

Aus der Medizinischen Klinik
mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Experimentelle Untersuchungen zur Rolle des
Sphingosinkinase/ Sphingosin-1-Phosphat-Systems
bei pulmonaler Inflammation**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christoph Tabeling

aus Bremen

Gutachter:

1. Priv.-Doz. Dr. med. M. Witzernath
2. Prof. Dr. med. A. Olschewski
3. Prof. Dr. med. C. Taube

Datum der Promotion:

30.11.2012

Inhaltsverzeichnis

1. Abstract	4
2. Einleitung	5
3. Zielstellung	5
4. Methodik	6
5. Ergebnisse	8
6. Diskussion	11
7. Ausblick	13
8. Literaturverzeichnis	14
Anteilerklärung	20
Lebenslauf	21
Publikationsliste	22
Selbstständigkeitserklärung	26
Danksagung	27

1. Abstract

Hintergrund: Sphingosin-1-Phosphat (S1P) fungiert in zahlreichen Signalwegen als zentraler bioaktiver Mediator, sowohl intrazellulär als Second Messenger als auch extrazellulär über eine Familie G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, S1P₁-S1P₅. Die Synthese von S1P wird in der Lunge primär durch die Sphingosinkinase-1 (SphK1) katalysiert. Das SphK/S1P-System spielt eine zentrale Rolle in der Regulation des pulmonalen Gefäß- und Atemwegstonus sowie in der Modulation proinflammatorischer Prozesse wie Migration und Aktivierung verschiedener Leukozyten-Subpopulationen.

Immunologische Prozesse scheinen in der Pathogenese der pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH) eine zentrale Rolle zu spielen. Bei Mäusen führt die pulmonale T_H2-Inflammation zu morphologischen und funktionellen Veränderungen, die typisch für die PAH sind, einschließlich perivaskulärer Leukozyteninfiltration, pulmonalarteriellem Remodeling und pulmonalvaskulärer Hyperreagibilität (PVH) auf vasokonstriktorische Stimuli.

In dieser Arbeit wurde die Rolle des SphK/S1P-Systems in der akuten und chronischen pulmonalen T_H2-Inflammation mit Hilfe SphK1- (SphK1^{-/-}) und S1P₄-defizienter Mäuse (S1P4^{-/-}) untersucht. Zudem erfolgte erstmals eine detaillierte Charakterisierung des humanen SphK/S1P-Expressionsprofils der Lunge, inklusive vergleichender Analysen zwischen Patienten mit und ohne chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD).

Methoden: SphK1^{-/-}- und Wildtyp-Mäuse (WT) wurden gegenüber Ovalbumin (OVA) sensibilisiert und nach akutem oder chronischem Regime atemwegsexponiert. Neben vergleichenden Analysen funktioneller pulmonaler Parameter in isoliert perfundierten und ventilierten Mauslungen (IPML) erfolgten Untersuchungen der bronchoalveolären Lavage (BAL) sowie differenzierte histologische Analysen des pulmonalarteriellen Remodelings.

S1P4^{-/-}- und WT-Mäuse wurden unter akuter pulmonaler T_H2-Inflammation sowie in T_H1- und T_H2-assoziierten Hypersensitivitäts-Modellen untersucht. Neben funktionellen Untersuchungen (IPML) erfolgten Zytokinanalysen und diverse In-vitro-Studien.

Unter Einsatz humanen Lungengewebes wurden die mRNA-Expressionsprofile beider SphK-Isoformen, der S1P-Rezeptor-Familie sowie der S1P-degradierenden Enzyme von 25 COPD- und 24 Nicht-COPD-Patienten vergleichend analysiert.

Ergebnisse: Die SphK1-Defizienz führte im Vergleich zu den WT-Tieren zu einer verringerten akuten pulmonalen T_H2-Inflammation und reduzierter Atemwegshyperreagibilität (AHR) bei unveränderter PVH. Bei chronischer Inflammation war hingegen eine deutlich elevierte PVH in den SphK^{-/-}-Mäusen detektierbar sowie ein ausgeprägtes pulmonalarterielles Remodeling, charakterisiert durch intimale Neomuskularisation.

Die S1P4-Defizienz hatte eine Aggravierung der akuten pulmonalen T_H2-Inflammation und AHR zur Folge, bei zugleich reduzierten Interleukin (IL)-17-Spiegeln der BAL. Die PVH zeigte sich unverändert. In den Hypersensitivitäts-Modellen zeigten sich eine erhöhte T_H2- und eine verminderte T_H1-Antwort bei S1P4-Defizienz. In-vitro-Untersuchungen ergaben reduzierte IL-17-Spiegel nach CD4⁺-Zell-Aktivierung durch S1P4^{-/-} dendritische Zellen.

Die Expressionsanalysen des humanen Lungengewebes wiesen eine bei COPD-Patienten im Vergleich zu Nicht-COPD-Patienten verringerte Expression von S1P₅ nach.

Schlussfolgerung: Diese Daten zeigen erstmals eine deutliche Dissoziation T_H2-induzierter Atemwegs- und Gefäßpathologie: Während sich die SphK1-Defizienz protektiv auf Inflammation und AHR auswirkt, kommt es zu einer Aggravierung der PVH bei zugleich ausgeprägtem pulmonalvaskulärem Remodeling. Neben der vielfach postulierten Relevanz in der Entstehung von Asthma bronchiale, könnte das SphK/S1P-System eine zentrale Rolle in der Pathogenese der PAH spielen. S1P₄ scheint wesentlich an der Modulation der allergischen Atemwegsinfammation und AHR des SphK/S1P-Systems beteiligt zu sein. Die stark verringerten IL-17-Spiegel bei S1P4-Defizienz deuten auf eine Inhibition der T_H17-Zelldifferenzierung hin.

Die Ursache und Bedeutung der verringerten Expression von S1P₅ bei COPD ist gegenwärtig unklar. Aufgrund des komplexen Zusammenspiels der einzelnen Komponenten des SphK/S1P-Systems sind weitere Untersuchungen erforderlich, um gezielte pharmakologische Interventionen des SphK/S1P-Systems bei pulmonalen Erkrankungen wie PAH, Asthma bronchiale und COPD etablieren zu können.

