von S1P oder FTY720 nicht inhibiert. Darstellung der MW ± S.D.; n=6, \*\*P<0.01.

#### 4.1.2.6 Ergebnis der histologischen Untersuchung

Für die histologische Darstellung der Entzündungszeichen wurden die Tiere 24 Stunden nach der Challenge getötet. Anschließend wurden die Ohren abgetrennt und HE gefärbt. Die histologischen Schnitte wurden blind durchgemustert und mit einem semiquantitativen Verfahren hinsichtlich Zellinflux und Ödematisierung ausgewertet (0 = kein inflammatorischer Zellinflux / kein Ödem bis 3 = hochgradiger inflammatorischer Zellinflux / hochgradiges Ödem). Tabelle 4-3 zeigt, dass nur ein gradueller Unterschied bezüglich der Entzündungszeichen zwischen der Vehikelgruppe und den mit S1P bzw. FTY720 behandelten Tieren besteht.

**Tabelle 4-3: Histologische Auswertung des inflammatorischen Zellinflux und der Ödembildung**

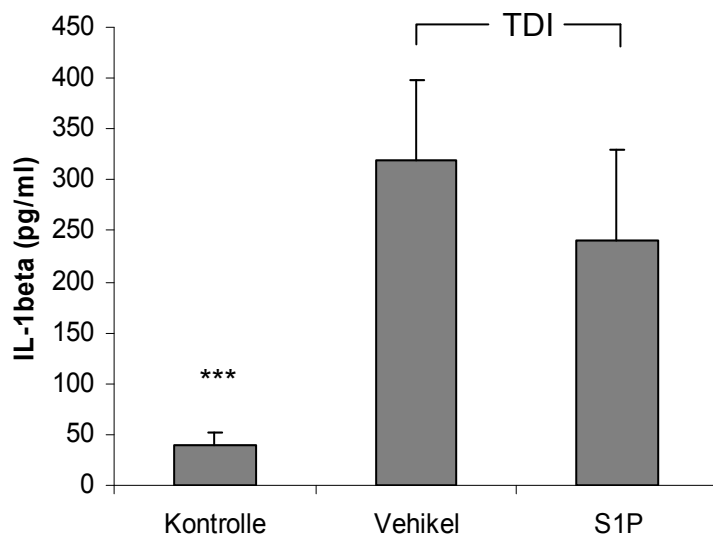
Nur graduelle Reduktion der Entzündungszeichen durch topische Applikation von S1P bzw. FTY720 im Vergleich zur Vehikel-behandelten Gruppe. Einzelwerte siehe Anhangstabelle 9.22; Darstellung der MW  $\pm$  S.D.; n=5-6.

	Vehikel + TDI	S1P + TDI	FTY720 + TDI
Zellinflux	2,3 ( $\pm$ 0,6)	2,1 ( $\pm$ 0,5)	2,0 ( $\pm$ 0,5)
Ödem	2,1 ( $\pm$ 0,5)	1,9 ( $\pm$ 0,2)	1,9 ( $\pm$ 0,2)



#### 4.1.2.7 Einfluss von S1P auf die IL-1 $\beta$ -Konzentration in der Haut

Vierundzwanzig Stunden nach der Challenge wurden die mit S1P behandelten Ohren sowie die Kontrollohren *post mortem* abgetrennt, in die dorsale und ventrale Ohrhälfte getrennt und die Proteinkonzentration bestimmt. Daraufhin wurde das Zytokin IL-1 $\beta$  in der Haut mittels ELISA gemessen. Abbildung 4-20 zeigt, dass die IL-1 $\beta$ -Konzentration in der Haut TDI-sensibilisierter Mäuse im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant erhöht ist und durch die lokale Applikation von S1P reduziert wird. Da die Inhibition nicht signifikant ist und es sich bei IL-1 $\beta$  bereits um den sensitivsten Parameter handelt, wurden keine weiteren Zytokine gemessen.



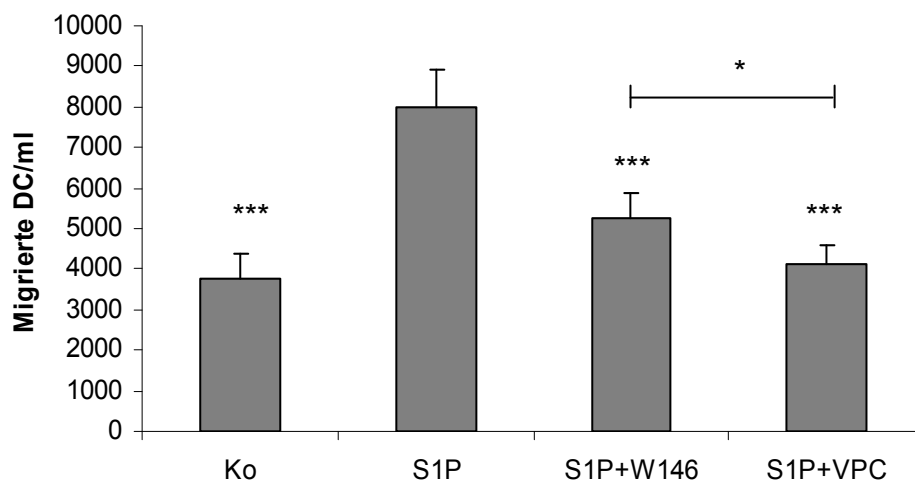
**Abbildung 4-20: IL-1 $\beta$ -Konzentration (pg/ml) im Ohrhomogenat 24 Stunden nach der Challenge**

Die TDI-induzierte IL-1 $\beta$ -Sekretion in der Haut wird durch die lokale Applikation von S1P nur tendenziell gehemmt. Einzelwerte siehe Anhangstabelle 9.23; Darstellung der MW  $\pm$  S.D.; n=6.

## 4.2 Ergebnisse der *In-vitro*-Versuche

### 4.2.1 Einfluss von W146 und VPC23019 auf die Migration dendritischer Zellen im Migrations-Assay

Um den Einfluss der S1P-Antagonisten W146 und VPC23019 auf die Migration dendritischer Zellen zu überprüfen, wurde ein Migrations-Assay durchgeführt. Da von RADEKE et al. (2005) gezeigt wurde, dass S1P3 ebenfalls an der DC-Migration durch S1P involviert ist, wurde insbesondere geprüft, ob der S1P1/S1P3-Antagonist VPC23019 einen stärkeren hemmenden Effekt auf die DC-Migration zeigt als der reine S1P1-Antagonist W146. Abbildung 4-21 zeigt, dass beide Inhibitoren die DC-Migration entgegen S1P signifikant reduzieren. Der duale Inhibitor VPC23019 reduziert die DC-Migration auf Kontroll-Ebene und zeigt damit eine deutlich höhere Hemmung der DC-Migration im Vergleich zum S1P1-Antagonisten W146.



**Abbildung 4-21: Migration *in vitro* generierter DC**

Signifikante Reduktion der Migration dendritischer Zellen durch den S1P1-Antagonisten W146 und den S1P1/S1P3-Antagonisten VPC 23019. Einzelwerte siehe Anhangstabelle 9.24; Darstellung der MW  $\pm$  S.D.; n=4; \*P<0.05, \*\*\*P<0.001.

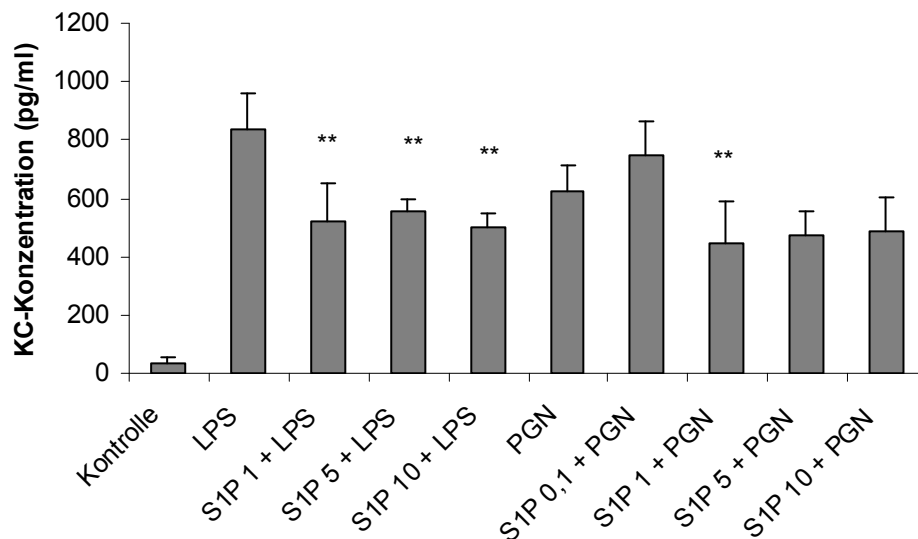
## **4.2.2 Einfluss von S1P und FTY720 auf die Zytokinproduktion muriner und caniner Keratinozyten**

*In vitro* wurde der Einfluss der Testsubstanz S1P auf die KC-Produktion muriner Keratinozyten untersucht. Die Zellen wurden kultiviert und über verschiedene Zeiträume (120 Minuten - vier Tage) mit unterschiedlichen Konzentrationen des S1P behandelt. Vierundzwanzig Stunden vor der Entnahme der Zellkulturüberstände erfolgte zusätzlich die Stimulierung der Zellen mit LPS bzw. PGN. Die Zellkulturüberstände wurden mittels ELISA auf eine Hemmung der Zytokinproduktion untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss der Testsubstanzen S1P und FTY720 auf die IL-8-Sekretion caniner Keratinozyten untersucht. Zum Vergleich wurden sowohl normale canine Keratinozyten (CK) als auch canine Keratinozyten von Atopikern über vier Tage mit den Testsubstanzen inkubiert. Am vierten Tag erfolgte wiederum die Stimulierung der Zellen mit LPS bzw. PGN und nach weiteren 24 Stunden die Bestimmung der IL-8-Konzentrationen mittels ELISA.

### **4.2.2.1 Einfluss von S1P auf die KC-Sekretion muriner Keratinozyten**

Die murinen Keratinozyten wurden in mehreren Versuchsdurchführungen für unterschiedliche Zeiträume mit S1P inkubiert und für 24 Stunden mit LPS bzw. PGN stimuliert. Die Stimulierung der Zellen mit LPS und PGN führt in allen Versuchen zu einem signifikanten Anstieg der KC-Konzentration im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Ergebnisse bezüglich der Inhibition der KC-Konzentration durch die Behandlung der Zellen mit S1P sind sehr heterogen. Nach 120 Minuten Inkubationszeit von S1P und anschließender Stimulation der Zellen zeigt S1P in der Lösung 10  $\mu\text{mol/l}$  eine schwach signifikante Reduzierung der durch LPS-induzierten KC-Sekretion. Die PGN-induzierte KC-Sekretion zeigt durch die S1P-Konzentrationen 1  $\mu\text{mol/l}$  und 10  $\mu\text{mol/l}$  eine tendenzielle Inhibition. Nach Inkubationszeiten von drei und fünf Stunden konnte keine signifikante Inhibition der KC-Sekretion beobachtet werden. Bei drei weiteren Versuchen wurden die Zellen jeweils vier Tage mit S1P inkubiert. S1P zeigt hier im ersten Versuch in den Konzentrationen 1  $\mu\text{mol/l}$ , 5  $\mu\text{mol/l}$  und 10  $\mu\text{mol/l}$  eine signifikante Inhibition der

LPS-induzierten KC-Sekretion und in der Konzentration 1  $\mu\text{mol/l}$  eine signifikante Inhibition der PGN-induzierten KC-Sekretion. Im zweiten Versuch wurde die LPS-induzierte KC-Sekretion durch S1P in den Konzentrationen 1  $\mu\text{mol/l}$  und 10  $\mu\text{mol/l}$  schwach signifikant gehemmt. Die PGN-induzierte Zytokinproduktion wird durch S1P nicht gehemmt. In Versuch 3 führt S1P zu keiner Inhibition der LPS- bzw. PGN-induzierten KC-Sekretion. Abbildung 4-22 zeigt die Inhibition der LPS- und PGN-induzierten KC-Sekretion des ersten Versuches mit vier Tagen Inkubationszeit von S1P.



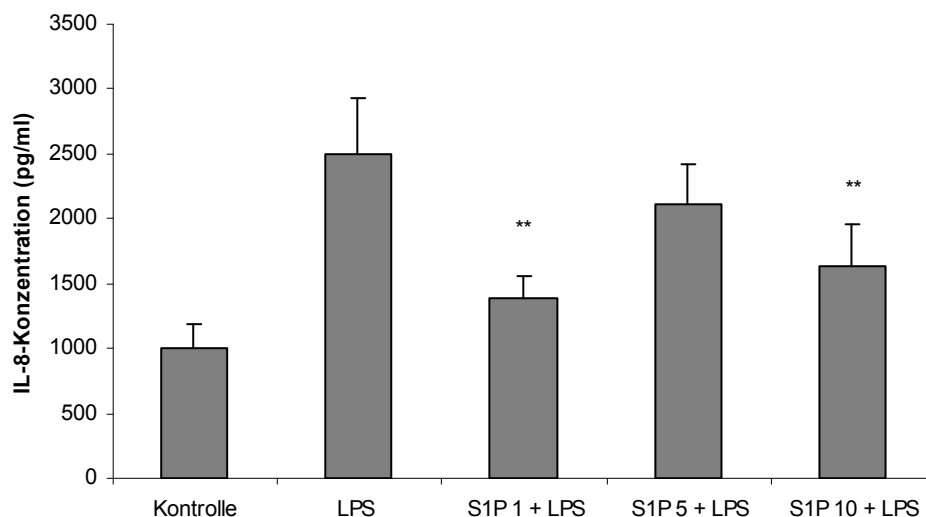
**Abbildung 4-22: KC-Sekretion [pg/ml] muriner Keratinozyten nach Behandlung der Zellen mit S1P und LPS- bzw. PGN-Stimulation**

Inhibition der KC-Freisetzung nach Behandlung der murinen Keratinozyten mit S1P über vier Tage und anschließender Stimulation der Zellen mit LPS bzw. PGN über 24 Stunden. S1P kann die LPS induzierte KC-Sekretion in den Dosen 1  $\mu\text{mol/l}$ , 5  $\mu\text{mol/l}$  und 10  $\mu\text{mol/l}$  signifikant hemmen. Die PGN-induzierte KC-Sekretion wird durch 1  $\mu\text{mol/l}$  S1P signifikant gehemmt. Einzelwerte siehe Anhangstabelle 9.25; Darstellung der MW  $\pm$  S.D.; n=6, \*\*P<0.01.

#### 4.2.2.2 Einfluss der Testsubstanzen auf die IL-8-Sekretion normaler caniner Keratinozyten

##### 4.2.2.2.1 Einfluss von S1P

Es wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt. In beiden Versuchen bewirkt die Stimulierung der Zellen mit LPS einen signifikanten Anstieg der IL-8-Konzentration im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Versuch 1: Kontrolle 1001 ( $\pm$  191) pg/ml, LPS 2493 ( $\pm$  431) pg/ml). PGN führt nur im zweiten Versuch zu einem signifikanten Anstieg der IL-8-Konzentration. Wie aus Abbildung 4-23 ersichtlich, bewirkt die Inkubation der Zellen mit S1P im ersten Versuch in den S1P-Verdünnungen 1  $\mu$ mol/l und 10  $\mu$ mol/l eine signifikante Inhibition der LPS-induzierten Zytokinproduktion. Auch im zweiten Versuch wird die LPS-induzierte IL-8-Sekretion durch 1  $\mu$ mol/l S1P schwach signifikant und durch 10  $\mu$ mol/l S1P signifikant gehemmt. Die PGN-induzierte Zytokinproduktion wird durch S1P nicht gehemmt.

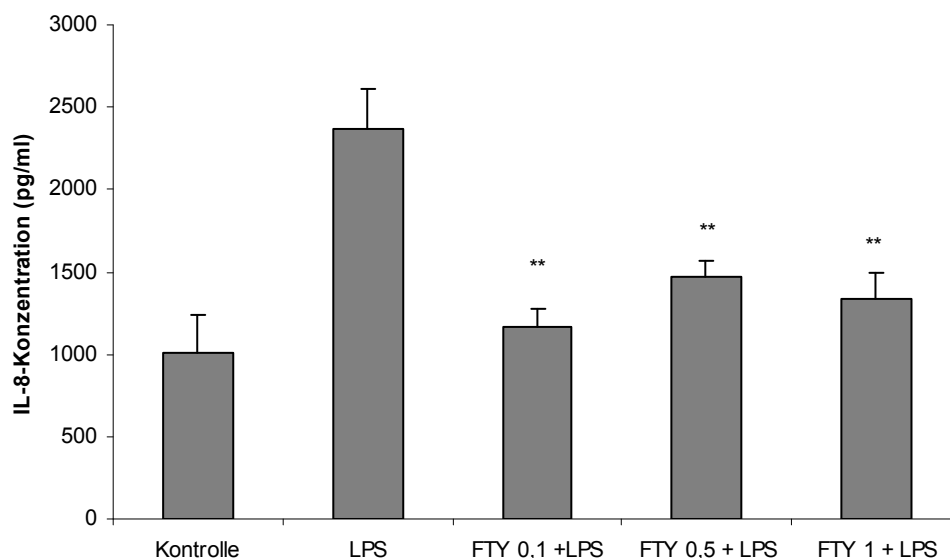


**Abbildung 4-23: IL-8-Sekretion [pg/ml] caniner Keratinozyten nach Behandlung der Zellen mit S1P und Stimulation mit LPS (Versuch 1)**

Die Stimulierung der Zellen mit LPS führt zu einem deutlichen Anstieg der IL-8-Konzentration, welcher durch Behandlung der Zellen mit S1P in den Dosen 1  $\mu$ mol/l und 10  $\mu$ mol/l signifikant gehemmt wird. Einzelwerte siehe Anhangstabelle 9.26; Darstellung der MW  $\pm$  S.D.; n=4, \*\*P<0.01.