2. Einleitung

Sphingosine werden intrazellulär aus Ceramiden gebildet. Mittels Phosphorylierung durch die SphK entsteht das bioaktive Sphingolipid S1P. Von den zwei existierenden Isoformen der SphK, SphK1 und SphK2, ist in der Lunge vor allem die SphK1 für die Katalyse der S1P-Synthese verantwortlich.¹⁻⁵ S1P wirkt intrazellulär als Second Messenger oder extrazellulär auto- oder parakrin durch sogenanntes Inside-Out-Signalling, wobei es an fünf verschiedene Rezeptoren, S1P₁-S1P₅, bindet.⁶ Die Expression dieser Rezeptoren weist eine hohe organ- und gewebespezifische Variabilität auf. S1P fungiert in zahlreichen proinflammatorischen Signalwegen als zentraler Mediator und moduliert zudem Proliferation, Apoptose und Gefäßhomöostase.⁷⁻¹⁶ Über die Aktivierung endothelialer S1P₁- sowie muskulärer S1P₂- und S1P₃-Rezeptoren scheint S1P sowohl über eNOS-vermittelte Vasodilatation als auch über Rho-Kinase-vermittelte Vasokonstriktion den Gefäßtonus in komplexer Weise zu regulieren.¹⁷⁻²¹ S1P₄ wird vor allem auf Lymphozyten und hämatopoetischen Zellen exprimiert und scheint an der Homöostase immunologischer Prozesse wesentlich beteiligt zu sein.^{22,23} S1P₅ ist der prädominierende S1P-Rezeptor auf NK-Zellen und beeinflusst deren Migration und Homing.²⁴ Der Abbau von S1P erfolgt intrazellulär über die S1P-degradierenden Enzyme S1P-Lyase (S1PL) und S1P-Phosphatase 1 und 2 (S1PP1, S1PP2) sowie extrazellulär über Lipidphosphat-Phosphatasen (LPPs).²⁵

Die pulmonalarterielle Hypertonie (PAH) kann idiopathisch und familiär auftreten oder durch Noxen ausgelöst werden. Weitaus häufiger manifestiert sie sich jedoch als Folge inflammatorischer Erkrankungen wie systemischer Sklerose (SSc), systemischem Lupus erythematodes, HIV oder Schistosomiasis.²⁶⁻²⁹ Pathomechanistisch kommt es im Rahmen einer endothelialen Dysfunktion und pulmonalvaskulärer Hyperreagibilität (PVH) zu vermehrter pulmonalarterieller Vasokonstriktion.³⁰⁻³² Im weiteren Verlauf führt die Proliferation von Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten zu pulmonalarteriellem Remodeling.^{33,34} Der konsekutiv progrediente Anstieg des pulmonalarteriellen Mitteldrucks (von <20 auf >25 mmHg in Ruhe) hat bei ausbleibender therapeutischer Intervention nach durchschnittlich drei Jahren ein letales Rechtsherzversagen zur Folge, bei einer mittleren 5-Jahres-Überlebensrate von 21-34%.^{35,36} Unter derzeit verfügbarer Therapie überleben nur 61 % der PAH-Patienten die ersten fünf Jahre nach Diagnosestellung.^{37,38}

In der Pathogenese der PAH scheinen proinflammatorische Mediatoren eine zentrale Rolle zu spielen.³⁹⁻⁴¹ PAH-Patienten weisen im Vergleich zu Nicht-PAH-Patienten erhöhte Plasma-Spiegel für IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1, CRP und RANTES auf.⁴²⁻⁴⁷ Zudem sind sowohl innerhalb der Gefäßveränderungen als auch perivaskulär vermehrt Leukozyten nachweisbar.^{43,48}

Weltweit sind etwa 210 Millionen Menschen an der COPD erkrankt.⁴⁹ Charakterisiert ist sie durch eine progrediente, nicht vollständig reversible Atemwegsobstruktion bei chronischer Bronchitis und/ oder Emphysem. Hauptrisikofaktor ist der Nikotinabusus. Die COPD ist gegenwärtig nicht heilbar. Als mögliche Pathomechanismen für die Entstehung emphysematischer Veränderungen werden insbesondere erhöhter oxidativer Stress, vermehrte Alveolarzellapoptose, ineffektive Efferozytose, gestörte Reparaturmechanismen sowie pulmonalarterielles Remodeling diskutiert.⁵⁰⁻⁵³ Aktuelle Untersuchungen an Mäusen zeigen eine ursächliche Rolle des pulmonalarteriellen Remodelings für die Emphysementstehung nach Rauchexposition. Somit könnten inflammatorische pulmonale Gefäßveränderungen eine zentrale Rolle in der frühen Pathogenese des Emphysems bei COPD spielen.⁵²

3. Zielstellung

In dieser Arbeit

- sollten die Effekte der SphK1-Defizienz auf die pulmonale T_H2-Inflammation und Atemwegshyperreagibilität, sowie auf PAH-assoziiertes pulmonalarterielles Remodeling und pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität analysiert werden.
- sollte die Rolle von S1P₄ in T_H1- und T_H2-Inflammation charakterisiert werden.
- sollte das mRNA-Expressionsprofil des humanen SphK/S1P-Systems der Lunge charakterisiert und zwischen COPD- und Nicht-COPD-Patienten vergleichend analysiert werden.

4. Methodik

Versuchstiere

Zum Einsatz kamen 8-12 Wochen alte weibliche Sphk1^{-/-}-Mäuse (C57Bl/6), S1P₄^{-/-}-Mäuse (BALB/c) und jeweils korrespondierende WT-Mäuse. Die Generierung der transgenen Mäuse wurde bereits an anderer Stelle beschrieben.^{54,55} Alle an den Versuchstieren durchgeführten Eingriffe erfolgten in enger Zusammenarbeit mit den Tierschutzbeauftragten der Charité nach Genehmigung durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin, bzw. durch die zuständige Behörde in Adelaide, Australien.

Induktion pulmonaler T_H2-Inflammation bei Mäusen

Für die Bearbeitung der Fragestellungen kamen neben der Untersuchung naiver Tiere zwei Modelle zur Induktion pulmonaler T_H2-Inflammation zum Einsatz. (i) Das Modell der akuten Ovalbumin (OVA)-induzierten pulmonalen T_H2-Inflammation in der C57BL/6 Maus wurde für diesen Mausstamm auf der Grundlage eines Protokolls für BALB/c Mäuse adaptiert. (ii) Das Modell der chronischen OVA-induzierten pulmonalen T_H2-Inflammation wurde für die vorliegende Arbeit etabliert.

(i) Akute OVA-induzierte pulmonale T_H2-Inflammation: Dieses Modell dient der Untersuchung akuter inflammatorischer Prozesse nach dreimaliger Atemwegsexposition gegenüber OVA in der zuvor sensibilisierten Maus (OVA/OVA) im Vergleich zu den mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS)-behandelten Kontrollen (PBS/PBS bzw. PBS/OVA). Spezifische Unterschiede in der T_H2-Immunantwort der Mauslinien C57Bl/6 und BALB/c wurden in den jeweiligen Protokollen berücksichtigt. Zu den primären Outcome-Variablen zählten Leukozyteninfiltration und Zytokinantwort sowie AHR und PVH. Zudem wurde das Ausmaß und die Lokalisation der inflammationsinduzierten Proliferation insbesondere pulmonal-arterieller glatter Muskelzellen immunhistochemisch analysiert. Der Einfluss der SphK1- bzw. S1P₄-Defizienz auf die akuten Prozesse der T_H2-Inflammation (Immunantwort, Hyperreagibilität und Proliferation) konnten somit grundlegend untersucht werden.

(ii) Chronische OVA-induzierte pulmonale T_H2-Inflammation: Basierend auf den Arbeiten von Foster et al. wurde ein achtwöchiges Protokoll weiterentwickelt und etabliert. Es sieht nach erfolgter Sensibilisierung wiederholte Atemwegsexpositionen gegenüber OVA über einen Zeitraum von 30 Tagen vor (OVA/OVA).^{56,57} Die Kontrollen wurden nach einer Schein-Sensibilisierung mit PBS ebenfalls gegenüber OVA atemwegsexponiert (PBS/OVA). Die chronischen Effekte der Sphk1-Defizienz auf folgende Outcome-Variablen wurden untersucht: Leukozyteninfiltration, Zytokinantwort, AHR und PVH. Zudem wurde das zu diesem Zeitpunkt fortgeschrittene pulmonalarterielle Remodeling stereologisch quantifiziert sowie immunhistochemisch und ultrastrukturell analysiert.⁵⁸ Weiterhin erfolgten vergleichende Analysen auf mRNA-Ebene mittels quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR).

Isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge (IPML)

Zur Erfassung funktioneller pulmonaler Parameter wurde die Lunge nach Heparinisierung und finaler Blutentnahme unter Vollnarkose und kontinuierlicher Ventilation isoliert. Nachfolgend wurde eine nicht-rezirkulierende Perfusion der Lunge über einen zuführenden Arteria pulmonalis-Katheter sowie einen abführenden Katheter im Atrium cordis sinistrum realisiert. Während des eigentlichen Experiments erfolgte die Ventilation der isoliert perfundierten Lunge per Unterdruck in einer abgeschlossenen Kammer. Über das pulmonale Gefäßsystem der isolierten Mauslunge wurden broncho- und vasokonstriktorische Stimuli, Methacholin und der Thromboxanrezeptor-Agonist U46619, für jeweils 0,5 bzw. 3 Minuten in aufsteigender Dosierung appliziert. Alle wesentlichen funktionellen Parameter (u.a. pulmonalarterieller Mitteldruck, Atemwegswiderstand, dynamische Compliance) wurden während des gesamten Experiments kontinuierlich aufgezeichnet.

Bronchoalveoläre Lavage (BAL), mRNA-Analysen, ELISA, Histologie

Die Lungen wurden über einen Trachealtubus zweifach lavagiert. Die mikroskopische Zellquantifizierung und -differenzierung erfolgte aus dem resuspendierten Zellpellet der zentrifugierten BAL. Die Zytokinanalysen erfolgten aus dem Überstand der BAL mittels Multiplex Assay Technik (Bio-Rad).

Vergleichende Expressionsanalysen zentraler Komponenten des Ceramid/SphK/S1P-Systems (neutrale Ceramidase, SphK1, SphK2, S1P₁, S1P₂, S1P₃, S1PP1, S1PP2, S1PL) sowie des Referenzgens Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) erfolgten nach RNA-Extraktion und cDNA-Synthese unter Einsatz murinen Lungengewebes mittels qPCR. Die relative Expression wurde mit der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode kalkuliert.⁵⁹

Die Bestimmung der Serum- bzw. Plasmaspiegel der Immunglobuline IgA, IgE, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ und IgM erfolgte mittels ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

Zum Zwecke der Durchlichtmikroskopie (Hämatoxylin-Eosin-Färbung), konfokalen Fluoreszenzmikroskopie (Antikörper gegen CD31, CD45.1, CD68, Ki-67 und α -smooth muscle actin) und Elektronenmikroskopie wurde das Lungengewebe entsprechend paraformaldehyd-, kryo- oder osmiumtetroxid-fixiert und aufbereitet.

T-Zell-Proliferation und Zytokinbildung

Naive CD4⁺-T-Zellen wurden aus der Milz von DO11.10-Mäusen mit transgenem OVA-Peptid-spezifischem T-Zellrezeptor isoliert, mit CFSE (Carboxyfluorescein Succinimidylster) markiert und mit OVA-beladenen WT- oder S1P₄^{-/-} dendritischen Zellen in vitro kokultiviert. Als Kontrollen dienten nicht-Antigen-beladene WT- oder S1P₄^{-/-} dendritische Zellen. Nach 48 Stunden erfolgte die Analyse der Proliferation mittels Durchflusszytometrie sowie Messungen der Zytokinpiegel (Il-2, TNF- α , INF- γ , IL-4, IL-5 und IL-17) im Überstand mittels ELISA (BD Biosciences) oder Multiplex Assay Technik (BD Biosciences).

Kontakt-Hypersensitivitäts-Reaktion

S1P₄^{-/-} und WT-Mäuse wurden gegenüber Fluoresceinisothiocyanat (FITC) sensibilisiert und 6 Tage später mittels epikutaner Injektion (aural, rechts) erneut gegenüber FITC exponiert. Als Kontrolle erfolgte die Injektion des Lösungsmittels (aural, links). Nach 24 und 48 Stunden erfolgte die Messung der Ohrdicke; nachfolgend wurden die zervikalen Lymphknoten mittels Durchflusszytometrie (CD4⁺, CD8⁺, CD44⁺, CD62L⁻) analysiert.

Typ-IV-Hypersensitivitäts-Reaktion

Die Sensibilisierung erfolgte durch beidseitige subkutane (s.c.) Injektionen von 4-Hydroxy-3-Nitrophenylacetyl-O-Succinimid (NP-O-Su) in die Flanke, gefolgt von einer s.c.-Injektion von Boratpuffer (dorsale Mittellinie). Nach 6 Tagen wurden die Tiere erneut gegenüber NP-O-Su exponiert (s.c.-Injektion, plantar, Hinterlauf rechts). Zur Kontrolle erfolgte die Injektion von PBS (plantar, Hinterlauf links). Nach 24 und 48 Stunden erfolgte die Messung der Dicke der Fußsohle.