#### 4.2.2.2 Einfluss von FTY720

Auch mit der Testsubstanz FTY720 wurden zwei Zellkulturversuche durchgeführt. Wiederum bewirkt die Stimulierung der Zellen mit LPS in beiden Versuchen einen signifikanten Anstieg der IL-8-Konzentration im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Versuch 1: Kontrolle 1008 ( $\pm$  237) pg/ml, LPS 2364 ( $\pm$  247) pg/ml). PGN führt auch hier nur im zweiten Versuch zu einem signifikanten Anstieg im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Abbildung 4-24 zeigt den ersten Versuch, in welchem die LPS-induzierte Zytokinproduktion durch alle drei Verdünnungsstufen von FTY720 signifikant gehemmt wird. PGN führt nicht zu einem signifikanten Anstieg der IL-8-Konzentration im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Auch im zweiten Versuch konnte die LPS-induzierte Zytokinproduktion durch alle drei Verdünnungsstufen von FTY720 signifikant gehemmt werden. Die PGN-induzierte Zytokinproduktion wird nur tendenziell gehemmt.



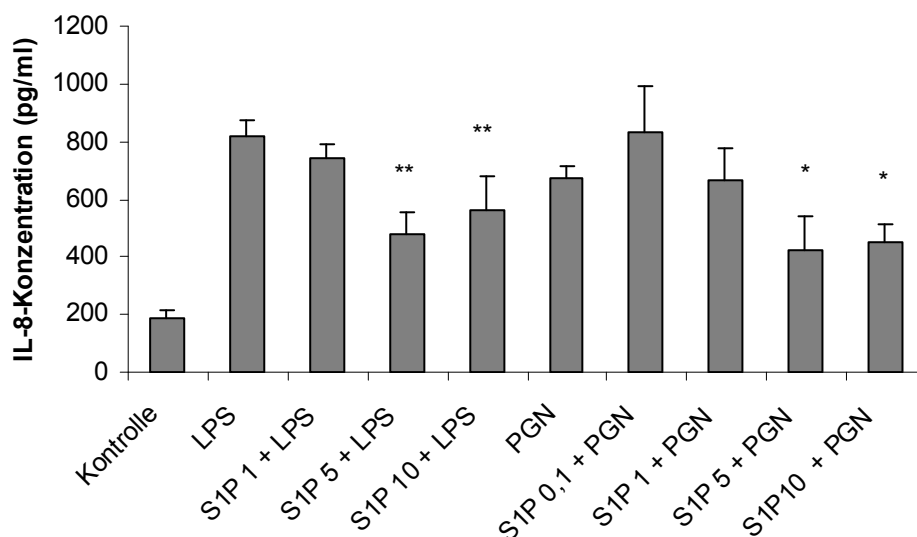
**Abbildung 4-24: IL-8-Sekretion [pg/ml] caniner Keratinozyten nach Behandlung der Zellen mit FTY720 und Stimulation mit LPS bzw. PGN (Versuch 1)**

Die Stimulierung der Zellen mit LPS führt zu einem deutlichen Anstieg der IL-8-Konzentration, welcher durch Behandlung der Zellen mit FTY720 in den Dosen 0,1  $\mu$ mol/l, 0,5  $\mu$ mol/l und 1  $\mu$ mol/l signifikant gehemmt wird. Einzelwerte siehe Anhangstabelle 9.27; Darstellung der MW  $\pm$  S.D.; n=4, \*\*P<0.01.

### 4.2.2.3 Einfluss der Testsubstanzen auf die IL-8-Sekretion atopischer caniner Keratinozyten

#### 4.2.2.3.1 Einfluss von S1P

Auch die atopischen Keratinozyten wurden in 2 Versuchsansätzen mit S1P behandelt und für 24 Stunden mit LPS bzw. PGN stimuliert. Die Stimulierung der Zellen mit LPS und PGN führt in beiden Versuchen zu einem signifikanten Anstieg der IL-8-Konzentration im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Versuch 1: Kontrolle 186 ( $\pm$  30) pg/ml, LPS 817 ( $\pm$  55) pg/ml, PGN 672 ( $\pm$  45) pg/ml). In Abbildung 4-25 ist Versuch 1 dargestellt. Hier führt die Behandlung der Zellen mit 5  $\mu$ mol/l und 10  $\mu$ mol/l S1P zu einer signifikanten Inhibition der LPS-induzierten IL-8-Sekretion. Die PGN-Konzentration zeigt zunächst einen Anstieg, wird in hohen Dosen S1P (5  $\mu$ mol/l und 10  $\mu$ mol/l) jedoch schwach signifikant gehemmt. Im zweiten Versuch wird die LPS-induzierte IL-8-Sekretion nur durch hohe Dosen S1P (10  $\mu$ mol/l) schwach signifikant gehemmt.

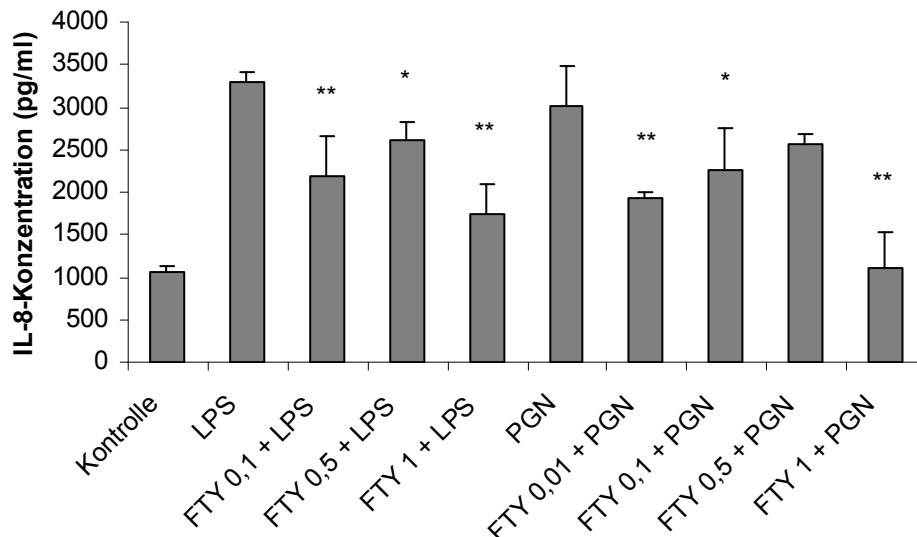


**Abbildung 4-25: IL-8-Sekretion [pg/ml] atopischer caniner Keratinozyten nach Behandlung der Zellen mit S1P und anschließender LPS- bzw. PGN-Stimulation (Versuch 1)**

Die Stimulierung der Zellen mit LPS führt zu einem deutlichen Anstieg der IL-8-Konzentration, welcher durch Behandlung der Zellen mit S1P in den Dosen 5  $\mu$ mol/l und 10  $\mu$ mol/l signifikant gehemmt wird. Auch PGN bewirkt einen deutlichen Anstieg der IL-8-Konzentration, welche durch S1P in den Dosen 5  $\mu$ mol/l und 10  $\mu$ mol/l gehemmt wird. Einzelwerte siehe Anhangstabelle 9.28; Darstellung der MW  $\pm$  S.D.; n=4, \*P<0.05, \*\*P<0.01.

#### 4.2.2.3.2 Einfluss von FTY720

Die Stimulierung der Zellen mit LPS bzw. PGN bewirkt auch hier in beiden Versuchen einen signifikanten Anstieg der IL-8-Konzentration im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Versuch 1: Kontrolle 1050 ( $\pm$ 81) pg/ml, LPS 3292 ( $\pm$ 108) pg/ml, PGN 3010 ( $\pm$ 472) pg/ml). Der LPS- bzw. PGN-induzierte Zytokinanstieg wird in beiden Versuchsdurchführungen durch fast alle Verdünnungsstufen von FTY720 signifikant gehemmt. Abbildung 4-26 zeigt die Ergebnisse des ersten Versuchs.



**Abbildung 4-26: IL-8-Sekretion [pg/ml] atopischer caniner Keratinozyten nach Behandlung der Zellen mit FTY720 und LPS- bzw. PGN-Stimulation (Versuch 1)**

Die Stimulierung der Zellen mit LPS führt zu einem deutlichen Anstieg der IL-8-Konzentration, welcher durch Behandlung der Zellen mit FTY720 in den Dosen 0,1  $\mu$ mol/l, 0,5  $\mu$ mol/l und 1  $\mu$ mol/l signifikant gehemmt wird. Auch PGN bewirkt einen deutlichen Anstieg der IL-8-Konzentration. Dieser wird durch die FTY720-Konzentrationen 0,01  $\mu$ mol/l, 0,1  $\mu$ mol/l und 1  $\mu$ mol/l signifikant gehemmt. Einzelwerte siehe Anhangstabelle 9.29; Darstellung der MW  $\pm$  S.D.; n=4, \*P<0.05, \*\*P<0.01.



### 4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die nachfolgenden Tabellen geben einen Überblick über die signifikanten Wirkungen der Testsubstanzen auf die Untersuchungsparameter in den *In-vivo*-Versuchen während der Sensibilisierung (Tab. 4-4) und der Challenge (Tab. 4-5). Des Weiteren sind die signifikanten Wirkungen der S1P-Rezeptor-Antagonisten im *In-vitro*-Versuch dargestellt (Tab. 4-6). Signifikante inhibitorische Effekte der Testsubstanzen im Vergleich zur Vehikel-behandelten Gruppe sind durch einen Pfeil markiert.

**Tabelle 4-4: Signifikante Effekte der Testsubstanzen in der Sensibilisierung;**  
n.d. = nicht durchgeführt

	S1P	FTY720	SEW2871
WBC	↓	↓	-
Lymphozyten	↓	↓	↓
LN-Gewicht	↓	↓	-
LN-Zellzahl	↓	↓	-
CD 40 <sup>+</sup> /CD 11c <sup>+</sup>	↓	↓	-
IL-6	↓	↓	-
IFN- $\gamma$	↓	↓	n.d.
Skin-DC-Migration	↓	↓	n.d.
MHC-II <sup>+</sup>	↓	↓	n.d.

**Tabelle 4-5: Signifikante Effekte der Testsubstanzen in der Challenge**

n.d. = nicht durchgeführt

	S1P	FTY720	SEW2871
MEST	↓	↓	-
Skin-DC-Migration	-	↓	n.d.

**Tabelle 4-6: Signifikante Effekte von VPC23019 und W146 auf die Migration dendritischer Zellen (in vitro)**

	VPC23019	W146
Migrations-Assay	↓	↓

## 5 Diskussion

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) stellt ein wichtiges Gewebshormon aus der Klasse der Lipidmediatoren dar und beeinflusst zahlreiche zelluläre Funktionen wie die Proliferation oder Differenzierung, Migration und Morphogenese (VON WENCKSTERN et al. 2006). Die Bedeutung von S1P als eigenständiger Mediator wurde mit der Entdeckung der Wirkung des Immunsuppressivums FTY720 deutlich. So induziert FTY720 eine lang anhaltende Internalisierung des S1P1-Rezeptors in Lymphozyten und verursacht systemisch verabreicht eine reversible, dosisabhängige Lymphopenie (MANDALA et al. 2002; MATLOUBIAN et al. 2004). Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass S1P in der Pathogenese allergisch-entzündlicher Hauterkrankungen wie der atopischen Dermatitis eine bedeutende Rolle zu spielen scheint. So wird S1P aus Sphingosin, einem Bestandteil von Ceramid, gebildet, welches für eine intakte Barrierefunktion wichtig ist. Bei Patienten mit atopischer Dermatitis führt eine verminderte Hydrolyse von epidermalen Sphingomyelinen zu einem Mangel an Stratum-corneum-Ceramiden und somit zu einer Störung der Barrierefunktion (MELNIK 2006). Des Weiteren ist die Sphingosin-1-Phosphat-Lyase, welches die irreversible Spaltung des S1P katalysiert, bei Patienten mit atopischer Dermatitis im Vergleich zu gesunder Haut deutlich erhöht (SEO et al. 2006). KOHNO et al. (2004) konnten durch die orale Verabreichung von FTY720 das Auftreten einer Dermatitis in NC/Nga-Mäusen vollständig verhindern. Dendritische Zellen (DC) und T-Zellen spielen bei der Initiierung und Auslösung von allergisch-entzündlichen Erkrankungen eine wichtige Rolle. Die Beeinflussung verschiedener Funktionen dieser Zellen durch S1P und FTY720 konnte bereits gezeigt werden. So reduziert die lokale Applikation von FTY720 die Migration der Lungen-DC zum regionären Lymphknoten. Jedoch ist die Datenlage zur Beeinflussung der Funktion dendritischer Zellen der Haut noch limitiert. Ziel der Arbeit war es daher, die Wirkung von S1P-Rezeptor-Agonisten auf DC, T-Zellen und Keratinozyten zu untersuchen. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf die Beeinflussung der Migration dendritischer Zellen der Haut gelegt. Als Testsubstanzen kamen die S1P-Rezeptor-Agonisten FTY720, SEW2871 und der natürliche Ligand S1P sowie die S1P-

Rezeptor-Antagonisten VPC23019 und W146 zum Einsatz. Die immunmodulatorische Wirkung der Substanzen wurde sowohl *in vivo* im Modell der murinen Kontaktallergie als auch *in vitro* in Keratinozyten-Zellkulturen untersucht und verglichen. *In vivo* wurde die anti-entzündliche und immunmodulatorische Wirkung von lokal verabreichtem FTY720 und seinem natürlichen Liganden S1P verglichen.

## 5.1 Wirkung der Testsubstanzen in der Sensibilisierung

Die Sensibilisierung eines Organismus gegenüber einem Allergen ist für die Induktion einer Kontaktallergie von zentraler Bedeutung. In dieser Phase wird das Allergen von den antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen, prozessiert und im regionalen Lymphknoten den naiven T-Zellen präsentiert, welche aktiviert werden und zu T-Effektorzellen ausdifferenzieren (BANCHEREAU u. STEINMAN 1998). Anhand des TDI-Kontaktallergiemodells, welches sich durch eine präferenzielle Th2-Antwort auszeichnet, wurde die Wirkung von topisch appliziertem S1P, FTY720 und SEW2871 im Sensibilisierungsstadium der Kontaktallergie untersucht. Die Testsubstanzen wurden also präventiv, das heißt vor der Challenge mit TDI, verabreicht. Das murine TDI-Kontaktallergiemodell wurde ausgewählt, da ähnliche Modelle seit Jahren zur Evaluierung neuer Therapeutika auch zur Behandlung der atopischen Dermatitis herangezogen werden und es zudem gut in der Arbeitsgruppe etabliert ist. Als funktionelle Parameter dienten die Bestimmung der Veränderungen im regionalen Lymphknoten (Gewicht, Zellzahl, Anzahl CD 11c<sup>+</sup>- und CD 40<sup>+</sup>-Zellen, Zytokinproduktion), die Migration der Zellen aus der Haut, sowie die Bestimmung der MHC-II<sup>+</sup>-Zellen in der Epidermis. Anhand dieser Untersuchungen kann auf die erfolgte DC-Migration und damit auf den Grad der Sensibilisierung des Organismus geschlossen werden. Zusätzlich wurde die Ohrschwellung gemessen, die aber erwartungsgemäß in der Sensibilisierung nicht induziert wird.

Die meisten Studien bezüglich der Wirkungen von S1P-Rezeptor-Agonisten erfolgten über eine systemische Verabreichung. Diese führt zu einer Hemmung des Lymphozyten-Austritts aus den Lymphknoten und folglich zu einer peripheren

Lymphopenie (MANDALA et al. 2002). Um systemische Wirkungen sowie mögliche Nebenwirkungen bedingt durch die periphere Lymphopenie zu verringern, wurden die Testsubstanzen in dieser Studie topisch verabreicht. Allerdings resultiert die langfristige Behandlung mit S1P und vor allem mit FTY720 ebenfalls in einer Lymphopenie. Obwohl S1P im Plasma nur geringgradig erhöht ist, reduziert die topische Applikation von S1P sowie von FTY720 und SEW2871 die Anzahl der weißen Blutkörperchen und besonders der Lymphozyten signifikant (Abb. 4-1). Die beobachtete Lymphopenie könnte zu dem anti-entzündlichen Effekt, welcher in der Auslösephase beobachtet wird, beitragen. Da die Untersuchung der Modulation der dendritischen Zellfunktion in der Haut beabsichtigt war, wurden die Testsubstanzen weiterhin topisch verabreicht.

Die Ergebnisse des *Mouse-Ear-Swelling-Tests* zeigen, dass die TDI-Applikation in der Sensibilisierungsphase keine nennenswerte Ohrschwellung induziert. Bei der Sensibilisierung handelt es sich um den Erstkontakt mit einem Antigen, welcher meist ohne erkennbare klinische Erscheinungen abläuft. Eine entzündungsbedingte Reaktion mit Ausprägung von Symptomen findet erst nach wiederholtem Antigenkontakt (Challengephase) statt (KRASTEVA et al. 1999).

Im *Local-Lymph-Node-Assay* konnten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bei den TDI-behandelten Tieren höhere Lymphknotengewichte und Zellzahlen sowie in der FACS-Analyse ein signifikanter Anstieg der CD 11c<sup>+</sup>- und CD 40<sup>+</sup>-Zellen (= immigrierte Haut-DC) gezeigt werden. Dies lässt auf eine DC-Stimulation und DC-Maturation mit anschließender Aktivierung und Proliferation der T-Zellen schließen. Durch die topische Verabreichung von S1P und FTY720 konnten die Reaktionen im regionären Lymphknoten signifikant beeinflusst werden. Alle drei Parameter (Lymphknotengewicht, Gesamtzellzahl, Anzahl CD 11c<sup>+</sup>- / CD 40<sup>+</sup>-Zellen) werden durch S1P und FTY720 signifikant, durch S1P bis auf das Kontrollniveau gehemmt (Abb. 4-2 bis 4-6). Die Reduktion der CD 11c<sup>+</sup>- und CD 40<sup>+</sup>-Zellen ist auf die Hemmung der Migration epidermaler und dermaler DC aus der Haut in den Lymphknoten zurückzuführen. Das geringere Lymphknotengewicht und die

verminderte Gesamtzellzahl beruhen vermutlich einerseits auf der verminderten Auswanderung der DC aus der Haut und andererseits auf einer Beeinträchtigung der DC-T-Zell-Interaktion und damit der T-Zellproliferation durch S1P und FTY720.

Es wird vermutet, dass eine hoch dosierte topische Verabreichung von S1P-Rezeptor-Agonisten in einer Rezeptor-Internalisierung (vor allem S1P1) und damit in einer Unempfindlichkeit der DC gegenüber chemotaktischen Reizen von S1P resultiert (GRÄLER u. GOETZL 2004; MATLOUBIAN et al. 2004). Eine Rezeptor-Internalisierung konnte auch für Langerhans-Zelllinien (XS52) bestätigt werden, da durchflusszytometrische Analysen zur Bestimmung der Oberflächenexpression von S1P1 an XS52-Zellen eine Internalisierung des Rezeptors in Gegenwart von S1P und FTY720 ergaben (RADEKE et al. 2005).

Die topische Applikation des S1P1-Agonisten SEW2871 übt einen partiellen Effekt auf das Lymphknotengewicht und die Gesamtzellzahl sowie auf den Anteil CD 11c<sup>+</sup>- und CD 40<sup>+</sup>-Zellen im regionären Lymphknoten aus. Diese Ergebnisse zeigen, dass nicht alle Effekte ausschließlich über S1P1, bzw. dessen Internalisierung, vermittelt werden. Auf der anderen Seite lässt sich die unvollständig hemmende Wirkung von SEW2871 pharmakokinetisch, z. B. durch eine geringe dermale Penetration erklären. CZELOTH et al. (2005) und RADEKE et al. (2005) belegten, dass neben S1P1 ein Teil der migratorischen Effekte in DC auch über S1P3 vermittelt wird. Auch eigene *In-vitro*-Experimente mit dem S1P1-Antagonisten W146 und dem S1P1/S1P3-Antagonisten VPC23019 weisen darauf hin, dass die Hemmung von S1P3 für eine vollständige Inhibition der DC-Migration von Bedeutung ist (Abb. 4-21). Gestützt werden diese Ergebnisse durch die vor kurzem veröffentlichte Studie von GOLLMANN et al. (2008). Die intradermale Injektion von SEW2871 (~ 20 µg / Maus-Ohr) reduziert die Migration von DC zum drainierenden Lymphknoten (auch unter entzündlichen Bedingungen). Allerdings ist die Reduktion nicht vollständig. Es wird lediglich ein Maximum von etwa 75 % Hemmung erreicht.

Um den Einfluss von topisch verabreichtem S1P und FTY720 auf die Migration der DC aus der Haut näher zu charakterisieren, wurde mit den behandelten Ohren ein *Skin-DC-Migration-Assay* durchgeführt. Das Modell wurde gewählt, da es zum einen

den Bezug zur Haut herstellt und zum anderen bezüglich der Kinetik und Wege der DC-Migration Ähnlichkeiten zum Kontaktallergiemodell zeigt. Da die kutane Migration der DC selektiv gemessen werden kann, eignet es sich hervorragend für Studien zur Regulation der DC-Migration (STOITZNER et al. 1999). Die Migration der DC aus der Haut in das Kulturmedium erfolgt zum Teil spontan. Des Weiteren wird die Migration der DC durch die TDI-Applikation induziert. Durch die mechanische Manipulation der Ohren während ihrer Trennung in die ventrale und dorsale Hälfte wirken Scherkräfte, die eine Mikroinflammation und damit eine weitere Aktivierung und Auswanderung der im Ohrgewebe vorhandenen Immun- und Entzündungszellen verursachen (ORTNER et al. 1996). Neben der Spontanmigration kommt es zu einer Aktivierung der Matrix-Metalloproteinase (MMP-9) (ORTNER et al. 1996; STOITZNER et al. 1999). MMP-9 ermöglicht durch ihre proteolytische Wirkung die Auswanderung der Zellen und ihre Antwort auf chemotaktische Reize (KOBAYASHI et al. 1999). Versuche an humanen Hautexplantaten zeigen, dass es sich bei den migrierten DC hauptsächlich um Langerhans-Zellen (LC) und nur vereinzelt um dermale DC handelt (RATZINGER et al. 2002). STOITZNER et al. (2003) zeigten dagegen an murinen Hautexplantaten, dass in der Sensibilisierung sowohl dermale als auch epidermale DC aus der Haut auswandern.

In eigenen Ergebnissen ist die Migration der DC von den TDI-sensibilisierten Tieren gegenüber der von den unsensibilisierten Kontrolltieren stark erhöht. Die Applikation des Haptens führt erwartungsgemäß zu einer verstärkten Auswanderung der DC in den Lymphknoten bzw. das Kulturmedium. Die topische Applikation von S1P und FTY720 führt zu einer signifikanten Inhibition der Migration dendritischer Zellen in das Medium. FTY720 führt sogar zu einer Inhibition unterhalb des Kontrollniveaus (Abb.4-7). Dieser Effekt spiegelt sich auch in der signifikant reduzierten Gesamtzellzahl und der signifikant reduzierten Anzahl doppelt positiv markierter Zellen im Lymphknoten wieder.

Der inhibitorische Effekt von FTY720 auf die Migration von DC konnte nach systemischer Gabe von FTY720 in nicht-entzündeter Haut im Anschluss an ein FITC-*Skinpainting* von CZELOTH et al. (2005) gezeigt werden. Die Anzahl der zum Lymphknoten migrierenden Zellen wurde durch FTY720 signifikant reduziert,

allerdings war der Anteil an LC an den migrierten DC nicht verändert. Vermutlich führt erst die Anwendung von FTY720 über einen längeren Zeitraum und die topische Verabreichung zu einer Beeinflussung der LC-Population in der Haut. Auch NAKASHIMA et al. (2008) konnten durch die systemische Verabreichung von FTY720 keine Modulation der Migration der Haut-DC feststellen. Da durch die systemische Verabreichung von FTY720 zwar die Induktion, nicht aber die Auslösephase der Dinitrofluorobenzen-induzierten allergischen Kontaktdermatitis beeinträchtigt wurde, folgerten sie, dass systemisch verabreichtes FTY720 vor allem die naive T-Zell-Zirkulation beeinträchtigt, welche die Einleitung einer allergischen Kontaktdermatitis bewirkt.

Vergleichbar mit eigenen Ergebnissen hat eine aktuelle Studie im murinen Asthma-Modell gezeigt, dass relativ hohe Konzentrationen von topisch verabreichtem FTY720 und S1P die DC-Migration aus der Lunge reduzieren können und zu einer reduzierten allergisch-entzündlichen Reaktion führen (IDZKO et al. 2006). Da die DC-Migration in Richtung anderer Chemokine wie CCL19 und CCL21 nicht beeinflusst wird (CZELOTH et al. 2005; IDZKO et al. 2006), kann der inhibitorische Effekt von FTY720 in einer spezifischen Herunterregulierung von S1P1 vermutet werden. Auch LAN et al. (2005) konnten *in vivo* durch eine systemische Applikation von FTY720 eine Reduktion der DC im Lymphknoten feststellen. Allerdings sind die Ergebnisse in der Literatur widersprüchlich, da der Effekt hier von einer Herunterregulierung des Chemokinrezeptors 7 (CCR7) begleitet wurde. Die reduzierte Migration wird somit wahrscheinlich indirekt durch eine verminderte Wirkung der Chemokine CCL19 und CCL21 hervorgerufen.

Die Ergebnisse des *Skin-DC-Migration-Assays* konnten auch durch Analysen der LC-Zelldichte in der Epidermis bestätigt werden. Die in der Epidermis verbliebenen LC wurden nach Behandlung der Tiere anhand des MHC-II-Komplexes angefärbt (STOITZNER et al. 2003), wobei die S1P- bzw. FTY-behandelten Tiere im Vergleich zur Vehikel-behandelten Gruppe signifikant höhere Langerhans-Zelldichten in der Epidermis aufzeigten (Abb. 4-8 und 4-10). Die Wirkung der Testsubstanzen ist auch



hier wahrscheinlich auf eine Internalisierung der S1P-Rezeptoren und eine einhergehende Anergie der Haut-DC zurückzuführen.

Da die DC entscheidend sind für die Initiierung und Aufrechterhaltung allergisch-entzündlicher Hauterkrankungen (KRASTEVA et al. 1999), kann eine Hemmung der DC- und insbesondere der LC-Migration und -Aktivierung die hemmende Wirkung von immunmodulatorischen Substanzen zumindest teilweise erklären. Dies wurde für Immunmodulatoren wie Cyclosporin A, Tacrolimus, Rapamycin, Cilomilast und Glukokortikoide bereits gezeigt (HOMEY et al. 1998; PANHANS-GROSS et al. 2001; CHEN et al. 2004; HOETZENECKER et al. 2004; BÄUMER et al. 2005; BÄUMER et al. 2006).

Die attenuierte Sensitivierungsreaktion kann neben der reduzierten DC-Migration auch durch eine verminderte T-Zell-Stimulierung in der Sensibilisierung erklärt werden. So wurde zum Beispiel die IL-12-Sekretion von Lungen-DC durch FTY720-Behandlung beeinträchtigt (IDZKO et al. 2006), was auch mit *In-vitro*-Ergebnissen für S1P und FTY720 in humanen DC übereinstimmt (IDZKO et al. 2002; Müller et al. 2005). Wie aus eigenen Ergebnissen ersichtlich, zeigen die ConA stimulierten Zellen der regionalen Lymphknoten von TDI-sensibilisierten Mäusen nach *In-vivo*-Behandlung mit S1P und FTY720 eine deutlich verminderte Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-6, was ebenfalls auf eine Modulation der Zytokinmuster hinweist (Tab. 4-1). Diese Ergebnisse werden durch *In-vitro*-Studien anderer Arbeitsgruppen bekräftigt: *In vitro* konnte eine schwächere Aktivierung von naiven T-Zellen mit verminderter IFN- $\gamma$ -Sekretion gezeigt werden, wenn FTY720-behandelte DC zu allogenen T-Zellen hinzugefügt wurden (MÜLLER et al. 2005). Auch WANG et al. (2005) konnten in T-Zellen nach Stimulation mit S1P eine Reduktion der IFN- $\gamma$ -Synthese feststellen. Die topische Behandlung mit SEW2871 führte nicht zur Reduktion der ConA induzierten IL-6-Sekretion, woraufhin eine Messung der IFN- $\gamma$ -Sekretion nicht mehr vorgenommen wurde.

## 5.2 Wirkung der Testsubstanzen in der Challenge

Neben der Sensibilisierung wurde der Einfluss der Testsubstanzen in der Challenge des TDI-Kontaktallergiemodells untersucht. Die Challenge- oder Auslösephase wird als ein erneuter Antigenkontakt nach abgeschlossener Sensibilisierungsphase mit der Ausprägung deutlicher Entzündungssymptome charakterisiert (KIMBER u. DEARMAN 2002). Die topische Applikation der Testsubstanzen erfolgte somit in der klinisch relevanten Phase. Zu den Untersuchungsparametern gehörten der *Mouse-Ear-Swelling-Test*, die Migration der DC, der *Local-Lymph-Node-Assay* (Gewicht, Zellzahl, Anzahl CD 11c<sup>+</sup>- und CD 40<sup>+</sup>-Zellen, Zytokinproduktion), die Bestimmung der Anzahl an MHC-II<sup>+</sup>-, CD3<sup>+</sup>- und GR-1<sup>+</sup>-Zellen sowie die Beurteilung der Entzündungszeichen im histologischen Querschnitt der behandelten Ohren. Weiterhin wurde die Konzentration von IL-1 $\beta$  in den Ohrhomogenaten untersucht. Mittels dieser Untersuchungen lässt sich eine Aussage über die Wirkungen von S1P und FTY720 in der Auslösephase treffen.

In der Challenge nehmen die LC und dermalen DC erneut das Allergen auf und präsentieren es direkt den allergenspezifischen T-Zellen in der Haut und im regionären Lymphknoten. Eine Entzündungskaskade wird in Gang gesetzt, deren Ausprägung nach etwa 24 Stunden am stärksten ist (KRASTEVA et al. 1999; BÄUMER et al. 2004), weshalb die Messung der Ohrdicke 24 Stunden nach der Challenge erfolgte. Von Keratinozyten und aktivierten T-Zellen freigesetzte Zytokine und Chemokine locken weitere Entzündungszellen wie neutrophile Granulozyten, Mastzellen und Makrophagen in das betroffene Gebiet und führen zu einer nachfolgenden Stimulation und Proliferation von T-Zellen in der Haut und zur Entstehung der Entzündung, welche sich als Ohrschwellung manifestiert.

In dem verwendeten Kontaktallergiemodell kommt es zu der durch TDI induzierten und erwarteten Ohrschwellung (BÄUMER et al. 2004). Die lokale Applikation von TDI führt weiterhin zu einer zellulären Infiltration von MHC-II<sup>+</sup>-, CD3<sup>+</sup>- und GR-1<sup>+</sup>-Zellen in die Ohrhaut (vor allem Dermis). Die aktivierten T-Zellen wandern bei erneutem Allergenkontakt in die Haut ein, wo sie an der Entzündungsreaktion entscheidend beteiligt sind. Die starke Präsenz von T-Zellen in der Haut ist damit wahrscheinlich

Folge der Aktivierung durch dendritische Zellen nach der Antigenaufnahme, -prozessierung und -präsentation an T-Effektorzellen in diesem Bereich. Die topische Applikation von S1P und FTY720 führt zu einer signifikanten Inhibition der TDI-induzierten Ohrschwellung (Abb. 4-11 und 4-12). Histologisch zeigt sich nur ein geringer Unterschied zwischen den Vehikel-behandelten Tieren und solchen, die mit S1P bzw. FTY720 behandelt wurden (kaum Inhibition von Zellinflux und Ödembildung). Bei der immunhistochemischen Darstellung wird jedoch deutlich, dass die Akkumulation von T-Zellen in der Haut S1P- und FTY720-behandelter Tiere erheblich reduziert ist (Abb. 4-17). Auch eine Verringerung der MHC-II<sup>+</sup>-Zellen ist ersichtlich, was auf einen reduzierten Influx von antigenpräsentierenden Zellen in das Entzündungsgebiet hinweist (Abb. 4-16). Auffällig ist, dass dies eine Zell-spezifische Wirkung ist, da der Neutrophilen-Zustrom (GR-1<sup>+</sup>) durch die topische Verabreichung der S1P-Rezeptor-Agonisten nicht beeinträchtigt wird (Abb. 4-19). Die geringere Ohrschwellung nach topischer Applikation von S1P und FTY720 während der Auslösephase kann unter anderem auf eine schwächere Infiltration mit CD3<sup>+</sup>- und MHC-II<sup>+</sup>-Zellen zurückgeführt werden. Obwohl durch die topische Applikation beabsichtigt wurde, die systemischen Wirkungen der Immunmodulatoren auszuschließen, kann die beobachtete Lymphopenie ebenfalls zu dem anti-entzündlichen Effekt beitragen.

Die DC präsentieren das erneut aufgenommene Allergen nicht nur allergenspezifischen T-Zellen in der Dermis, sondern wandern auch in der Auslösephase erneut zum drainierenden Lymphknoten und führen zu einer Proliferation der T-Zellen (BÄUMER et al. 2005). Die topische Applikation von TDI führt daher auch in der Challengephase zu einer signifikanten Zunahme des Lymphknotengewichts und der Gesamtzellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Durch die lokale Applikation von S1P und FTY720 zeigt sich im Gegensatz zur Sensibilisierung keine inhibitorische Wirkung auf das Gewicht und die Zellzahl der Lymphknoten im Vergleich zur Vehikel-behandelten Gruppe. Da das inflammatorische Geschehen in der Challengephase auf einem sehr viel höheren Niveau abläuft als in der Sensibilisierungsphase, sind hier nur starke

Immunmodulatoren in der Lage, das Lymphknotengewicht und die Gesamtzellzahl zu beeinflussen. Dies konnte beispielsweise für starke Glukokortikoide und den Calcineurin-Inhibitor Tacrolimus gezeigt werden (BÄUMER et al. 2005; BÄUMER et al. 2006).