Asservierung humanen Probenmaterials

Die Patientenrekrutierung erfolgte nach Genehmigung durch die Ethikkommission gemäß der Deklaration von Helsinki aus dem Royal Adelaide Hospital (Adelaide, Australien). Alle Patienten unterzogen sich einer Lobektomie oder Pneumektomie im Rahmen einer malignen Grunderkrankung und wurden nach Geschlecht, Alter, Tumorentität, Raucher- und COPD-Status kategorisiert. Die Diagnosestellung der COPD erfolgte nach den Kriterien der Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD; Stand 2009). Patienten, die den Rauchabusus innerhalb der letzten drei Monate einstellten, wurden als Raucher klassifiziert. Die Entnahme 2-4 nicht-tumoröser 0,5 cm durchmessender Gewebeproben erfolgte aus einem tumorfernen, peripheren Areal durch den Pathologen, inklusive anschließender Überführung in RNAlater (Qiagen) oder Zamboni-Fixativ für nachfolgende Genanalysen und Histologie.⁶⁰

mRNA-Analysen und Enzym-Aktivitätsmessungen humanen Lungengewebes

Nach Homogenisierung des Lungengewebes, RNA-Extraktion und cDNA-Synthese erfolgten vergleichende Expressionsanalysen der zentralen Komponenten des SphK/S1P-Systems (SphK1, SphK2, S1P₁, S1P₂, S1P₃, S1P₄, S1P₅, S1PP1, S1PP2, S1PL) sowie zweier Referenzgene, Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6PD) und RNA-Polymerase II (RP II), mittels qPCR. Die relative Expression wurde mittels $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode kalkuliert.⁵⁹ Proben mit RNA-Konzentrationen $\leq 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ oder zu geringer RNA-Integritätsnummer (RIN < 5) wurden ausgeschlossen.⁶¹ Enzym-Aktivitätsmessungen der SphK erfolgten in homogenisiertem Lungengewebe unter Verwendung der Substrate D-erythro-Sphingosin und [γ -³²P]ATP.^{62,63}

Statistik

Zum Vergleich zweier Datengruppen wurde der Student t-Test (parametrischer Test) oder der Mann-Whitney-U-Test (nicht-parametrischer Test) angewandt. Bei drei oder mehr Datengruppen erfolgte die Varianzanalyse (ANOVA). Eine lineare Regressionsanalyse kam zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen pulmonalvaskulärer Hyperreagibilität und pulmonalarteriellem Remodeling zum Einsatz. Der Pearson-Korrelationskoeffizient wurde für Korrelationsanalysen angewandt. Die multivariante Varianzanalyse (MANOVA) erfolgte zur Untersuchung des Einflusses der jeweiligen Kategorie (Alter, Geschlecht, Tumorentität, Raucher- und COPD-Status) auf das mRNA-Expressionsprofil des humanen Lungengewebes. Ein p-Wert $\leq 0,05$ galt als signifikant.

5. Ergebnisse

1 A Die Rolle der SphK1 in der akuten und chronischen pulmonalen T_H2-Inflammation

SphK1-Defizienz führte zu verminderter akuter pulmonaler Inflammation

Die Induktion der akuten pulmonalen Inflammation führte sowohl bei den WT- als auch bei den SphK1^{-/-}-Tieren im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe (PBS/OVA) zu einem massiven Leukozyteninflux in die Lunge. Im Vergleich zu den WT-Mäusen zeigten die SphK1^{-/-}-Mäuse eine geringere Gesamtzellzahl der BAL, die überwiegend auf eine Reduktion der eosinophilen Granulozyten zurückzuführen war.

Nach chronischer OVA-Exposition war die Gesamtzellzahl der BAL im Vergleich zur akuten pulmonalen Inflammation deutlich vermindert, jedoch gegenüber den Kontroll-Gruppen (PBS/OVA) signifikant erhöht. Die Zelldifferenzierung zeigte keine Unterschiede zwischen den sensibilisierten und OVA-exponierten WT- und SphK1^{-/-}-Mäusen (OVA/OVA).

Zytokinprofile der BAL

Im Vergleich zu den Kontrollgruppen führte die akute pulmonale Inflammation in den WT- und SphK1^{-/-}-Mäusen zu einem deutlichen Anstieg der T_H2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, sowie von IL-12p40, RANTES und G-CSF (Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor). In der BAL der OVA/OVA-behandelten SphK1^{-/-}-Mäuse war im Vergleich zu den WT-Mäusen vermehrt IL-2, RANTES, KC und G-CSF nachweisbar. Eotaxin, IL-10, TNF- α und IFN- γ waren in allen Gruppen unverändert. Nach chronischer OVA-Exposition zeigten die Zytokinprofile keine Unterschiede zwischen WT- und SphK1^{-/-}-Tieren.

SphK1-Defizienz führte zu verringerter AHR bei akuter pulmonaler Inflammation

Naive und PBS/OVA-behandelte SphK1^{-/-}-Mäuse zeigten sowohl einen verringerten Atemwegswiderstand als auch eine verringerte Atemwegsreagibilität verglichen mit den jeweiligen WT-Mäusen. Die akute pulmonale T_H2-Inflammation führte bei WT- und SphK1^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den Kontroll-Gruppen sowohl zu einem Anstieg des Atemwegswiderstandes als auch zur AHR auf Methacholin. OVA/OVA-behandelte SphK1^{-/-}-Mäuse zeigten hierbei im Vergleich zu den OVA/OVA-behandelten WT-Mäusen einen verminderten Atemwegswiderstand und eine reduzierte AHR.

Bei chronischer pulmonaler Inflammation waren Atemwegswiderstand und Atemwegsreagibilität in keiner der beiden OVA/OVA-Gruppen gegenüber den Kontrollgruppen erhöht.

SphK1-Defizienz führte zu erhöhter PVH bei chronischer pulmonaler Inflammation

Die akute pulmonale Inflammation hatte eine massive PVH auf den Thromboxanrezeptor-Agonisten U46619 zur Folge. SphK1^{-/-}-Tiere wiesen im Vergleich zu den WT-Tieren in Bezug auf pulmonalarteriellen Mitteldruck (Ppa mean) und PVH jedoch keinerlei Alterationen auf. Interessanterweise war die PVH der chronisch OVA/OVA-behandelten Mäuse im Vergleich zu den Kontrollgruppen weiterhin ausgeprägt detektierbar. Zudem war die PVH der SphK1^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen deutlich erhöht und in der Tendenz höher als bei akuter Inflammation.

Pulmonale mRNA-Expressionsprofile

In den SphK1^{-/-}-Mäusen war SphK1-mRNA im Gegensatz zu den WT-Tieren erwartungsgemäß nicht nachweisbar. Die OVA/OVA-Behandlung führte bei den SphK1^{-/-}-Tieren im Gegensatz zu den WT-Tieren zu einer reduzierten Expressionsrate der SphK2. Die bei den

OVA/OVA-behandelten WT-Tieren beobachtete Hochregulierung von S1PP2 und S1PL blieb bei den OVA/OVA-behandelten SphK1^{-/-}-Tieren aus. Die Rezeptoren S1P₁-S1P₃ waren bei akuter pulmonaler Inflammation nicht alteriert.