Des Weiteren zeigen die ConA-stimulierten Zellen der regionalen Lymphknoten von TDI-sensibilisierten Mäusen nach *In-vivo*-Behandlung mit S1P keine signifikante Inhibition der IL-6-Sekretion im Vergleich zur Vehikel-behandelten Gruppe. Allerdings zeigen sich im Vergleich zur Sensibilisierung bereits bei der Vehikel-behandelten Gruppe sehr viel niedrigere Werte der IL-6-Konzentration. Da der Hauptmechanismus von lokal verabreichten S1P-Rezeptor-Agonisten vermutlich in der Beeinflussung der LC-Migration liegt, wird die Zytokinsekretion in der Challenge nur gering beeinflusst.

Um den Einfluss von lokalem S1P und FTY720 auf die DC-Migration auch in der Challengephase beurteilen zu können, wurde mit den behandelten Ohren ein *Skin-DC-Migration-Assay* durchgeführt. Die DC-Migration wird durch die lokale Applikation von S1P sowie durch die lokale Gabe von FTY720 signifikant gehemmt (Abb. 4-15). Auch hier ist die Beeinflussung der DC-Migration in der Internalisierung der S1P-Rezeptoren (S1P1 und S1P3) zu sehen.

In der Challengephase wurde zusätzlich IL-1 $\beta$  im Hauthomogenat gemessen. IL-1 $\beta$  gilt als ein typisches proinflammatorisches Zytokin und spielt bei der atopischen Dermatitis des Menschen eine Rolle (HOMEY et al. 2006). Es wird beispielsweise von aktivierten T-Gedächtniszellen, LC und Keratinozyten produziert. Die Langerhans-Zellen beginnen bereits 15 Minuten nach der Exposition mit dem Hapten mit der Synthetisierung und Freisetzung von IL-1 $\beta$  (ENK u. KATZ 1992). Vierundzwanzig Stunden nach der Challenge zeigt sich in den TDI-behandelten Ohren ein signifikanter Anstieg des Zytokins gegenüber der Kontrolle, was sich mit den ermittelten Ohrschwellungen dieser Gruppe deckt. Der deutliche Anstieg kann durch den verstärkten Influx von Entzündungszellen in die Haut erklärt werden. S1P

kann die TDI-induzierte Zytokinkonzentration von IL-1 $\beta$  in der Haut nur tendenziell hemmen. Diese marginale Inhibition ist erklärbar, da beispielsweise auch die neutrophilen Granulozyten als Quelle für Zytokine in Betracht kommen (CASSATELLA 1995) und der Neutrophilen-Zustrom (GR-1<sup>+</sup>) durch die topische Verabreichung der S1P-Rezeptor-Agonisten nicht beeinträchtigt wird.

### **5.3 Wirkung der Testsubstanzen auf die Zytokinsekretion stimulierter Keratinozyten *in vitro***

Keratinozyten leisten neben den dendritischen Zellen ebenfalls einen wesentlichen Beitrag zum Frühwarnsystem der Haut. Der erste Kontakt mit Haptenen sowie mit topisch verabreichten Arzneistoffen findet über Keratinozyten statt, welche aktiv an der kutanen immunologischen Antwort beteiligt sind. Sie exprimieren auf ihrer Zelloberfläche *Toll-like*-Rezeptoren, die sogenannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) erkennen können, zu denen unter anderem Lipopolysaccharid von gram-negativen Bakterien und Peptidoglykan als Zellwandbestandteil von *Staphylococcus aureus* gehören. Die Aktivierung der *Toll-like*-Rezeptoren führt zu einer Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen in Keratinozyten. In einer kürzlich veröffentlichten Studie über die an der atopischen Entzündung beteiligten Zytokine und Chemokine wird deutlich, dass Keratinozyten eine zentrale Stellung bei akuten und chronischen entzündlichen Prozessen einnehmen (HOMEY et al. 2006). Wenn die Aktivierung der Keratinozyten durch S1P oder FTY720 gehemmt werden könnte, fiel eine wichtige Quelle für Zytokine und Chemokine weg. Daher wurde die Wirkung der S1P-Rezeptor-Agonisten auf die Funktion caniner und muriner Keratinozyten getestet. Auch ein Vergleich der Keratinozyten-Funktionen zwischen den caninen Keratinozyten von Atopikern und von gesunden Tieren wurde angestrebt. Die meisten Publikationen benennen einen Einfluss von S1P auf die Keratinozytenproliferation (KIM et al. 2004; SCHÜPPEL et al. 2008). Zudem wurde kürzlich gezeigt, dass die topische Applikation von S1P die epidermale Hyperplasie, welche durch wiederholtes *Tape-Stripping* bei Mäusen ausgelöst wird, reduzieren kann (HONG et al. 2008). Da wiederholtes *Tape-Stripping* von einer Sekretion

mehrerer proinflammatorischer Zytokine und Chemokine wie  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{IL-8}$  und Histamin begleitet wird (WOOD et al. 1992; AMANO et al. 2007), könnte die topische Verabreichung von S1P auch Auswirkungen auf die Zytokinsekretion von Keratinozyten haben.  $\text{IL-8}$  ist bei Menschen mit atopischer Dermatitis erhöht (KIMATA u. LINDLEY 1994). Auch bei atopischen Hunden konnte eine erhöhte  $\text{IL-8}$ -mRNA 24 bis 48 Stunden nach der Allergen-Provokation gezeigt werden (MARSELLA et al. 2006). In der Zellkultur zeigt sich, dass S1P und FTY720 die Sekretion von  $\text{IL-8}$  und von dem funktionell homologen Chemokin KC der Maus in stimulierten caninen und murinen Keratinozyten beeinflusst. Die Ergebnisse bezüglich der Inhibition der LPS- und PGN-stimulierten  $\text{IL-8}$ - bzw. der murinen KC-Sekretion sind jedoch sehr heterogen. Die Stimulierung der murinen Keratinozyten mit LPS und PGN führt in allen Versuchen zu einem signifikanten Anstieg der KC-Konzentration im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. S1P ist jedoch nicht in allen Versuchsdurchführungen gleichermaßen in der Lage, die KC-Sekretion zu inhibieren. Dies lässt sich zum einen durch die unterschiedlich langen Inkubationszeiten und zum anderen durch die unterschiedliche Löslichkeit des S1P der verschiedenen Chargen erklären. In der murinen Keratinozyten-Zelllinie MSC wird in 2 von 3 Versuchsdurchführungen und einer Inkubationszeit des S1P von vier Tagen die LPS-induzierte KC Sekretion in den S1P-Konzentrationen  $1 \mu\text{mol/l}$  und  $10 \mu\text{mol/l}$  reduziert. Weiterhin fällt auf, dass S1P die LPS-induzierte KC-Sekretion stärker inhibieren kann als die PGN-induzierte. Auch die Versuche mit caninen Keratinozyten zeigen heterogene Ergebnisse. Die LPS-stimulierte  $\text{IL-8}$ -Sekretion normaler Keratinozyten wird durch die Inkubation mit  $1 \mu\text{mol/l}$  und  $10 \mu\text{mol/l}$  S1P sowie mit  $0,1 \mu\text{mol/l}$ ,  $0,5 \mu\text{mol/l}$  und  $1 \mu\text{mol/l}$  FTY720 signifikant gehemmt. Die PGN-stimulierte  $\text{IL-8}$ -Sekretion wird wiederum nicht bzw. kaum beeinflusst. Die Behandlung der Keratinozyten von Atopikern führt in fast allen Verdünnungsstufen von S1P und FTY720 zu einer signifikanten Inhibition der LPS- bzw. PGN-induzierten  $\text{IL-8}$ -Synthese. Die aus atopischen Ekzemen gewonnenen und kultivierten Keratinozyten zeigen im Durchschnitt weder spontan noch stimuliert deutlich veränderte Gehalte an  $\text{IL-8}$  im Vergleich zu den Kontrollkeratinozyten gesunder Tiere. Die Keratinozyten atopischer Hunde reagieren also nicht

empfindlicher auf Aktivierung via *Toll-like-2* und 4-Rezeptoren. FTY720 zeigt vor allem bei den Keratinozyten von Atopikern eine stärkere Inhibition als S1P. Die Inhibition von IL-8 und KC in LPS- und PGN-stimulierten Keratinozyten durch S1P und FTY720 besitzt ebenso wie der antiproliferative Effekt von S1P auf Keratinozyten eine klinische Relevanz, da eine erhöhte Sekretion dieser Chemokine bei Patienten mit AD festgestellt wurde (HOMEY et al. 2006). Da das verwendete Peptidoglykan Zellwandbestandteil von *Staphylococcus aureus* -einem wichtigen Triggerfaktor der atopischen Dermatitis- ist, kann eine über den *Toll-like*-Rezeptor-2 medierte Aktivierung der Keratinozyten einen weiteren proinflammatorischen Stimulus darstellen (KÖLLISCH et al. 2005). Daher stellt eine Hemmung oder zumindest Reduzierung der durch Stimulation mit Peptidoglykan aktivierten Zytokinkonzentration einen weiteren möglichen therapeutischen Effekt dar.

#### **5.4 Schlussfolgerung und Ausblick**

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen verschiedene Aspekte, die von entscheidender Bedeutung sind: Erstens beeinträchtigt die topische Verabreichung von S1P sowie FTY720 die Langerhans-Zell-Migration durch die Haut. Zweitens wird diese beeinträchtigte LC-Migration von einer geringeren lokalen Lymphknotenreaktion in der Sensibilisierung und einer verminderten entzündlichen Reaktion in der Auslösephase der allergischen Kontaktdermatitis begleitet. Des Weiteren sind S1P und FTY720 in der Lage, das Zytokinmuster sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu modulieren. Im Hinblick auf allergische Erkrankungen wie die atopische Dermatitis kann vermutet werden, dass die topische Verabreichung von FTY720 und S1P gegenüber der systemischen Verabreichung von S1P-Rezeptor-Agonisten einen Vorteil hat (NAKASHIMA et al. 2008). Unterstützt wird diese Vermutung durch die Tatsache, dass in der mRNA von läsionaler Haut der AD-Patienten eine verstärkte S1P-Lyase-Aktivität gefunden wurde (SEO et al. 2006). Demnach kann spekuliert werden, dass topisches S1P eine lokale immunsuppressive Aktivität in der Epidermis hat und dass der durch eine verstärkte S1P-Lyase-Aktivität in der Haut reduzierte S1P-Level in die Aktivierung der Langerhans-Zellen involviert ist.

Insgesamt legen die präsentierten Daten den Schluss nahe, dass die Beeinträchtigung der Migration von Langerhans-Zellen mit lokal wirkendem S1P oder FTY720 eine neue Möglichkeit in der Behandlung von allergischen Hauterkrankungen, wie der allergischen Kontaktdermatitis und der atopischen Dermatitis repräsentieren kann. Dieses muss in klinischen Studien untermauert werden. Studien zur topischen Verabreichung von S1P an atopischen Hunden sind in Vorbereitung. Da S1P ein körpereigener Stoff und Teil der Hautbarriere ist, kann davon ausgegangen werden, dass es hierbei nicht zu Unverträglichkeitsreaktionen kommt. Zudem ist S1P im Rahmen dieser Arbeit bereits ohne erkennbare Unverträglichkeitsreaktionen und über einen längeren Zeitraum hochdosiert topisch auf Mäusehaut appliziert worden.



## 6 Zusammenfassung

Ilka Reines

### Die Rolle des Sphingosin-1-Phosphats in der Pathogenese allergisch-entzündlicher Hauterkrankungen

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Sphingosin-1-Phosphat (S1P)-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten auf dendritische Zellen (DC), T-Zellen und Keratinozyten *in vitro* und *in vivo* untersucht. Bei den *In-vivo*-Untersuchungen war es von besonderem Interesse, ob die eingesetzten Testsubstanzen die allergische Immunreaktion sowohl in der Sensibilisierungsphase als auch in der Challengephase hemmen können und somit die Manifestation der Kontaktallergie unterdrückt wird. Als Agonisten wurden FTY720 und sein natürlicher Ligand S1P sowie der spezifische S1P1-Agonist SEW2871 eingesetzt. Als Antagonisten wurden W146 (S1P1) und VPC23019 (S1P1/S1P3) verwendet.

*In vivo* wurde der Einfluss der S1P-Rezeptor-Agonisten im murinen Kontaktallergiemodell in der Sensibilisierungs- und in der Challengephase untersucht. Als funktionelle Parameter dienten die entzündliche Ohrschwellung im *Mouse-Ear-Swelling-Test*, die zelluläre Reaktion im regionären Lymphknoten (Gewicht, Gesamtzellzahl, Anteil CD 11c/CD 40 positiver Zellen, Zytokinsekretion), die Migration dendritischer Zellen im *Skin-DC-Migration-Assay*, die Bestimmung der MHC-II<sup>+</sup>-Zellen in der Epidermis sowie in der Challenge zusätzlich die Bestimmung der MHC-II<sup>-</sup>, CD3<sup>+</sup>- und GR-1<sup>+</sup>-Zellen in der Haut.

Da die Migration von Langerhans-Zellen (LC) aus der Haut zu den Lymphknoten einen wesentlichen Schritt in der Pathogenese der allergischen Kontaktdermatitis (ACD) darstellt, könnte die Hemmung der LC-Migration eine neuartige Strategie zur Verbesserung solcher Hauterkrankungen darstellen. Im Maus-Modell der ACD wurde daher besonderes Augenmerk auf die Beeinflussung der DC-Migration durch topisch

verabreichtes S1P, FTY720 und SEW2871 gelegt. In der Sensibilisierungsphase reduzierten FTY720 und S1P das Gewicht und die Zellzahl der regionären Lymphknoten (Lnn. auriculares) sowie die Anzahl der durch die wiederholte topische Verabreichung des Haptens eingewanderten dendritischen Zellen (CD 11c<sup>+</sup>/CD 40<sup>+</sup>). Des Weiteren modulierte die lokale Applikation von S1P und FTY720 das Zytokinmuster in den regionalen Lymphknoten. Die Lymphknotenzellen S1P- und FTY720-behandelter Tiere zeigten eine signifikant geringere Sekretion der Zytokine IL-6 und IFN- $\gamma$ . Entsprechend der verminderten Anzahl CD 11c<sup>+</sup>/CD 40<sup>+</sup>-Zellen war die Dichte der LC in der Epidermis FTY720- und S1P-behandelter Mäuse höher als bei den Vehikel-behandelten Tieren. Ein durchgeführter *Skin-DC-Migration-Assay* bestätigte die signifikante Hemmung der Migration dendritischer Zellen von FTY720 und S1P. Die topische Applikation von SEW2871 hatte nur einen geringen Einfluss auf die Anzahl von CD 11c<sup>+</sup>- und CD 40<sup>+</sup>-Zellen im Lymphknoten. Dies zeigt, dass nicht alle Effekte ausschließlich über den S1P1-Rezeptor beziehungsweise dessen Internalisierung vermittelt werden. Tatsächlich deuten *In-vitro*-Versuche mit dem S1P1-Antagonisten W146 und dem S1P1/S1P3-Antagonisten VPC23019 darauf hin, dass die Hemmung von S1P3 für eine vollständige Hemmung der DC Migration von Bedeutung ist.

In der Auslösephase führten sowohl FTY720 als auch S1P zu einer verminderten entzündlichen Reaktion der ACD sowie zu einer reduzierten Akkumulation von T-Zellen in der Haut. Darüber hinaus wurde eine Verringerung der MHC-II<sup>+</sup>-Zellen ersichtlich, was auf einen reduzierten Zustrom von antigenpräsentierenden Zellen zum Ort der Antigen-Challenge hinweist.

Da die Keratinozyten durch die Synthese von Zytokinen und Chemokinen ebenfalls eine zentrale Stellung bei akuten und chronischen entzündlichen Prozessen einnehmen, wurde *in vitro* die Wirkung der S1P-Rezeptor-Agonisten auf die Funktion caniner und muriner Keratinozyten getestet. Es wird deutlich, dass S1P und FTY720 einen inhibierenden Effekt auf die IL-8- und KC-Sekretion (murines IL-8 Homolog) stimulierter caniner und muriner Keratinozyten ausüben können.

Diese Daten liefern schlüssige Beweise, dass die Beeinträchtigung der Migration von LC mit lokal verabreichtem S1P oder FTY720 wie auch die Modulation der

Zytokinproduktion eine neuartige Option in der Behandlung allergischer Hauterkrankungen wie der allergischen Kontaktdermatitis und der atopischen Dermatitis darstellen können. Des Weiteren kann im Hinblick auf allergische Erkrankungen wie der atopischen Dermatitis vermutet werden, dass die topische Verabreichung von FTY720 und S1P gegenüber der systemischen Verabreichung einen Vorteil und geringere unerwünschte systemische Wirkungen haben könnte.

## 7 Summary

Ilka Reines

### **The role of sphingosine-1-phosphate in the pathogenesis of allergic skin diseases**

In the present study the influence of sphingosine-1-phosphate (S1P)-receptor-agonists and -antagonists on dendritic cells, T-cells and keratinocytes *in vitro* and *in vivo* was investigated. During *In-vivo*-tests, it was of interest whether the test substances may inhibit the allergic reaction in the sensitization phase as well as in the challenge phase thereby decreasing the manifestation of contact dermatitis. As agonists FTY720 and its natural ligand S1P as well as the specific S1P1-agonist SEW2871 were used. W146 (S1P1) and VPC23019 (S1P1/S1P3) were used as antagonists.

*In vivo* efficacy of S1P-receptor-agonists was analysed in a model of TDI-induced allergic contact dermatitis, during the sensitization and the elicitation phase. As functional parameters the inflammatory allergen-induced ear swelling (*Mouse-Ear-Swelling-Test*), the cellular reaction in the draining lymph nodes (weight, number of total cells, rate of CD 11c/CD 40 positive cells, cytokine production), the migration of dendritic cells out of ear skin as well as the determination of MHC-II<sup>+</sup>-cells in the epidermis were used. In the challenge phase additionally the composition of MHC-II<sup>+</sup>-, CD3<sup>+</sup> and GR-1<sup>+</sup>-cells in the skin was studied.

As migration of Langerhans cells (LC) from the skin to the lymph node displays an essential step in the pathogenesis of allergic contact dermatitis (ACD), the inhibition of LC-migration could be a novel strategy to improve this skin disease. Therefore, we focused on the investigation of topically administered S1P, FTY720 and SEW2871 on dendritic cell function in the murine model of ACD. In the sensitization phase, FTY720 and S1P reduced the weight and cell count of the draining auricular lymph node, as well as immigrated dendritic cells (CD 11c<sup>+</sup>/CD 40<sup>+</sup>-cells) provoked by

repetitive topical administration of the hapten. In addition, the topical application of S1P and FTY720 impaired the cytokine production profile of IL-6 and IFN- $\gamma$  in the draining lymph node.

In accordance to the reduced number of CD 11c<sup>+</sup>/CD 40<sup>+</sup>-cells, the density of LC in the epidermis was higher in FTY720 and S1P treated mice compared to vehicle treatment. A skin dendritic cell migration assay confirmed the significant inhibition of dendritic cell migration by FTY720 and S1P. Topical application of SEW2871 only slightly reduced the number of CD 11c<sup>+</sup>/CD 40<sup>+</sup>-cells in the auricular lymph node. These results indicate that not all effects are mediated solely via the S1P1, or more precisely its internalization. *In-vitro*-experiments with the S1P1 antagonist W146 and the S1P1/S1P3 antagonist VPC23019 indicate that blocking of S1P3 is essential for a complete inhibition DC migration.

In the elicitation phase of ACD topical administration of FTY720 as well as S1P inhibited the inflammatory reaction and resulted in a vastly reduced accumulation of T-cells in the skin. Furthermore, a reduction of MHCII<sup>+</sup>-cells is apparent, indicating a reduced influx of antigen presenting cells into the site of antigen challenge.

Keratinocytes release a variety of cytokines and chemokines and play a pivotal role in acute and chronic allergic inflammatory diseases, too. Thus, we investigated the impact of S1P-agonists on cytokine secretion from keratinocytes *in vitro*. The results indicate that S1P and FTY720 are able to reduce the IL-8 and KC secretion (murine IL-8 homologue) in stimulated canine and murine keratinocyte cell lines, respectively. These data supply conclusive evidence that the strategy of targeting the migratory response of LC with locally acting S1P or FTY720, as well as the modulation of the cytokine production profile, represents a novel option in the treatment of allergic skin diseases like contact hypersensitivity and atopic dermatitis.

## 8 Literaturverzeichnis

AKAGAWA, K. S., N. TAKASUKA, Y. NOZAKI, I. KOMURO, M. AZUMA, M. UEDA, M. NAITO u. K. TAKAHASHI (1996):

Generation of CD1+RelB+ dendritic cells and tartrate-resistant acid phosphatase-positive osteoclast-like multinucleated giant cells from human monocytes.

Blood 88, 4029-4039

AKDIS, C. A., M. AKDIS, T. BIEBER, C. BINDSLEV-JENSEN, M. BOGUNIEWICZ, P. EIGENMANN, Q. HAMID, A. KAPP, D. Y. LEUNG, J. LIPOZENCIC, T. A. LUGER, A. MURARO, N. NOVAK, T. A. PLATTS-MILLS, L. ROSENWASSER, A. SCHEYNIUS, F. E. SIMONS, J. SPERGEL, K. TURJANMAA, U. WAHN, S. WEIDINGER, T. WERFEL u. T. ZUBERBIER (2006):

Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL Consensus Report.

Allergy 61, 969-987

ALLENDE, M. L., J. L. DREIER, S. MANDALA u. R. L. PROIA (2004):

Expression of the sphingosine 1-phosphate receptor, S1P1, on T-cells controls thymic emigration.

J. Biol. Chem. 279, 15396-15401

AMANO, T., T. TAKEDA, H. YANO u. T. TAMURA (2007):

Olopatadine hydrochloride accelerates the recovery of skin barrier function in mice.

Br. J. Dermatol. 156, 906-912

BACHMANN, M. F., K. MCKALL-FAIENZA, R. SCHMITS, D. BOUCHARD, J. BEACH, D. E. SPEISER, T. W. MAK u. P. S. OHASHI (1997):  
Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation.  
Immunity 7, 549-557

BANCHEREAU, J. u. R. M. STEINMAN (1998):  
Dendritic cells and the control of immunity.  
Nature 392, 245-252

BARKER, J. N., R. S. MITRA, C. E. GRIFFITHS, V. M. DIXIT u. B. J. NICKOLOFF (1991):  
Keratinocytes as initiators of inflammation.  
Lancet 337, 211-214

BÄUMER, W., S. KREKELER, V. C. DEVRIES, F. NIEDORF, T. TSCHERNIG u. M. KIETZMANN (2006):  
Non-steroidal and steroidal anti-inflammatory drugs vary in their modulation of dendritic cell function in the elicitation phase of allergic contact dermatitis.  
Exp. Dermatol. 15, 322-329

BÄUMER, W., U. SEEGER, M. BRAUN, T. TSCHERNIG u. M. KIETZMANN (2004):  
TARC and RANTES, but not CTACK, are induced in two models of allergic contact dermatitis. Effects of cilomilast and diflorasone diacetate on T-cell-attracting chemokines.  
Br. J. Dermatol. 151, 823-830

BÄUMER, W., B. SULZLE, H. WEIGT, V. C. DE VRIES, M. HECHT, T. TSCHERNIG  
u. M. KIETZMANN (2005):

Cilomilast, tacrolimus and rapamycin modulate dendritic cell function in the elicitation  
phase of allergic contact dermatitis.

Br. J. Dermatol. 153, 136-144

BIEDERMANN, T., M. ROCKEN u. J. M. CARBALLIDO (2004):

TH1 and TH2 lymphocyte development and regulation of TH cell-mediated immune  
responses of the skin.

J. Invest. Dermatol. Symp. Proc. 9, 5-14

BILLICH, A., F. BORNANCIN, P. DEVAY, D. MECHTCHERIAKOVA, N. URTZ u. T.  
BAUMRUKER (2003):

Phosphorylation of the immunomodulatory drug FTY720 by sphingosine kinases.

J. Biol. Chem. 278, 47408-47415

BJÖRCK, P. (2001):

Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and  
granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice.

Blood 98, 3520-3526

BRADFORD, M. M. (1976):

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein  
utilizing the principle of protein-dye binding.

Analytic. Biochem. 72, 248-254

BRINKMANN, V., J. G. CYSTER u. T. HLA (2004):

FTY720: sphingosine 1-phosphate receptor-1 in the control of lymphocyte egress  
and endothelial barrier function.

Am. J. Transplant. 4, 1019-1025



BRINKMANN, V., M. D. DAVIS, C. E. HEISE, R. ALBERT, S. COTTENS, R. HOF, C. BRUNS, E. PRIESCHL, T. BAUMRUKER, P. HIESTAND, C. A. FOSTER, M. ZOLLINGER u. K. R. LYNCH (2002):

The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors.  
J. Biol. Chem. 277, 21453-21457

BROWN, B. A., P. P. KANTESARIA u. L. M. MCDEVITT (2007):

Fingolimod: a novel immunosuppressant for multiple sclerosis.  
Ann. Pharmacotherap. 41, 1660-1668

CARTER, L. L. u. R. W. DUTTON (1996):

Type 1 and type 2: a fundamental dichotomy for all T-cell subsets.  
Curr. Opin. Immunol. 8, 336-342

CASSATELLA, M. A. (1995):

The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils.  
Immunol. today 16, 21-26

CAUX, C., S. AIT-YAHIA, K. CHEMIN, O. DE BOUTEILLER, M. C. DIEU-NOSJEAN, B. HOMEY, C. MASSACRIER, B. VANBERVLIET, A. ZLOTNIK u. A. VICARI (2000):  
Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines.  
Springer Semin. Immunopathol. 22, 345-369

CELLA, M., D. JARROSSAY, F. FACCHETTI, O. ALEBARDI, H. NAKAJIMA, A. LANZAVECCHIA u. M. COLONNA (1999):

Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon.  
Nature Med. 5, 919-923

CHEN, T., J. GUO, M. YANG, C. HAN, M. ZHANG, W. CHEN, Q. LIU, J. WANG u. X. CAO (2004):

Cyclosporin A impairs dendritic cell migration by regulating chemokine receptor expression and inhibiting cyclooxygenase-2 expression.

Blood 103, 413-421

CHIBA, K., Y. HOSHINO, M. OHTSUKI, H. KATAOKA, Y. MAEDA, H. MATSUYUKI, K. SUGAHARA, M. KIUCHI, R. HIROSE u. K. ADACHI (2005):

Immunosuppressive activity of FTY720, sphingosine 1-phosphate receptor agonist: I. Prevention of allograft rejection in rats and dogs by FTY720 and FTY720-phosphate.

Transplant. Proc. 37, 102-106

CHUN, J., E. J. GOETZL, T. HLA, Y. IGARASHI, K. R. LYNCH, W. MOOLENAAR, S. PYNE u. G. TIGYI (2002):

International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature.

Pharmacol. Rev. 54, 265-269

CUMBERBATCH, M., R. J. DEARMAN, C. E. GRIFFITHS u. I. KIMBER (2003):

Epidermal Langerhans cell migration and sensitisation to chemical allergens.

APMIS 111, 797-804

CUVILLIER, O., G. PIRIANOV, B. KLEUSER, P. G. VANEK, O. A. COSO, S. GUTKIND u. S. SPIEGEL (1996):

Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate.

Nature 381, 800-803

CZELOTH, N., G. BERNHARDT, F. HOFMANN, H. GENTH u. R. FÖRSTER (2005):

Sphingosine-1-phosphate mediates migration of mature dendritic cells.

J. Immunol. 175, 2960-2967

DAVIS, M. D., J. J. CLEMENS, T. L. MACDONALD u. K. R. LYNCH (2005):  
Sphingosine 1-phosphate analogs as receptor antagonists.  
J. Biol. Chem. 280, 9833-9841

DEARMAN, R. J., D. A. BASKETTER u. I. KIMBER (1996):  
Characterization of chemical allergens as a function of divergent cytokine secretion  
profiles induced in mice.  
Toxicol. Appl. Pharmacol. 138, 308-316

DEBOER, D. J. u. R. MARSELLA (2001):  
The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XII): the relationship of cutaneous  
infections to the pathogenesis and clinical course of canine atopic dermatitis.  
Vet. Immunol. Immunopathol. 81, 239-249

EHLING, G., M. HECHT, A. HEUSENER, J. HUESLER, A. O. GAMER, H. VAN  
LOVEREN, T. MAURER, K. RIECKE, L. ULLMANN, P. ULRICH, R. VANDEBRIEL u.  
H. W. VOHR (2005):  
An European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local  
lymph node assay: 2nd round.  
Toxicol. 212, 69-79

EISEN, H. N., L. ORRIS u. S. BELMAN (1952):  
Elicitation of delayed allergic skin reactions with haptens; the dependence of  
elicitation on hapten combination with protein.  
J. Exp. Med. 95, 473-487

ENK, A. H. u. S. I. KATZ (1992):  
Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 1398-1402

FÖRSTER, R., A. SCHUBEL, D. BREITFELD, E. KREMMER, I. RENNER-MÜLLER, E. WOLF u. M. LIPP (1999):

CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs.

Cell 99, 23-33

FRITSCH, P. (2004):

Dermatologie und Venerologie: Lehrbuch und Atlas.

2. Auflage, Springer-Verlag Berlin

FROMM, C., O. A. COSO, S. MONTANER, N. XU u. J. S. GUTKIND (1997):

The small GTP-binding protein Rho links G protein-coupled receptors and Galpha12 to the serum response element and to cellular transformation.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 10098-10103

FUJITA, T., K. INOUE, S. YAMAMOTO, T. IKUMOTO, S. SASAKI, R. TOYAMA, K. CHIBA, Y. HOSHINO u. T. OKUMOTO (1994):

Fungal metabolites. Part 11. A potent immunosuppressive activity found in Isaria sinclairii metabolite.

J. Antibiot. 47, 208-215

GAD, S. C., B. J. DUNN, D. W. DOBBS, C. REILLY u. R. D. WALSH (1986):

Development and validation of an alternative dermal sensitization test: the mouse ear swelling test (MEST).

Toxicol. Appl. Pharmacol. 84, 93-114

GHOSH, T. K., J. BIAN u. D. L. GILL (1994):

Sphingosine 1-phosphate generated in the endoplasmic reticulum membrane activates release of stored calcium.

J. Biol. Chem. 269, 22628-22635

GIROLOMONI, G. u. S. PASTORE (2001):

The role of keratinocytes in the pathogenesis of atopic dermatitis.

J Am. Acad. Dermatol. 45, S25-28

GOEBELER, M., A. TRAUTMANN, A. VOSS, E. V. BROCKER, A. TOKSOY u. R. GILLITZER (2001):

Differential and sequential expression of multiple chemokines during elicitation of allergic contact hypersensitivity.

Am. J. Pathol. 158, 431-440

GOETZL, E. J. u. S. AN (1998):

Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate.

FASEB J. 12, 1589-1598

GOLLMANN, G., H. NEUWIRT, C. H. TRIPP, H. MUELLER, G. KONWALINKA, C. HEUFLER, N. ROMANI u. M. TIEFENTHALER (2008):

Sphingosine-1-phosphate receptor type-1 agonism impairs blood dendritic cell chemotaxis and skin dendritic cell migration to lymph nodes under inflammatory conditions.

Int. Immunol. 20, 911-923

GOODEMOTE, K. A., M. E. MATTIE, A. BERGER u. S. SPIEGEL (1995):

Involvement of a pertussis toxin-sensitive G protein in the mitogenic signaling pathways of sphingosine 1-phosphate.

J. Biol. Chem. 270, 10272-10277

GRABBE, S. u. T. SCHWARZ (1998):

Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity.

Immunol. today 19, 37-44

GRÄLER, M. H., G. BERNHARDT u. M. LIPP (1998):

EDG6, a novel G-protein-coupled receptor related to receptors for bioactive lysophospholipids, is specifically expressed in lymphoid tissue.

Genomics 53, 164-169

GRÄLER, M. H. u. E. J. GOETZL (2004):

The immunosuppressant FTY720 down-regulates sphingosine 1-phosphate G-protein-coupled receptors.

FASEB J. 18, 551-553

GRIFFIN, C. E. u. D. J. DEBOER (2001):

The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIV): clinical manifestations of canine atopic dermatitis.

Vet. Immunol. Immunopathol. 81, 255-269

GUTERMUTH, J., M. OLLERT, J. RING, H. BEHRENDT u. T. JAKOB (2004):

Mouse models of atopic eczema critically evaluated.

Int. Arch. Allergy Immunol. 135, 262-276

HART, D. N. u. J. W. FABRE (1981):

Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain.

J. Exp. Med. 154, 347-361

HILKENS, C. M., A. SNIJDERS, H. VERMEULEN, P. H. VAN DER MEIDE, E. A. WIERENGA u. M. L. KAPSENBERG (1996):

Accessory cell-derived IL-12 and prostaglandin E2 determine the IFN- gamma level of activated human CD4+ T cells.

J. Immunol. 156, 1722-27

HILL, P. B. u. D. J. DEBOER (2001):

The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IV): environmental allergens.

Vet. Immunol. Immunopathol. 81, 169-186

HILLIER, A. u. C. E. GRIFFIN (2001):

The ACVD task force on canine atopic dermatitis (I): incidence and prevalence.

Vet. Immunol. Immunopathol. 81, 147-151

HLA, T., M. J. LEE, N. ANCELLIN, S. THANGADA, C. H. LIU, M. KLUK, S. S. CHAE  
u. M. T. WU (2000):

Sphingosine-1-phosphate signaling via the EDG-1 family of G-protein-coupled receptors.

Ann. N. Y. Acad. Sci. 905, 16-24

HLA, T. u. T. MACIAG (1990):

An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors.

J. Biol. Chem. 265, 9308-9313

HOETZENECKER, W., J. G. MEINGASSNER, R. ECKER, G. STINGL, A. STUETZ  
u. A. ELBE-BURGER (2004):

Corticosteroids but not pimecrolimus affect viability, maturation and immune function of murine epidermal Langerhans cells.

J. Invest. Dermatol. 122, 673-684

HOMEY, B., T. ASSMANN, H. W. VOHR, P. ULRICH, A. I. LAUERMA, T. RUZICKA,  
P. LEHMANN u. H. C. SCHUPPE (1998):

Topical FK506 suppresses cytokine and costimulatory molecule expression in epidermal and local draining lymph node cells during primary skin immune responses.