Bei chronischer pulmonaler Inflammation kam es hingegen zu einer reduzierten Expressionsrate von S1P₁ in den SphK1^{-/-}-Tieren im Gegensatz zu den WT-Tieren, wobei die Expression der S1P-synthetisierenden und der S1P-degradierenden Enzyme nicht verändert war.

Nachweis proliferierender pulmonalarterieller Zellen nach akuter OVA-Exposition

Die erhöhte PVH in den SphK1^{-/-}-Mäusen ging mit ausgeprägtem pulmonalarteriellm Remodeling einher. Mit Hilfe des Proliferationsmarkers Ki-67 konnten in den Lungen akut OVA/OVA-behandelter Tiere proliferierende glatte Gefäßmuskelzellen intraacinärer und peribronchialer Arterien nachgewiesen werden. Zudem wurden Ki-67-positive Nuclei von CD68⁺ Monozyten/ Makrophagen, Endothel- und Epithelzellen detektiert. Eine signifikante Zunahme der Gefäßwanddicke war zu diesem Zeitpunkt in den OVA/OVA-Gruppen im Vergleich zu den PBS/OVA-Gruppen nicht nachweisbar.

Chronische OVA-Exposition führte zu ausgeprägtem pulmonalarteriellm Remodeling

Nach chronischer OVA-Exposition konnte eine ausgeprägte Zunahme der Gefäßwanddicke in den die kleineren Atemwege begleitenden Arterien sowie in intraacinären Arterien nachgewiesen werden. Das Remodeling der Arterien war in den Lungen von SphK1^{-/-}-Mäusen tendenziell am stärksten ausgeprägt, wobei der Unterschied der stereologisch analysierten Gefäße keine Signifikanz erreichte. In den großen Pulmonalarterien hilärer Lungenareale und in den Pulmonalvenen war hingegen kein Remodeling detektierbar.

Nachweis intimaler Neomuskularisation in OVA-induziertem pulmonalarteriellm Remodeling

Die ultrastrukturellen Analysen der verdickten Gefäßwände mittels Elektronenmikroskopie zeigten eine charakteristische Anordnung longitudinal ausgerichteter glatter Muskelzellen innerhalb der Intima, luminal der Lamina elastica interna, die sich ebenfalls verdickt präsentierte, sowohl in chronisch OVA-exponierten WT- als auch SphK1^{-/-}-Tieren. Eine additive Basalmembran oder Lamina elastica zwischen den Endothelzellen und den longitudinalen glatten Muskelzellen konnte nicht detektiert werden.

Linearer Zusammenhang zwischen funktionellen und morphometrischen Daten

Regressionsanalysen ergaben eine signifikante, lineare Regression zwischen dem Ausmaß des pulmonalarteriellm Remodelings und der PVH der sensibilisierten und chronisch OVA-exponierten WT- und SphK1^{-/-}-Mäuse.

I B Die Rolle von S1P₄ bei T_H1- und T_H2-Inflammation

S1P₄-Defizienz führte zu erhöhten IgE-Spiegeln in naiven Mäusen

Im Vergleich zu den WT-Tieren wurden in den S1P₄^{-/-}-Mäusen signifikant höhere IgE-Spiegel nachgewiesen. IgA und IgG₁ waren ebenfalls erhöht nachweisbar, bei unveränderten Serumspiegeln von IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ und IgM.

S1P₄-Defizienz führte zu aggravierter pulmonaler T_H2-Inflammation

OVA/OVA-behandelte Mäuse entwickelten im Vergleich zu den Kontrollen (PBS/PBS) eine ausgeprägte pulmonale Inflammation mit einer Zunahme aller untersuchten Leukozyten-Subpopulationen, insbesondere der eosinophilen Granulozyten. Die S1P₄-Defizienz hatte im Vergleich zu den WT-Tieren eine erhöhte Gesamtzellzahl der BAL zur Folge, die wesentlich auf einen Anstieg der Makrophagen zurückzuführen war.

S1P₄-Defizienz führte zu einem deutlich verringerten Anstieg von IL-17

Die OVA-induzierte pulmonale Inflammation führte zu einem Anstieg der T_H2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, sowie von IL-10 und IL-17. Während die S1P₄-Defizienz keinen Einfluss auf IL-4, IL-5, IL-13 und IL-10 hatte, war der OVA-induzierte Anstieg von IL-17 deutlich vermindert. RANTES und IFN- γ waren in allen Gruppen unverändert.

S1P₄-Defizienz führte zu einer Zunahme der AHR

Der Atemwegswiderstand war in allen untersuchten Gruppen unverändert. Die durch die OVA/OVA-Behandlung induzierte AHR auf Methacholin war in den S1P₄^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen signifikant stärker ausgeprägt.

S1P₄-Defizienz hatte keinen Einfluss auf pulmonalarteriellen Mitteldruck und PVH

Weder die Sensibilisierung und Atemwegsexposition gegenüber OVA noch die S1P₄-Defizienz hatten einen Effekt auf den pulmonalarteriellen Mitteldruck. Die durch die OVA/OVA-Behandlung induzierte ausgeprägte PVH auf U46619 war durch die S1P₄-Defizienz unbeeinflusst.

T-Zell-Stimulation durch S1P₄^{-/-} dendritische Zellen reduzierte IL-17-Produktion

Die Aktivierung OVA-spezifischer T-Zellen (DO11.10 T-Zellen mit transgenem OVA-Rezeptor) durch S1P₄^{-/-} OVA-beladene dendritische Zellen führte im Vergleich zu WT dendritischen Zellen zu einer nicht-alterierten Proliferation der T-Zellen. Während die T_H1- und T_H2-Zytokine, IL-2, TNF- α , INF- γ , IL-4 und IL-5, ebenfalls unbeeinflusst blieben, führte die S1P₄-Defizienz zu einer verminderten Produktion von IL-17 als Hinweis auf eine inhibierte T_H17-Zell-Differenzierung.

S1P₄-Defizienz führte zu erhöhter Kontakt-Hypersensitivität

Die Zunahme der Ohrdicke nach Sensibilisierung und Exposition gegenüber FITC war bei den S1P₄^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen erhöht. Die Analyse der zervikalen Lymphknoten zwei Tage nach Exposition ergab sowohl für aktivierte CD4⁺-Zellen (CD44⁺ CD62L⁻) als auch für aktivierte CD8⁺-Zellen (CD44⁺ CD62L⁻) eine erhöhte Anzahl bei S1P₄-Defizienz.

S1P₄-Defizienz führte zu reduzierter Typ-IV-Hypersensitivität

Die Zunahme der Ohrdicke nach Sensibilisierung und Exposition gegenüber NP-O-Su war bei den S1P₄^{-/-} - im Vergleich zu den WT-Mäusen reduziert.

II Das humane SphK/S1P-System der Lunge

Gewebemorphologie und -pathologie

Histologische Untersuchungen aller Proben ergaben das morphologische Bild peripheren Lungengewebes ohne Anzeichen für Malignität.

SphK1 ist die prädominierende SphK-Isoform

6 von insgesamt 55 Proben wurden wegen zu geringer RNA-Konzentration oder RIN von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Die mRNA aller untersuchten Komponenten des SphK/S1P-Systems konnte mittels Polymerasekettenreaktion im humanen Lungengewebe nachgewiesen werden. Der Vergleich der mittleren relativen Expressionslevel ergab eine achtfach höhere Expression der SphK1 im Vergleich zur SphK2. Die Expressionsmuster der S1P-Rezeptoren und der S1P-degradierenden Enzyme, nach absteigenden Expressionsleveln geordnet, lauten wie folgt: S1P₁>S1P₄>S1P₅>S1P₂>S1P₃ und S1PL>S1PP1>S1PP2.

Verringerte S1P₅-Expression bei COPD

Die multivariante Varianzanalyse ergab eine reduzierte Expression von S1P₅ im Lungengewebe von COPD-Patienten (n=25) im Vergleich zu Nicht-COPD-Patienten (n=24). Hingegen fanden sich keine Hinweise für einen Einfluss der übrigen Kategorien (Alter, Geschlecht, Tumorentität und Raucherstatus) auf das Expressionsprofil.

Keine Unterschiede in der SphK-Enzymaktivität zwischen COPD und Nicht-COPD

Die Messungen der Enzymaktivität ergaben eine hohe Variabilität zwischen den einzelnen Patientenproben, ohne Hinweise auf Alterationen bei COPD (n=15) im Vergleich zu Nicht-COPD (n=15).

Nachweis von Korrelationen

Korrelationsanalysen ergaben positive Korrelationen zwischen den Rezeptoren S1P₅ und S1P₁. Zudem fanden sich positive Korrelationen zwischen S1P₃ und S1P₂ und den einzelnen S1P-degradierenden Enzymen. Für S1P₁ und die SphK-Enzymaktivität konnte eine negative Korrelation gezeigt werden.

6. Diskussion

Im Rahmen dieser Studie erfolgten grundlegende Untersuchungen modulatorischer Effekte des SphK/S1P-Systems auf immunologische Prozesse, sowie auf inflammationsassoziierte Veränderungen des pulmonalvaskulären Systems und der Atemwege. Die Defizienz der SphK1 hatte bei akuter T_H2 -Inflammation protektive Einflüsse auf pulmonalen Leukozyteninflux und Atemwegshyperreagibilität (AHR) bei gleichzeitig unveränderter pulmonalvaskulärer Hyperreagibilität (PVH). Bei chronischer T_H2 -Inflammation führte die SphK1-Defizienz hingegen zur Aggravierung der PAH-assoziierten PVH sowie zu ausgeprägtem pulmonalarteriellen Remodeling.

Auch in den $S1P_4^{-/-}$ -Mäusen war im Vergleich zu den WT-Mäusen eine Dissoziation T_H2 -induzierter Atemwegs- und Gefäßpathologie zu beobachten. Während Leukozyteninflux und AHR bei $S1P_4$ -Defizienz erhöht waren, blieb die PVH unverändert. Ferner führte die $S1P_4$ -Defizienz bei akuter pulmonaler Inflammation zu einem verringerten Anstieg von IL-17 in der BAL. Hierzu konkordant wiesen reduzierte IL-17-Spiegel nach $CD4^+$ -Zell-Aktivierung durch $S1P_4^{-/-}$ dendritische Zellen auf eine Inhibierung der T_H17 -Zell-Differenzierung hin, bei unveränderter Produktion von T_H1 - und T_H2 -Zytokinen. Während die $S1P_4$ -Defizienz auch im T_H2 -Modell der Kontakt-Hypersensitivität zu einer verstärkten Immunantwort führte, zeigte sich bei der T_H1 -induzierten Typ-IV-Hypersensitivitäts-Reaktion ein protektiver Effekt der $S1P_4$ -Defizienz.

Mittels grundlegender Charakterisierung des humanen SphK/S1P-Expressionsprofils der Lunge konnte die SphK1, übereinstimmend mit der Literatur, als prädominierendes S1P-synthetisierendes Enzym sowie $S1P_1$ als prädominierender S1P-Rezeptor identifiziert werden.^{2,4,5} Vergleichende Analysen zwischen COPD- und Nicht-COPD-Patienten ergaben eine reduzierte Expression von $S1P_5$ im Lungengewebe von COPD-Patienten. Weitere Veränderungen des SphK/S1P-Expressionsprofils sowie der SphK-Aktivität wurden nicht detektiert.

Immunologische Prozesse scheinen eine zentrale Rolle in der Entstehung der PAH zu spielen.³⁹⁻⁴¹ Die in dieser Arbeit eingesetzten Mausmodelle akuter und chronischer pulmonaler T_H2 -Inflammation rufen PAH-assoziierte Veränderungen der Lunge hervor, einschließlich perivaskulärer Leukozyteninfiltration, PVH, pulmonalarteriellen Remodeling und spezifischen Veränderungen der Proteinexpressionsprofile.⁶⁴⁻⁶⁸ In einer 2005 von Törmänen et al. publizierten Arbeit wurde T_H2 -induziertes pulmonalarteriell Remodeling erstmals beschrieben; ein Jahr später folgte die Erstbeschreibung der T_H2 -induzierten PVH von Witzenrath et al.^{66,67} Seither untersuchen zahlreiche weitere Arbeitsgruppen die T_H2 -induzierten, PAH-assoziierten pulmonalvaskulären Veränderungen, die weder spezies- noch allergenspezifisch zu sein scheinen.⁶⁸⁻⁸²

Die zugrundeliegenden Mechanismen der PVH, die erstmals 1988 an isolierten humanen Pulmonalarterien von PAH-Patienten beschrieben wurde, sind bislang unzureichend bekannt.³¹ Eine verstärkte Vasokonstriktion im Rahmen der endothelialen Dysfunktion scheint jedoch in der Frühphase der PAH pathogenetisch von großer Bedeutung zu sein.³² Möglicherweise wird die PVH durch proinflammatorische Mediatoren induziert, ähnlich wie es für die AHR diskutiert wird.⁸³ Auch in den häufig angewandten PAH-assoziierten Monocrotalin- und Hypoxie-Modellen konnte die PVH detektiert werden.^{30,84} Die murine T_H2 -induzierte PVH konnte für die PAH-relevanten Vasokonstriktoren Thromboxan, Serotonin und Endothelin-1 nachgewiesen werden.⁶⁷ Diese Substanzen werden bei PAH vermehrt gebildet und tragen wesentlich zur Imbalance zwischen Vasokonstriktoren und Vasodilatoren wie Prostazyklin und Stickstoffmonoxid bei.⁸⁵⁻⁸⁸