J. Immunol. 160, 5331-5340

HOMEY, B., M. STEINHOFF, T. RUZICKA u. D. Y. LEUNG (2006):  
Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation.  
J. Allergy Clin. Immunol. 118, 178-189

HONG, J. H., J. K. YOUM, M. J. KWON, B. D. PARK, Y. M. LEE, S. I. LEE, D. M. SHIN u. S. H. LEE (2008):  
K6PC-5, a direct activator of sphingosine kinase 1, promotes epidermal differentiation through intracellular Ca(2+) signaling.  
J. Invest. Dermatol. 128(9), 2166-2178

IDZKO, M., H. HAMMAD, M. VAN NIMWEGEN, M. KOOL, T. MÜLLER, T. SOULLIE, M. A. WILLART, D. HIJDRA, H. C. HOOGSTEDEN u. B. N. LAMBRECHT (2006):  
Local application of FTY720 to the lung abrogates experimental asthma by altering dendritic cell function.  
J. Clin. Invest. 116, 2935-2944

IDZKO, M., E. PANTHER, S. CORINTI, A. MORELLI, D. FERRARI, Y. HEROUY, S. DICHMANN, M. MOCKENHAUPT, P. GEBICKE-HAERTER, F. DI VIRGILIO, G. GIROLOMONI u. J. NORGAUER (2002):  
Sphingosine 1-phosphate induces chemotaxis of immature and modulates cytokine-release in mature human dendritic cells for emergence of Th2 immune responses.  
FASEB J. 16, 625-627

IM, D. S., C. E. HEISE, N. ANCELLIN, B. F. O'DOWD, G. J. SHEI, R. P. HEAVENS, M. R. RIGBY, T. HLA, S. MANDALA, G. MCALLISTER, S. R. GEORGE u. K. R. LYNCH (2000):  
Characterization of a novel sphingosine 1-phosphate receptor, Edg-8.  
J. Biol. Chem. 275, 14281-14286



ISHII, I., N. FUKUSHIMA, X. YE u. J. CHUN (2004):  
Lysophospholipid receptors: signaling and biology.  
Ann. Rev. Biochem. 73, 321-354

JANEWAY, C.A. u. P. TRAVERS (2001):  
Immunobiology  
5. Auflage  
Garland Publishing, New York

JENSEN, J. M., R. FOLSTER-HOLST, A. BARANOWSKY, M. SCHUNCK, S.  
WINOTO-MORBACH, C. NEUMANN, S. SCHUTZE u. E. PROKSCH (2004):  
Impaired sphingomyelinase activity and epidermal differentiation in atopic dermatitis.  
J. Invest. Dermatol. 122, 1423-1431

JO, E., M. G. SANNA, P. J. GONZALEZ-CABRERA, S. THANGADA, G. TIGYI, D. A.  
OSBORNE, T. HLA, A. L. PARRILL u. H. ROSEN (2005):  
S1P1-selective in vivo-active agonists from high-throughput screening: off-the-shelf  
chemical probes of receptor interactions, signaling, and fate.  
Chem. Biol. 12, 703-715

JUNE, C. H., J. A. LEDBETTER, T. LINDSTEN u. C. B. THOMPSON (1989):  
Evidence for the involvement of three distinct signals in the induction of IL-2 gene  
expression in human T lymphocytes.  
J. Immunol. 143, 153-161

KAPSENBERG, M. L., C. M. HILKENS, E. A. WIERENGA u. P. KALINSKI (1998):  
The role of antigen-presenting cells in the regulation of allergen-specific T cell  
responses.  
Curr. Opin. Immunol. 10, 607-613

KIM, D. S., S. Y. KIM, B. KLEUSER, M. SCHAFER-KORTING, K. H. KIM u. K. C. PARK (2004):

Sphingosine-1-phosphate inhibits human keratinocyte proliferation via Akt/protein kinase B inactivation.

Cell. Signal 16, 89-95

KIMATA, H. u. I. LINDLEY (1994):

Detection of plasma interleukin-8 in atopic dermatitis.

Arch. Dis. Child. 70, 119-122

KIMBER, I. u. R. J. DEARMAN (2002):

Allergic contact dermatitis: the cellular effectors.

Contact Dermatitis 46, 1-5

KOBAYASHI, Y., M. MATSUMOTO, M. KOTANI u. T. MAKINO (1999):

Possible involvement of matrix metalloproteinase-9 in Langerhans cell migration and maturation.

J. Immunol. 163, 5989-5993

KOHAMA, T., A. OLIVERA, L. EDSALL, M. M. NAGIEC, R. DICKSON u. S.

SPIEGEL (1998):

Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase.

J. Biol. Chem. 273, 23722-23728

KOHNO, T., T. TSUJI, K. HIRAYAMA, K. WATABE, A. MATSUMOTO, T. KOHNO u. T. FUJITA (2004):

A novel immunomodulator, FTY720, prevents spontaneous dermatitis in NC/Nga mice.

Biol. Pharm. Bull. 27, 1392-1396

KÖLLISCH, G., B. N. KALALI, V. VOELCKER, R. WALLICH, H. BEHRENDT, J. RING, S. BAUER, T. JAKOB, M. MEMPEL u. M. OLLERT (2005):

Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes.

Immunol. 114, 531-541

KON, J., K. SATO, T. WATANABE, H. TOMURA, A. KUWABARA, T. KIMURA, K. TAMAMA, T. ISHIZUKA, N. MURATA, T. KANDA, I. KOBAYASHI, H. OHTA, M. UI u. F. OKAJIMA (1999):

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. 274, 23940-23947

KRAMER, M.D., HÄNSCH, G.M. u. B. SCHÄFER (1997):

Immunologie und Immunpathologie

Thieme Verlag, Stuttgart

KRASTEVA, M., J. KEHREN, M. T. DUCLUZEAU, M. SAYAG, M. CACCIAPUOTI, H. AKIBA, J. DESCOTES u. J. F. NICOLAS (1999):

Contact dermatitis I. Pathophysiology of contact sensitivity.

Eur. J. Dermatol. 9, 65-77

LAN, Y. Y., A. DE CREUS, B. L. COLVIN, M. ABE, V. BRINKMANN, P. T. COATES u. A. W. THOMSON (2005):

The sphingosine-1-phosphate receptor agonist FTY720 modulates dendritic cell trafficking in vivo.

Am. J. Transplant. 5, 2649-2659

LANGERHANS, P. (1868):

Über die Nerven der menschlichen Haut.

Virch. Arch. 44, 235-33

LEE, H., E. J. GOETZL u. S. AN (2000):

Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate stimulate endothelial cell wound healing.

Am. J. Physiol. 278, C612-618

LEE, M. J., S. THANGADA, K. P. CLAFFEY, N. ANCELLIN, C. H. LIU, M. KLUK, M. VOLPI, R. I. SHA'AFI u. T. HLA (1999):

Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate.

Cell 99, 301-312

LEE, M. J., J. R. VAN BROCKLYN, S. THANGADA, C. H. LIU, A. R. HAND, R. MENZELEE, S. SPIEGEL u. T. HLA (1998):

Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1.

Science N.Y. 279, 1552-1555

LEONHARD, H. (1990):

Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen.

8. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, New York

LEUNG, D. Y. u. T. BIEBER (2003):

Atopic dermatitis.

Lancet 361, 151-160

LIEBICH, H. G., S. REESE u. K. H. BUDRAS (1999):  
Funktionelle Histologie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für das Studium  
und Praxis.

3. Auflage, Schattauer, Stuttgart

LIPSCOMB, M. F. u. B. J. MASTEN (2002):  
Dendritic cells: immune regulators in health and disease.  
Physiol. Rev. 82, 97-130

LIU, C. H. u. T. HLA (1997):  
The mouse gene for the inducible G-protein-coupled receptor edg-1.  
Genomics 43, 15-24

LIU, C. H., S. THANGADA, M. J. LEE, J. R. VAN BROCKLYN, S. SPIEGEL u. T.  
HLA (1999):  
Ligand-induced trafficking of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1.  
Mol. Biol. Cell 10, 1179-1190

LIU, H., M. SUGIURA, V. E. NAVA, L. C. EDSALL, K. KONO, S. POULTON, S.  
MILSTIEN, T. KOHAMA u. S. SPIEGEL (2000a):  
Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine  
kinase type 2 isoform.  
J. Biol. Chem. 275, 19513-19520

LIU, Y., R. WADA, T. YAMASHITA, Y. MI, C. X. DENG, J. P. HOBSON, H. M.  
ROSENFELDT, V. E. NAVA, S. S. CHAE, M. J. LEE, C. H. LIU, T. HLA, S. SPIEGEL  
u. R. L. PROIA (2000b):  
Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for  
vascular maturation.  
J. Clin. Invest. 106, 951-961

LIU, Y. J. (2001):

Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity.

Cell 106, 259-262

LUTZ, M. B., N. KUKUTSCH, A. L. J. OGILVIE, S. RÖSSNER, F. KOCH, N. ROMANI u. G. SCHULER (1999):

An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow.

J. Immunol. Meth. 223, 77-92

MACLENNAN, A. J., C. S. BROWNE, A. A. GASKIN, D. C. LADO u. G. SHAW (1994):  
Cloning and characterization of a putative G-protein coupled receptor potentially involved in development.

Mol. Cell. Neurosci. 5, 201-209

MACLENNAN, A. J., P. R. CARNEY, W. J. ZHU, A. H. CHAVES, J. GARCIA, J. R. GRIMES, K. J. ANDERSON, S. N. ROPER u. N. LEE (2001):

An essential role for the H218/AGR16/Edg-5/LP(B2) sphingosine 1-phosphate receptor in neuronal excitability.

J. Neurosci. 14, 203-209

MACLENNAN, A. J., L. MARKS, A. A. GASKIN u. N. LEE (1997):

Embryonic expression pattern of H218, a G-protein coupled receptor homolog, suggests roles in early mammalian nervous system development.

Neurosci. 79, 217-224

MANDALA, S., R. HAJDU, J. BERGSTROM, E. QUACKENBUSH, J. XIE, J. MILLIGAN, R. THORNTON, G. J. SHEI, D. CARD, C. KEOHANE, M. ROSENBAACH, J. HALE, C. L. LYNCH, K. RUPPRECHT, W. PARSONS u. H. ROSEN (2002):  
Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists.  
Science (New York, N.Y. 296, 346-349

MARSELLA, R., T. OLIVRY u. S. MAEDA (2006):  
Cellular and cytokine kinetics after epicutaneous allergen challenge (atopy patch testing) with house dust mites in high-IgE beagles.  
Vet. Dermatol. 17, 111-120

MATLOUBIAN, M., C. G. LO, G. CINAMON, M. J. LESNESKI, Y. XU, V. BRINKMANN, M. L. ALLENDE, R. L. PROIA u. J. G. CYSTER (2004):  
Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1.  
Nature 427, 355-360

MELNIK, B. (2006):  
[Disturbances of antimicrobial lipids in atopic dermatitis].  
J. Dtsch. Dermatol. Ges. 4, 114-123

MERAD, M., M. G. MANZ, H. KARSUNKY, A. WAGERS, W. PETERS, I. CHARO, I. L. WEISSMAN, J. G. CYSTER u. E. G. ENGLEMAN (2002):  
Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions.  
Nature Immunol. 3, 1135-1141

MÜLLER, H., S. HOFER, N. KANEIDER, H. NEUWIRT, B. MOSHEIMER, G. MAYER, G. KONWALINKA, C. HEUFLER u. M. TIEFENTHALER (2005):  
The immunomodulator FTY720 interferes with effector functions of human monocyte-derived dendritic cells.  
Eur. J. Immunol. 35, 533-545

NAKASHIMA, D., K. KABASHIMA, J. I. SAKABE, K. SUGITA, T. KOBAYASHI, R. YOSHIKI u. Y. TOKURA (2008):  
Impaired initiation of contact hypersensitivity by FTY720.  
J. Invest. Dermatol. 128(12), 2833-2841

NASORRI, F., S. SEBASTIANI, V. MARIANI, O. DE PITA, P. PUDDU, G. GIROLOMONI u. A. CAVANI (2002):  
Activation of nickel-specific CD4+ T lymphocytes in the absence of professional antigen-presenting cells.  
J. Invest. Dermatol. 118, 172-179

NGUYEN, L. T., S. RADHAKRISHNAN, B. CIRIC, K. TAMADA, T. SHIN, D. M. PARDOLL, L. CHEN, M. RODRIGUEZ u. L. R. PEASE (2002):  
Cross-linking the B7 family molecule B7-DC directly activates immune functions of dendritic cells.  
J. Exp. Med. 196, 1393-1398

NOVAK, N., J. P. ALLAM, T. HAGEMANN, C. JENNECK, S. LAFFER, R. VALENTA, J. KOCHAN u. T. BIEBER (2004):  
Characterization of FcepsilonRI-bearing CD123 blood dendritic cell antigen-2 plasmacytoid dendritic cells in atopic dermatitis.  
J. Allergy Clin. Immunol. 114, 364-370

NUTTALL, T. J., P. A. KNIGHT, S. M. MCALEESE, J. R. LAMB u. P. B. HILL (2002):  
Expression of Th1, Th2 and immunosuppressive cytokine gene transcripts in canine atopic dermatitis.  
Clin. Exp. Allergy 32, 789-795



OHL, L., M. MOHAUPT, N. CZELOTH, G. HINTZEN, Z. KIAFARD, J. ZWIRNER, T. BLANKENSTEIN, G. HENNING u. R. FORSTER (2004):  
CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions.  
Immunity 21, 279-288

OKAMOTO, H., N. TAKUWA, K. GONDA, H. OKAZAKI, K. CHANG, Y. YATOMI, H. SHIGEMATSU u. Y. TAKUWA (1998):  
EDG1 is a functional sphingosine-1-phosphate receptor that is linked via a Gi/o to multiple signaling pathways, including phospholipase C activation, Ca<sup>2+</sup> mobilization, Ras-mitogen-activated protein kinase activation, and adenylate cyclase inhibition.  
J. Biol. Chem. 273, 27104-27110

OKAMOTO, H., N. TAKUWA, T. YOKOMIZO, N. SUGIMOTO, S. SAKURADA, H. SHIGEMATSU u. Y. TAKUWA (2000):  
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. 20, 9247-9261

OLIVERA, A., H. M. ROSENFELDT, M. BEKTAS, F. WANG, I. ISHII, J. CHUN, S. MILSTIEN u. S. SPIEGEL (2003):  
Sphingosine kinase type 1 induces G12/13-mediated stress fiber formation, yet promotes growth and survival independent of G protein-coupled receptors.  
J. Biol. Chem. 278, 46452-46460

OLIVRY, T. u. P. B. HILL (2001):  
The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVIII): histopathology of skin lesions.  
Vet. Immunol. Immunopathol. 81, 305-309

ORTNER, U., K. INABA, F. KOCH, M. HEINE, M. MIWA, G. SCHULER u. N. ROMANI (1996):

An improved isolation method for murine migratory cutaneous dendritic cells.  
J. Immunol. Meth. 193, 71-79

PANHANS-GROSS, A., N. NOVAK, S. KRAFT u. T. BIEBER (2001):

Human epidermal Langerhans' cells are targets for the immunosuppressive macrolide tacrolimus (FK506).

J. Allergy Clin. Immunol. 107, 345-352

PASTORE, S., E. FANALES-BELASIO, C. ALBANESI, L. M. CHINNI, A. GIANNETTI u. G. GIROLOMONI (1997):

Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is overproduced by keratinocytes in atopic dermatitis. Implications for sustained dendritic cell activation in the skin.

J. Clin. Invest. 99, 3009-3017

PAYNE, S. G., S. MILSTIEN u. S. SPIEGEL (2002):

Sphingosine-1-phosphate: dual messenger functions.

FEBS Lett. 531, 54-57

PULENDRAN, B., J. BANCHEREAU, E. MARASKOVSKY u. C. MALISZEWSKI (2001):

Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors.

Trends Immunol. 22, 41-47

PYNE, S. u. N. PYNE (2000):

Sphingosine 1-phosphate signalling via the endothelial differentiation gene family of G-protein-coupled receptors.

Pharmacol. Ther. 88, 115-131

RADEFF-HUANG, J., T. M. SEASHOLTZ, R. G. MATTEO u. J. H. BROWN (2004):  
G protein mediated signaling pathways in lysophospholipid induced cell proliferation  
and survival.

J. Biol. Chem. 92, 949-966

RADEKE, H. H., H. VON WENCKSTERN, K. STOIDTNER, B. SAUER, S. HAMMER  
u. B. KLEUSER (2005):

Overlapping signaling pathways of sphingosine 1-phosphate and TGF-beta in the  
murine Langerhans cell line XS52.

J. Immunol. 174, 2778-2786

RATZINGER, G., P. STOITZNER, S. EBNER, M. B. LUTZ, G. T. LAYTON, C.  
RAINER, R. M. SENIOR, J. M. SHIPLEY, P. FRITSCH, G. SCHULER u. N. ROMANI  
(2002):

Matrix metalloproteinases 9 and 2 are necessary for the migration of Langerhans  
cells and dermal dendritic cells from human and murine skin.

J. Immunol. 168, 4361-4371

RENKL, A., L. BEROD, M. MOCKENHAUPT, M. IDZKO, E. PANTHER, C.  
TERMEER, P. ELSNER, M. HUBER u. J. NORGAUER (2004):

Distinct effects of sphingosine-1-phosphate, lysophosphatidic acid and histamine in  
human and mouse dendritic cells.

Int. J. Mol. Med. 13, 203-209

RICHTER, W. u. W. LINSS (1998):

Haut und Hautanhangsgebilde.

in: Linss, W., J. Fasshänel (Hrsg.): Histologie, Zytologie, Allgemeine Histologie,  
Mikroskopische Anatomie.

Walter de Gruyter, Berlin, New York

RIEMANN, H., T. SCHWARZ u. S. GRABBE (2003):  
[Pathomechanisms of the elicitation phase of allergic contact dermatitis].  
J. Dtsch. Dermatol. Ges. 1, 613-619

RING, J. (1983):  
Was ist Atopie?  
in: BRAUN-FALCO, O., G. BURG (Hrsg.): Fortschritte der praktischen Dermatologie  
und Venerologie.  
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg

ROMANI, N., S. HOLZMANN, C. H. TRIPP, F. KOCH u. P. STOITZNER (2003):  
Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis.  
APMIS 111, 725-740

RUWISCH, L., M. SCHAFER-KORTING u. B. KLEUSER (2001):  
An improved high-performance liquid chromatographic method for the determination  
of sphingosine-1-phosphate in complex biological materials.  
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 363, 358-363

SABA, J. D. u. T. HLA (2004):  
Point-counterpoint of sphingosine 1-phosphate metabolism.  
Circ. Res. 94, 724-734

SANCHEZ, T. u. T. HLA (2004):  
Structural and functional characteristics of S1P receptors.  
J. Cell. Biochem. 92, 913-922

SANNA, M. G., J. LIAO, E. JO, C. ALFONSO, M. Y. AHN, M. S. PETERSON, B. WEBB, S. LEFEBVRE, J. CHUN, N. GRAY u. H. ROSEN (2004):  
Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor subtypes S1P1 and S1P3, respectively, regulate lymphocyte recirculation and heart rate.  
J. Biol. Chem. 279, 13839-13848

SANNA, M. G., S. K. WANG, P. J. GONZALEZ-CABRERA, A. DON, D. MARSOLAIS, M. P. MATHEU, S. H. WEI, I. PARKER, E. JO, W. C. CHENG, M. D. CAHALAN, C. H. WONG u. H. ROSEN (2006):  
Enhancement of capillary leakage and restoration of lymphocyte egress by a chiral S1P1 antagonist in vivo.  
Nature Chem. Biol. 2, 434-441

SCHEERENS, H., T. L. BUCKLEY, T. L. MUIS, J. GARSSSEN, J. DORMANS, F. P. NIJKAMP u. H. VAN LOVEREN (1999):  
Long-term topical exposure to toluene diisocyanate in mice leads to antibody production and in vivo airway hyperresponsiveness three hours after intranasal challenge.  
Am. J. Respir. Crit. Care Med. 159, 1074-1080

SCHMID-GRENDELMEIER, P., D. SIMON, H. U. SIMON, C. A. AKDIS u. B. WUTHRICH (2001):  
Epidemiology, clinical features, and immunology of the "intrinsic" (non-IgE-mediated) type of atopic dermatitis (constitutional dermatitis).  
Allergy 56, 841-849

SCHÜPPEL, M., U. KURSCHNER, U. KLEUSER, M. SCHAFER-KORTING u. B. KLEUSER (2008):  
Sphingosine 1-phosphate restrains insulin-mediated keratinocyte proliferation via inhibition of Akt through the S1P2 receptor subtype.  
J. Invest. Dermatol. 128, 1747-1756

SEO, E. Y., G. T. PARK, K. M. LEE, J. A. KIM, J. H. LEE u. J. M. YANG (2006):  
Identification of the target genes of atopic dermatitis by real-time PCR.  
J. Invest. Dermatol. 126, 1187-1189

SHORNICK, L. P., P. DE TOGNI, S. MARIATHASAN, J. GOELLNER, J. STRAUSS-  
SCHOENBERGER, R. W. KARR, T. A. FERGUSON u. D. D. CHAPLIN (1996):  
Mice deficient in IL-1beta manifest impaired contact hypersensitivity to  
trinitrochlorobenzene.  
J. Exp. Med. 183, 1427-1436

SHORTMAN, K. (2000):  
Burnet oration: dendritic cells: multiple subtypes, multiple origins, multiple functions.  
Immunol. Cell. Biol. 78, 161-165

SIEHLER, S. u. D. R. MANNING (2002):  
Pathways of transduction engaged by sphingosine 1-phosphate through G protein-  
coupled receptors.  
Biochim. Biophys. Acta 1582, 94-99

SMOLLE, J. (1998):  
Grundlagen der Dermatologie.  
in: HENZ, B. M., K. KERL, W. ROSENBAACH u. W. STERRY (Hrsg.): Dermatologie  
und Venerologie.  
2. Aufl., Walter de Gruyter, Berlin, New York

SPIEGEL, S. u. A. H. MERRILL, JR. (1996):  
Sphingolipid metabolism and cell growth regulation.  
FASEB J. 10, 1388-1397

SPIEGEL, S. u. S. MILSTIEN (2002):

Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule.

J. Biol. Chem. 277, 25851-25854

SPIEGEL, S. u. S. MILSTIEN (2003):

Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid.

Nature Rev. 4, 397-407

STEINBRINK, K., M. WOLFL, H. JONULEIT, J. KNOP u. A. H. ENK (1997):

Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells.

J. Immunol. 159, 4772-4780

STEINMAN, R.M. u. Z.A. COHN (1973):

Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice.

Morphology, quantitation, tissue distribution.

J. Exp. Med. 137, 1142-1162

STEINMAN, R. M., S. TURLEY, I. MELLMAN u. K. INABA (2000):

The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells.

J. Exp. Med. 191, 411-416

STOITZNER, P., S. HOLZMANN, A. D. MCLELLAN, L. IVARSSON, H. STOSSEL,  
M. KAPP, U. KAMMERER, P. DOUILLARD, E. KAMPGEN, F. KOCH, S. SAELAND  
u. N. ROMANI (2003):

Visualization and characterization of migratory Langerhans cells in murine skin and lymph nodes by antibodies against Langerin/CD207.

J. Invest. Dermatol. 120, 266-274

STOITZNER, P., M. ZANELLA, U. ORTNER, M. LUKAS, A. TAGWERKER, K. JANKE, M. B. LUTZ, G. SCHULER, B. ECHTENACHER, B. RYFFEL, F. KOCH u. N. ROMANI (1999):

Migration of langerhans cells and dermal dendritic cells in skin organ cultures: augmentation by TNF-alpha and IL-1beta.

J. Leukoc. Biol. 66, 462-470

STRUNK, D., C. EGGER, G. LEITNER, D. HANAU u. G. STINGL (1997):

A skin homing molecule defines the langerhans cell progenitor in human peripheral blood.

J. Exp. Med. 185, 1131-1136

TAYLOR, R. S., O. BAADSGAARD, C. HAMMERBERG u. K. D. COOPER (1991):

Hyperstimulatory CD1a+CD1b+CD36+ Langerhans cells are responsible for increased autologous T lymphocyte reactivity to lesional epidermal cells of patients with atopic dermatitis.

J. Immunol. 147, 3794-3802

TOMINAGA, M. S. KOHNO, K. TANAKA u. K. OHATA (1985):

Studies on toluene diisocyanate (TDI)-induced delayed type hypersensitivity.

Jpn. J. Pharmacol. 39, 163-171

VAN BROCKLYN, J. R., M. H. GRÄLER, G. BERNHARDT, J. P. HOBSON, M. LIPP u. S. SPIEGEL (2000):

Sphingosine-1-phosphate is a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-6.

Blood 95, 2624-2629



VAN BROCKLYN, J. R., Z. TU, L. C. EDSALL, R. R. SCHMIDT u. S. SPIEGEL (1999):

Sphingosine 1-phosphate-induced cell rounding and neurite retraction are mediated by the G protein-coupled receptor H218.

J. Biol. Chem. 274, 4626-4632

VOGLER, R., B. SAUER, D. S. KIM, M. SCHAFFER-KORTING u. B. KLEUSER (2003):

Sphingosine-1-phosphate and its potentially paradoxical effects on critical parameters of cutaneous wound healing.

J. Invest. Dermatol. 120, 693-700

VON WENCKSTERN, H., K. ZIMMERMANN u. B. KLEUSER (2006):

The role of the lysophospholipid sphingosine 1-phosphate in immune cell biology.

Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz) 54, 239-251

WALLET, M. A., P. SEN u. R. TISCH (2005):

Immunoregulation of dendritic cells.

Clin. Med. Res. 3, 166-175

WANG, B., H. FUJISAWA, L. ZHUANG, S. KONDO, G. M. SHIVJI, C. S. KIM, T. W. MAK u. D. N. SAUDER (1997):

Depressed Langerhans cell migration and reduced contact hypersensitivity response in mice lacking TNF receptor p75.

J. Immunol. 159, 6148-6155

WANG, W., M. H. GRAELER u. E. J. GOETZL (2005):

Type 4 sphingosine 1-phosphate G protein-coupled receptor (S1P4) transduces S1P effects on T cell proliferation and cytokine secretion without signaling migration.

FASEB J. 19, 1731-1733

WERFEL, T., A. MORITA, M. GREWE, H. RENZ, U. WAHN, J. KRUTMANN u. A. KAPP (1996):

Allergen specificity of skin-infiltrating T cells is not restricted to a type-2 cytokine pattern in chronic skin lesions of atopic dermatitis.

J. Invest. Dermatol. 107, 871-876

WINDH, R. T., M. J. LEE, T. HLA, S. AN, A. J. BARR u. D. R. MANNING (1999):

Differential coupling of the sphingosine 1-phosphate receptors Edg-1, Edg-3, and H218/Edg-5 to the G(i), G(q), and G(12) families of heterotrimeric G proteins.

J. Biol. Chem. 274, 27351-27358

WOLLENBERG, A., S. KRAFT, D. HANAU u. T. BIEBER (1996):

Immunomorphological and ultrastructural characterization of Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema.

J. Invest. Dermatol. 106, 446-453

WOOD, L. C., S. M. JACKSON, P. M. ELIAS, C. GRUNFELD u. K. R. FEINGOLD (1992):

Cutaneous barrier perturbation stimulates cytokine production in the epidermis of mice.

J. Clin. Invest. 90, 482-487

YAMAGUCHI, F., M. TOKUDA, O. HATASE u. S. BRENNER (1996):

Molecular cloning of the novel human G protein-coupled receptor (GPCR) gene mapped on chromosome 9.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 227, 608-614

YAMAZAKI, Y., J. KON, K. SATO, H. TOMURA, M. SATO, T. YONEYA, H. OKAZAKI, F. OKAJIMA u. H. OHTA (2000):  
Edg-6 as a putative sphingosine 1-phosphate receptor coupling to Ca(2+) signaling pathway.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 268, 583-589

YANAGAWA, Y., K. SUGAHARA, H. KATAOKA, T. KAWAGUCHI, Y. MASUBUCHI u. K. CHIBA (1998):  
FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats. II. FTY720 prolongs skin allograft survival by decreasing T cell infiltration into grafts but not cytokine production in vivo.  
J. Immunol. 160, 5493-5499

YANG, A. H., I. ISHII u. J. CHUN (2002):  
In vivo roles of lysophospholipid receptors revealed by gene targeting studies in mice.  
Biochim. Biophys. Acta 1582, 197-203

YANG, L., Y. YATOMI, Y. MIURA, K. SATOH u. Y. OZAKI (1999):  
Metabolism and functional effects of sphingolipids in blood cells.  
Br. J. Haematol. 107, 282-293

YASUDA, K., G. NOZAWA, T. GOTO, N. SASAKI u. S. ISHIZU (1980):  
Experimental studies on TDI dermatitis in mice.  
J. Toxicol. sciences 5, 11-21

YATOMI, Y., Y. IGARASHI, L. YANG, N. HISANO, R. QI, N. ASAZUMA, K. SATOH, Y. OZAKI u. S. KUME (1997):

Sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum.

J. Biochem. 121, 969-973

YATOMI, Y., F. RUAN, S. HAKOMORI u. Y. IGARASHI (1995):

Sphingosine-1-phosphate: a platelet-activating sphingolipid released from agonist-stimulated human platelets.

Blood 86, 193-202

ZHANG, G., J. J. CONTOS, J. A. WEINER, N. FUKUSHIMA u. J. CHUN (1999):

Comparative analysis of three murine G-protein coupled receptors activated by sphingosine-1-phosphate.

Gene 227, 89-99

ZHANG, H., N. N. DESAI, A. OLIVERA, T. SEKI, G. BROOKER u. S. SPIEGEL (1991):

Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation.

J. Cell Biol. 114, 155-167

ZONDAG, G. C., F. R. POSTMA, I. V. ETTEN, I. VERLAAN u. W. H. MOOLENAAR (1998):

Sphingosine 1-phosphate signalling through the G-protein-coupled receptor Edg-1.

Biochem. J. 330 ( Pt 2), 605-609

## 9 Anhang

Alle Versuche wurden in mindestens zwei unabhängigen Durchgängen mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt. In den Anhangstabellen sind die Einzelwerte von den jeweils im Ergebnisteil dargestellten *In-vivo*- und *In-vitro*-Versuchen aufgezeigt.

### 9.1 Anhangstabellen

**Tabelle 9-1: Ohrdicken vor der ersten und nach der letzten TDI-Sensibilisierung [ $\mu\text{m}$ ]**

Einzelwerte der Ohrdicken gemessen an jeweils 6 Ohren pro Gruppe. Die erste Messung wurde vor der ersten TDI-Gabe und die zweite Messung 24 Stunden nach der letzten TDI-Applikation durchgeführt. 1.= erste Messung, 2.= zweite Messung; n=6.

Ohrdicke [ $\mu\text{m}$ ]	Vehikel		S1P	
	1.	2.	1.	2.
	230	240	240	260
	250	250	240	240
	240	240	230	240
	240	250	260	240
	250	250	250	270
	250	250	240	250

**Tabelle 9-2: Blutplasmakonzentration von S1P nach topischer Applikation [ $\text{pmol/ml}$ ]**

Einzelwerte der Blutplasmakonzentration von S1P und Vehikel. Die Werte wurden 24 Stunden nach der letzten Behandlung mit S1P bzw. Vehikel von sechs Tieren je Gruppe bestimmt; n=6.

	Vehikel	S1P
Blutplasmakonzentration	68	167
S1P	60	118
[ $\text{pmol/ml}$ ]	70	102
	74	80
	77	88
	74	62

**Tabelle 9-3: Weiße Blutkörperchen und Lymphozyten [1000/ $\mu$ l] im Blut topisch mit S1P, FTY720 und SEW2871 behandelte Tiere**

Einzelwerte der weißen Blutkörperchen bzw. Lymphozyten. Die Werte wurden in zwei Versuchen 24 Stunden nach der dritten Sensibilisierung mit TDI bestimmt. Da einige Blutproben koaguliert waren wurden die FTY-Ergebnisse aus beiden Versuchen gepoolt; n=3-6.

	Vehikel	SEW2871	S1P	FTY720
WBC	4,18	5,63	3,61	0,99
	12,49	6,15	5,69	1,94
	9,15	5,03	3,99	1,99
	10,56		3,69	1,97
				1,74
				1,53
Lymphozyten	2,97	3,53	2,74	0,62
	9,98	4,16	3,15	0,88
	6,01	3,26	2,67	1,11
	7,79		2,97	0,59
				0,79
				0,24

**Tabelle 9-4: Lymphknotengewicht [mg] und Zellzahl [Mio] in der Sensibilisierung**

Einzelwerte der Lymphknotengewichte und Zellzahlen. Die regionalen Lymphknoten der behandelten Ohrseiten wurden 24 Stunden nach der letzten TDI-Gabe freipräpariert, gewogen sowie homogenisiert um die Zellzahl mittels Trypanblau-Färbung zu bestimmen; n=5-6.

	Kontrolle	Vehikel	S1P
Gewicht [mg]	1,7	4,1	2,1
	1,8	3,2	1,5
	1,8	4,3	1,8
	1,8	1,8	2,5
	1,8	1,7	1,9
	1,0	4,5	
Zellzahl [Mio]	1,9	5,3	1,0
	1,6	3,9	1,6
	1,7	7,4	1,5
	1,8	2,8	3,6
	1,5	2,9	1,8
	2,7	6,8	

**Tabelle 9-5: Lymphknotengewicht [mg] und Zellzahl [Mio] in der Sensibilisierung**

Einzelwerte der Lymphknotengewichte und der Zellzahlen 24 Stunden nach der letzten TDI-Gabe; n=4.

	Kontrolle	Vehikel	FTY720	SEW2871
Gewicht [mg]	1,8	7,0	3,8	9,1
	2,0	8,3	4,2	6,8
	3,4	8,1	4,6	10,0
	2,2	7,7	4,4	7,7
Zellzahl [Mio]	1,6	10,4	3,6	10,7
	2,4	13,6	3,7	8,2
	4,6	14,8	4,8	13,2
	2,5	13,1	4,2	10,7

**Tabelle 9-6: CD 11c<sup>+</sup>- und CD 40<sup>+</sup>-Zellen in den Lnn. auriculares in der Sensibilisierung**

Einzelwerte der CD 11c<sup>+</sup>- und CD 40<sup>+</sup>-Zellen in der Sensibilisierung. Die Analyse wurde mittels FACS durchgeführt; n=4-6.

	Kontrolle	Vehikel	S1P
CD 11c <sup>+</sup> / CD 40 <sup>+</sup>	34200	116600	14000
	28800	50700	16000
	22100	88800	28500
	21600	61600	57600
		34800	37800
		81600	

**Tabelle 9-7: CD 11c<sup>+</sup>- und CD 40<sup>+</sup>-Zellen in den Lnn. auriculares in der Sensibilisierung**

Einzelwerte der CD 11c<sup>+</sup>- und CD 40<sup>+</sup>-Zellen in den regionalen Lymphknoten nach Sensibilisierung; n=3-6.