In dieser Arbeit konnte erstmals eine positive Korrelation zwischen der T_H2 -induzierten PVH und dem morphometrischen Ausmaß des pulmonalarteriellen Remodelings nachgewiesen werden. Eine ausgeprägte Gefäßhyperreagibilität ging mit ausgeprägtem Remodeling einher. Ob diese Beobachtung ausschließlich auf die Zunahme der glatten Muskelzellen zurückzuführen ist oder sekundäre Faktoren wie Veränderungen im Thromboxan-System hierbei eine Rolle spielen, ist gegenwärtig nicht bekannt. Jüngst publizierte Studien deuten jedoch auf eine enge Verknüpfung des Ceramid/SphK/S1P-Systems mit dem Thromboxan-System hin.^{89,90}

Des Weiteren erfolgten erstmals ultrastrukturelle Analysen der verdickten Gefäßwände der pulmonalen Arterien mittels Elektronenmikroskopie. Hierbei konnten longitudinal angeordnete glatte Muskelzellen in der Intima nachgewiesen werden. Da diese neu gebildete Muskelschicht luminal der Basalmembran lokalisiert war, wird vermutet, dass sie Folge des Einwanderns von Progenitorzellen aus dem Gefäßlumen oder der luminal gerichteten Migration von Zellen der Media ist.^{91,92} Diese spezielle pathologische Gefäßmorphologie wurde auch für die Lungengefäße von Patienten mit pulmonaler Hypertonie beschrieben.^{93,94} Zusammenfassend deutet die hier vorgelegte Studie auf eine mögliche Beteiligung des SphK/S1P-Systems an der Pathogenese der PAH hin.

Modulatorische Einflüsse des SphK/S1P-Systems auf die T_H2-induzierte pulmonale Inflammation und die AHR wurden ebenfalls an anderer Stelle beschrieben: Sowohl der Knockdown der SphK1 mittels siRNA (small interfering RNA) als auch die Inhibition der SphK1 führten, konsistent mit den hier erhobenen Daten, zu einer Reduktion der Atemwegs-inflammation, wohingegen die zusätzliche intranasale Applikation von S1P die Inflammation verstärkte.⁹⁵⁻⁹⁷ Wiederum konsistent mit den erhobenen Daten reduzierte die Inhibition der SphK1 die AHR, wohingegen die S1P-Applikation zu einem Anstieg der AHR führte.^{96,98-100} Hierzu partiell inkonsistent ist die Arbeit von Chiba et al., in der die SphK-Inhibition zwar die AHR reduzierte, jedoch nur tendenziell einen Einfluss auf die Atemwegs-inflammation zeigte.¹⁰⁰ Die Ursache der Inkonsistenz ist unklar, jedoch könnte sie in der unterschiedlichen Auswahl der SphK-Inhibitoren und der variierenden Inhibitorspezifität und -wirkdosis begründet sein.¹⁰¹

Die zentrale Rolle des SphK/S1P-Systems in der Pathogenese des Asthma bronchiale wurde im Rahmen der hier zitierten Arbeiten wiederholt postuliert und das SphK/S1P-System als möglicher therapeutischer Angriffspunkt diskutiert.^{98,102-105} Vor dem Hintergrund der detektierten Gefäßpathologie bei SphK1-Defizienz sowie unter Berücksichtigung der gewebe- und organspezifischen Distribution der S1P-Rezeptoren scheint jedoch weniger die Inhibition der SphK sondern vielmehr der spezifische (Ant-)Agonismus eines oder mehrerer S1P-Rezeptoren eine mögliche therapeutische Perspektive zu bieten. Derart gezielte pharmakologische Interventionen erfordern tiefgreifende Kenntnisse über die vermittelten Effekte der einzelnen S1P-Rezeptoren.

Der Effekt der S1P₄-Defizienz auf Leukozyteninflux und AHR in der T_H2-induzierten pulmonalen Inflammation konnte in dieser Arbeit erstmals untersucht werden. Obwohl die T_H2-Zytokin-Antwort in den S1P₄^{-/-}-Mäusen unverändert war, kam es zu einer Aggravierung des Leukozyteninflux und der AHR. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind gegenwärtig unklar, jedoch könnten die reduzierten IL-17-Spiegel in der BAL sowie die erhöhten Serum-IgE-Spiegel der S1P₄^{-/-}-Tiere als mögliche Erklärungsansätze angenommen werden. Schnyder-Candrian et al. konnten IL-17 bereits als negativen Regulator für die T_H2-induzierte pulmonale Inflammation identifizieren und zeigen, dass exogen appliziertes IL-17 in OVA-sensibilisierten und -exponierten Mäusen sowohl die Atemwegs-inflammation als auch die AHR reduzierte.¹⁰⁶ Ferner ist beschrieben, dass erhöhte Serum-IgE-Spiegel mit Asthma bronchiale und AHR assoziiert sind.^{107,108}

Die S1P₄-Defizienz führte in den untersuchten T_H2-Modellen konsistent zu einer Aggravierung der Immunantwort, während sie bei T_H1-Reaktionen einen protektiven Einfluss zu haben schien. Der protektive Effekt in der T_H1-Antwort der Typ-IV-Hypersensitivitäts-Reaktion könnte jedoch auf die in den S1P₄^{-/-}-Mäusen inhibierte T_H17-Zell-Differenzierung zurückzuführen sein, da bereits gezeigt werden konnte, dass IL-17A^{-/-}-Mäuse in diesem Modell ebenfalls eine reduzierte Hypersensitivität aufweisen.¹⁰⁹ Zusammenfassend deuten die beobachteten Unterschiede in den T_H1- und T_H2-Immunreaktionen nicht auf eine veränderte Sekretion von T_H1- und T_H2-Zytokinen hin, sondern auf eine gestörte Interaktion zwischen T-Zellen und dendritischen Zellen mit konsekutiv inhibierter Induktion der T_H17-Zell-Differenzierung durch S1P₄-defiziente dendritische Zellen.

Inwiefern sich ein S1P₄-Agonismus protektiv auf T_H2-Inflammation und AHR auswirken könnte ist derzeit nicht bekannt. Weitere Studien sind zur Klärung dieser Fragestellung erforderlich.