	Kontrolle	Vehikel	SEW2871	FTY720
CD 11c <sup>+</sup> / CD 40 <sup>+</sup>	19200	124800	139100	82800
	33600	204000	155800	96200
	32200	340400	158400	96000
	32500	248900		67200
		365700		
		219300		

**Tabelle 9-8: IL-6-Sekretion der Lymphknotenzellen SEW2871-behandelter Tiere nach ConA-Stimulation (Sensibilisierung)**

Einzelwerte der IL-6-Konzentrationen der Lymphknotenzellen nach Behandlung der Tiere mit SEW2871 und anschließender Stimulierung mit ConA; n=6.

	Kontrolle	Vehikel	SEW2871
IL-6 [pg/ml]	64,2	475,8	373,3
	< 4	578,3	1134,2
	38,3	477,5	304,2
	< 4	340,8	288,3
	5,8	725	768,3
	< 4	1058,3	677,5



**Tabelle 9-9: IL-6-Sekretion der Lymphknotenzellen S1P-behandelter Tiere nach ConA-Stimulation (Sensibilisierung)**

Einzelwerte der IL-6-Konzentrationen der Lymphknotenzellen nach Behandlung der Tiere mit S1P und anschließender Stimulierung mit ConA; n=6.

	Kontrolle	Vehikel	S1P
IL-6 [pg/ml]	< 4	388,3	102,9
	< 4	102,3	6,3
	< 4	172,9	38,9
	< 4	198,3	78,3
	< 4	144,3	44,9
	< 4	89,6	< 4

**Tabelle 9-10: IL-6-Sekretion der Lymphknotenzellen FTY720-behandelter Tiere nach ConA-Stimulation (Sensibilisierung)**

Einzelwerte der IL-6-Konzentrationen der Lymphknotenzellen nach Behandlung der Tiere mit FTY720 und anschließender Stimulierung mit ConA; n=4-6.

	Kontrolle	Vehikel	FTY720
IL-6 [pg/ml]	9,5	320,3	51,2
	3,7	222	47,8
	1,2	187	56,2
	2,8	427	53,7
		377,8	
		432	

**Tabelle 9-11: IFN- $\gamma$ -Sekretion der Lymphknotenzellen S1P-behandelter Tiere nach ConA-Stimulation**

Einzelwerte der IFN- $\gamma$ -Konzentrationen der Lymphknotenzellen nach Behandlung der Tiere mit S1P und anschließender Stimulierung mit ConA; n=4-6.

	Kontrolle	Vehikel	S1P
IFN- $\gamma$ . [pg/ml]	197	1135	219
	176	637	240
	173	1920	100
	180	542	516
		268	178
		1186	172

**Tabelle 9-12: IFN- $\gamma$ -Sekretion der Lymphknotenzellen FTY720-behandelter Tiere nach ConA-Stimulation**

Einzelwerte der IFN- $\gamma$ -Konzentrationen der Lymphknotenzellen nach Behandlung der Tiere mit FTY720 und anschließender Stimulierung mit ConA; n=4-6.

	Kontrolle	Vehikel	FTY720
IFN- $\gamma$ . [pg/ml]	61	2181	590
	39	2158	760
	69	901	1129
	79	2956	898
		2698	
		2731	

**Tabelle 9-13: Ausgewanderte DC aus der Haut/mg Ohrgewicht in der Sensibilisierung**

Am dritten Tag der Gewebekultur wurde die Anzahl der aus den Ohren in das Medium migrierten Zellen ermittelt und mit den Ohrgeichten ins Verhältnis gesetzt; n=4-6.

	Kontrolle	Vehikel	S1P	FTY720
Ausgewanderte Zellen / mg Ohrgewicht	283	667	716	286
	636	918	116	67
	443	776	664	86
	453	1815	333	177
		819		
		988		

**Tabelle 9-14: Einfluss von SEW2871 auf die TDI-induzierte Ohrschwellung [ $\mu\text{m}$ ] in der Challengephase**

Einzelwerte der Ohrdicken gemessen an jeweils 6 Ohren pro Gruppe. Die erste Messung wurde vor, die zweite Messung 24 Stunden nach der letzten TDI-Applikation durchgeführt. 1.= erste Messung, 2.= zweite Messung; n=6.

Ohrdicke [ $\mu\text{m}$ ]	Vehikel		SEW2871	
	1.	2.	1.	2.
260	290	290	290	320
270	340	270	270	310
290	290	260	260	290
250	310	260	260	300
250	270	260	260	310
270	310	260	260	290

**Tabelle 9-15: Einfluss von S1P auf die TDI-induzierte Ohrschwellung [ $\mu\text{m}$ ] in der Challengephase**

Einzelwerte der Ohrdicken gemessen an jeweils 6 Ohren pro Gruppe. Die erste Messung wurde vor, die zweite Messung 24 Stunden nach der letzten TDI-Applikation durchgeführt. 1.= erste Messung, 2.= zweite Messung; n=6.

Ohrdicke [ $\mu\text{m}$ ]	Vehikel		S1P	
	1.	2.	1.	2.
250	510	260	310	
250	560	270	310	
260	420	260	310	
260	420	260	380	
260	380	270	380	
250	510	250	300	

**Tabelle 9-16: Einfluss von FTY720 auf die TDI-induzierte Ohrschwellung [µm] in der Challengephase**

Einzelwerte der Ohrdicken gemessen an jeweils 4 Ohren pro Gruppe. Die erste Messung wurde vor, die zweite Messung 24 Stunden nach der letzten TDI-Applikation durchgeführt. 1.= erste Messung, 2.= zweite Messung; n=4.

Ohrdicke [µm]	Vehikel		FTY720	
	1.	2.	1.	2.
260	450		270	310
270	360		270	300
260	470		270	310
270	390		280	320

**Tabelle 9-17: Lymphknotengewicht [mg] und Zellzahl [Mio] in der Challengephase**

Einzelwerte der Lymphknotengewichte und Zellzahlen. Die regionalen Lymphknoten der behandelten Ohrseiten wurden 24 Stunden nach der Challenge freipräpariert, gewogen sowie homogenisiert um die Zellzahl mittels Trypanblau-Färbung zu bestimmen; n=5-6.

	Kontrolle	Vehikel	S1P
Gewicht [mg]	2,8	4,0	3,9
	2,7	4,2	3,1
	2,1	4,7	2,6
	1,7	4,5	3,4
	2,9	4,6	6,1
	2,0	3,6	5,2
Zellzahl [Mio]	2,1	5,4	4,9
	3,5	8,3	6,2
	1,9	3,2	2,8
	3,2	3,5	6,6
	2,4	6,2	9,6
		4,3	5,7

**Tabelle 9-18: Lymphknotengewicht [mg] und Zellzahl [Mio] in der Challengephase**

Einzelwerte der Lymphknotengewichte und der Zellzahlen 24 Stunden nach der Challenge; n=6.

	Kontrolle	Vehikel	FTY720
Gewicht [mg]	2,2	3,1	2,9
	2,3	3,4	3,8
	2,3	3,4	4,2
	2,5	2,8	5,1
	2,1	3,4	3,0
	2,9	3,8	1,9
Zellzahl [Mio]	1,4	3,5	3,4
	1,8	3,0	3,9
	2,4	3,7	4,9
	1,8	4,0	5,9
	1,4	4,6	2,6
	1,6	5,1	1,4

**Tabelle 9-19: IL-6-Sekretion der Lymphknotenzellen S1P-behandelter Tiere nach ConA-Stimulation (Challenge)**

Einzelwerte der IL-6-Konzentrationen der Lymphknotenzellen nach Behandlung der Tiere mit S1P und anschließender Stimulierung mit ConA; n=6.

	Vehikel	S1P
IL-6 [pg/ml]	5,0	21,7
	97,5	32,5
	24,2	71,7
	25,0	30,8
	19,2	3,3
	20,8	37,5

**Tabelle 9-20: IL-6-Sekretion der Lymphknotenzellen S1P-behandelter Tiere nach ConA-Stimulation (Challenge)**

Einzelwerte der IL-6-Konzentrationen der Lymphknotenzellen nach Behandlung der Tiere mit S1P und anschließender Stimulierung mit ConA; n=6.

	Vehikel	S1P
IL-6 [pg/ml]	164,0	76,5
	79,5	43,5
	82,0	133,5
	78,0	80,5
	79,0	72,0
	128,5	75,5

**Tabelle 9-21: Ausgewanderte DC aus der Haut pro mg Ohrgewicht in der Challengephase**

Am dritten Tag der Gewebekultur wurde die Anzahl der aus den Ohren in das Medium migrierten Zellen ermittelt und mit den Ohrgewichten ins Verhältnis gesetzt; n=6-8.

	Vehikel	S1P	FTY720
Ausgewanderte Zellen / mg Ohrgewicht	418	70	121
	875	612	148
	842	259	320
	216	363	355
	380	469	143
	505	335	170
	291		
	543		

**Tabelle 9-22: Histologische Auswertung des inflammatorischen Zellinflux und Ödembildung in der Challenge**

Einzelwerte der histologischen Schnitte. Die behandelten Ohren wurden nach HE gefärbt und in einem semiquantitativen Verfahren hinsichtlich Zellinflux und Ödematisierung ausgewertet (0 = kein inflammatorischer Zellinflux / kein Ödem bis 3 = hochgradiger inflammatorischer Zellinflux / hochgradiges Ödem); n=5-6.

	Vehikel	S1P	FTY720
Zellinflux	2	2	2
	1,5	2	1,5
	2	3	2
	3	2	1,5
	2	1,5	2
	3		3
Ödem	2	1,5	2
	2	2	1,5
	2	2	2
	1,5	2	2
	3	2	2
	2		2

**Tabelle 9-23: IL-1 $\beta$  -Sekretion in der Haut 24 Stunden nach der Challenge**

Einzelwerte der IL-1 $\beta$  -Konzentrationen nach Proteinextraktion in der Haut S1P- bzw. Vehikel-behandelter Tiere; n=6.

	Kontrolle	Vehikel	S1P
IL-1 $\beta$ [pg/ml]	37	335	135
	32	232	137
	30	280	365
	37	445	237
	65	265	332
	35	365	200

**Tabelle 9-24: Migration *in vitro* generierter DC**

Anzahl ausgewanderter DC/ml nach 90 Minuten und Inkubation der Zellen mit S1P, W146 bzw. VPC23019; n=4.

	Kontrolle	S1P	S1P+W146	S1P+VPC23019
Migrierte DC/ml	4500	7500	5000	3500
	4000	7000	6000	4500
	3000	9000	4500	4500
	3500	8500	5500	4000

**Tabelle 9-25 : KC-Sekretion [pg/ml]**

KC-Sekretion [pg/ml] muriner Keratinozyten nach Behandlung der Zellen mit S1P über einen Zeitraum von vier Tagen und Stimulation der Zellen mit LPS bzw. PGN; n=6.

**4 Tage**

Kontrolle	0	27	38	57	45	47
LPS	942	904	694	656	934	869
S1P 1 µmol + LPS	525	521	629	697	337	429
S1P 5 µmol + LPS	527	495	601	586	567	571
S1P 10 µmol + LPS	519	539	426	450	524	529
PGN	523	547	651	749	551	706
S1P 0,1 µmol+PGN	934	824	674	607	669	765
S1P 1 µmol + PGN	526	512	496	598	295	238
S1P 5 µmol + PGN	392	456	507	539	580	382
S1P 10 µmol+ PGN	280	506	414	514	444	687



**Tabelle 9-26: IL-8-Sekretion [pg/ml]**

Einzelwerte der IL-8-Sekretion [pg/ml] caniner Keratinozyten nach Behandlung der Zellen mit S1P über einen Zeitraum von 4 Tagen und Stimulation mit LPS bzw. PGN; n=4.

**Versuch 1**

Kontrolle	1001	1219	754	1029
LPS	2179	2486	3104	2201
S1P 1 µmol + LPS	1234	1541	1231	1526
S1P 5 µmol + LPS	2189	2486	2006	1766
S1P 10 µmol + LPS	1716	1348	1396	2061
PGN	1151	1334	1514	1506
S1P 0,1 µmol + PGN	4844	4201	4564	4254
S1P 1 µmol + PGN	1509	1429	981	1809
S1P 5 µmol + PGN	1481	1469	1284	1689
S1P 10 µmol + PGN	1564	2199	2659	1449

**Tabelle 9-27: IL-8-Sekretion [pg/ml]**

Einzelwerte der IL-8-Sekretion [pg/ml] caniner Keratinozyten nach Behandlung der Zellen mit FTY720 über vier Tage und Stimulation mit LPS bzw. PGN; n=4.

**Versuch 1**

Kontrolle	861	784	1076	1311
LPS	1489	1374	1576	1489
FTY 0,1 µmol + LPS	1314	1166	1031	1134
FTY 0,5 µmol + LPS	1439	1344	1594	1489
FTY 1 µmol + LPS	1569	1256	1211	1321
PGN	989	1026	1351	1159
FTY 0,01 µmol + PGN	3381	2834	3194	3056
FTY 0,1 µmol + PGN	1031	1059	741	1231
FTY 0,5 µmol + PGN	971	1036	989	1356
FTY 1 µmol + PGN	1311	1321	1054	1579

**Tabelle 9-28: IL-8-Sekretion [pg/ml]**

Einzelwerte der IL-8-Sekretion [pg/ml] atopischer caniner Keratinozyten nach 4tägiger Behandlung der Zellen mit S1P und Stimulation mit LPS bzw. PGN; n=4.

**Versuch 1**

Kontrolle	189	228	162	164
LPS	864	843	739	820
S1P 1 µmol + LPS	777	680	732	787
S1P 5 µmol + LPS	406	572	513	412
S1P 10 µmol + LPS	478	460	640	681
PGN	729	621	678	660
S1P 0,1 µmol + PGN	788	894	640	1010
S1P 1 µmol + PGN	756	629	533	756
S1P 5 µmol + PGN	599	339	391	354
S1P 10 µmol + PGN	391	412	510	503

**Tabelle 9-29: IL-8-Sekretion [pg/ml]**

Einzelwerte der IL-8-Sekretion [pg/ml] atopischer caniner Keratinozyten nach Behandlung der Zellen mit FTY720 über vier Tage und Stimulation mit LPS bzw. PGN; n=4.

**Versuch 1**

Kontrolle	951	1057	1043	1149
LPS	3201	3257	3263	3449
FTY 0,1 µmol + LPS	1599	2061	2317	2753
FTY 0,5 µmol + LPS	2443	2807	2413	2767
FTY 1 µmol + LPS	1415	1653	1695	2237
PGN	3273	3437	2965	2365
FTY 0,01 µmol + PGN	1939	2041	1831	1865
FTY 0,1 µmol + PGN	1517	2367	2405	2715
FTY 0,5 µmol + PGN	2561	2435	2685	2623
FTY 1 µmol + PGN	713	1235	787	1649

## 9.2 Veröffentlichungen

Ein Teil der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen und Ergebnisse liegt bereits in veröffentlichter Form vor:

### 9.2.1 Tagungsposter

49. Frühjahrstagung der DGPT in Mainz (2008)

I. Reines, B. Kleuser, M. Kietzmann, W. Bäumer

**Sphingosine-1-phosphate impairs dendritic cell migration through skin and attenuates allergic contact dermatitis reaction in mice.**

N-S Arch. Pharmacol. 377 (Suppl. 1), 205 (Abstract)

### 9.2.2 Zeitschriftenartikel

I. Reines, M. Kietzmann, R. Mischke, T. Tschernig, A. Lüth, B. Kleuser and W. Bäumer (2009)

**Topical application of sphingosine-1-phosphate and FTY720 attenuate allergic contact dermatitis reaction through inhibition of dendritic cell migration.**

J. Invest. Dermatol., in press

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Bäumer für die Überlassung des interessanten Themas und die hervorragende Betreuung. Seine humorvolle Art, die tatkräftige Unterstützung und immerwährende Geduld hat die Arbeit im Labor um ein vielfaches erleichtert.

Ganz herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. Manfred Kietzmann für seine Unterstützung und die nette Zusammenarbeit.

Viktoria Garder sowie Caroline Schulz danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei zahlreichen Versuchen.

Den weiteren Mitarbeitern des Institutes Isabell Schiedewitz, Vanessa Dewor, Hans-Herbert Bohr, Frank Niedorf und Jessica Stahl danke ich für ihre Hilfe und die schöne Zeit im Labor sowie im Aufenthaltsraum.

Meinen Mitdoktoranden Kristine, Nadine, Klaas, Helen, Jan und Stefan danke ich für eine abwechslungsreiche und lustige Zeit im Institut.

Prof. Dr. Burkhard Kleuser danke ich für die Bereitstellung des S1P sowie für die Auswertung der Blutproben und für die zahlreichen Tipps.

Für die Hilfe bei der Beschaffung der Hautproben sowie für die Auswertung der Blutproben bedanke ich mich bei Prof. Dr. Reinhard Mischke.

Prof. Dr. Thomas Tschernig danke ich für die immunhistochemische und histologische Aufbereitung der Ohrhomogenate.

Der Wilhelm Schaumann-Stiftung danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Außerdem geht ein großer Dank an all meine Freunde für ihre Unterstützung, ihr Verständnis sowie ihre unaufhörliche Geduld seit meinem Studienbeginn.

Meiner Familie - insbesondere meinen lieben Geschwistern Nicole und Michael - danke ich, dass sie mir in all der Zeit stets Rückhalt und Unterstützung gegeben haben.

Zu guter Letzt ein großes Dankeschön an Martin, der mich immer unterstützt und an mich geglaubt hat.