Die COPD stellt ebenso wie die PAH eine inflammatorische Systemerkrankung dar, die mit einer chronischen Inflammation der gesamten Lunge einhergeht und sekundär die Entstehung der pulmonalen Hypertonie begünstigen kann.^{32,110,111} Als mögliche Pathomechanismen werden erhöhter oxidativer Stress und vermehrte Alveolarzellapoptose diskutiert.⁵⁰ Eine ineffektive Efferozytose könnte die Akkumulation apoptotischen Materials und sekundäre inflammatorische Prozesse zusätzlich begünstigen.⁵³ Zudem wird zunehmend die Gefäßbeteiligung als zentraler Faktor in der Pathogenese der COPD diskutiert.^{110,112} Jüngst publizierte Daten von Seimetz et al. zeigen, dass das Gefäßremodeling der Entstehung des Lungenemphysems im murinen COPD-Modell vorausgeht.⁵²

Petrache et al. identifizierten in einer 2005 publizierten Studie den Anstieg der proapoptisch wirkenden Ceramide als einen bedeutenden Mechanismus in der Entstehung des murinen Lungenemphysems und konnten darüber hinaus eine erhöhte Expression von Ceramiden in humanen Emphysemungen nachweisen.¹¹³ Ceramide bilden als Baustein für S1P die Grundlage für das SphK/S1P-System. Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit konnte das humane SphK/S1P-System der Lunge erstmals vergleichend zwischen COPD- und Nicht-COPD-Patienten untersucht werden, wobei eine Reduktion der Expression von S1P₅ bei COPD detektiert wurde.

Die bereits beschriebene hohe Expression von S1P₅ in humanem Lungengewebe konnte in dieser Studie bestätigt werden.¹¹⁴ Daten zur exakten S1P₅-Distribution innerhalb der Lunge liegen jedoch nicht vor. S1P₅ moduliert als prädominierender S1P-Rezeptor auf NK-Zellen Migration und Homing.²⁴ Es konnte gezeigt werden, dass die Zahl zirkulierender NK-Zellen bei Rauchern und COPD-Patienten reduziert ist und NK-Zellen in der BAL von Patienten mit chronischer Bronchitis vermindert nachweisbar sind.¹¹⁵⁻¹¹⁷ Ferner scheint neben der reduzierten Phagozytoseaktivität von Alveolarmakrophagen auch die Phagozytoseaktivität der NK-Zellen bei COPD reduziert zu sein, was eine ineffektive Efferozytose begünstigen könnte.^{116,118} Jedoch wird diese Kasuistik kontrovers diskutiert, da in einer weiteren Arbeit weder eine alterierte NK-Zellzahl noch eine alterierte NK-Zell-Funktion nachgewiesen wurde.¹¹⁹ Ob S1P₅ auch eine Rolle in pulmonalen Remodeling-Prozessen spielen könnte ist gegenwärtig unklar. Jedoch konnte gezeigt werden, dass S1P₅ die Proliferation und Migration ösophagealer Plattenepithelkarzinomzellen inhibiert.¹²⁰ Weitere Untersuchungen zur pulmonalen S1P₅-Distribution und -Funktion sowie zur Rolle der NK-Zellen in der Pathogenese der COPD sind erforderlich.

Die wesentliche Limitation in der Analyse des humanen SphK/S1P-Systems liegt in der Verwendung von Lungenhomogenat. Zellspezifische Analysen könnten helfen, eine höhergradige Differenzierung zwischen den einzelnen pulmonalen Zellkompartimenten zu ermöglichen. Diese sind Gegenstand aktueller Untersuchungen. Wenngleich alle untersuchten Gewebeproben aus tumorfernen Arealen asserviert wurden, können zudem tumorbedingte Veränderungen der validierten Variablen nicht ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit immunmodulatorische Effekte der SphK1- und S1P₄-Defizienz auf das pulmonale Gefäß- und Atemwegssystem beschrieben werden. Ferner wurden Hinweise auf eine Beteiligung des SphK/S1P-Systems in der Pathogenese der PAH gewonnen.

7. Ausblick

Die (Patho-)Physiologie des SphK/S1P-Systems ist komplex, da sich unter unphysiologischen Bedingungen wie Inflammation die gewebe- und organspezifischen Expressionsprofile der S1P-Rezeptoren ändern können. Für die Entwicklung von Pharmakotherapeutika scheint daher eine rezeptorspezifische Modulation essenziell. Aufbauend auf den in dieser Studie erhobenen Daten wird nun der Einfluss weiterer S1P-Rezeptoren auf T_H2-induzierte Inflammation, pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität und pulmonalarteriell Remodeling untersucht, um möglicherweise mittelfristig therapeutische Strategien entwickeln zu können. Insbesondere das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Modell der chronischen T_H2-Inflammation kann dazu dienen, Pathomechanismen in der Entstehung des pulmonalarteriellen Remodelings zu identifizieren und findet Verwendung in aktuellen Studien.

8. Literaturverzeichnis

1. Kohama, T., *et al.* Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. *J Biol Chem* 273, 23722-23728 (1998).
2. Zhang, G., Contos, J.J., Weiner, J.A., Fukushima, N. & Chun, J. Comparative analysis of three murine G-protein coupled receptors activated by sphingosine-1-phosphate. *Gene* 227, 89-99 (1999).
3. Liu, H., *et al.* Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform. *J Biol Chem* 275, 19513-19520 (2000).
4. Melendez, A.J., Carlos-Dias, E., Gosink, M., Allen, J.M. & Takacs, L. Human sphingosine kinase: molecular cloning, functional characterization and tissue distribution. *Gene* 251, 19-26 (2000).
5. Fukuda, Y., Kihara, A. & Igarashi, Y. Distribution of sphingosine kinase activity in mouse tissues: contribution of SPHK1. *Biochem Biophys Res Commun* 309, 155-160 (2003).
6. Olivera, A. & Spiegel, S. Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature* 365, 557-560 (1993).
7. Kveberg, L., Bryceson, Y., Inngjerdingen, M., Rolstad, B. & Maghazachi, A.A. Sphingosine 1 phosphate induces the chemotaxis of human natural killer cells. Role for heterotrimeric G proteins and phosphoinositide 3 kinases. *Eur J Immunol* 32, 1856-1864 (2002).
8. Roviezzo, F., *et al.* Human eosinophil chemotaxis and selective in vivo recruitment by sphingosine 1-phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11170-11175 (2004).
9. Jolly, P.S., *et al.* Transactivation of sphingosine-1-phosphate receptors by FcepsilonRI triggering is required for normal mast cell degranulation and chemotaxis. *J Exp Med* 199, 959-970 (2004).
10. McVerry, B.J. & Garcia, J.G. In vitro and in vivo modulation of vascular barrier integrity by sphingosine 1-phosphate: mechanistic insights. *Cell Signal* 17, 131-139 (2005).
11. Idzko, M., *et al.* Local application of FTY720 to the lung abrogates experimental asthma by altering dendritic cell function. *J Clin Invest* 116, 2935-2944 (2006).
12. Brinkmann, V. & Baumruker, T. Pulmonary and vascular pharmacology of sphingosine 1-phosphate. *Curr Opin Pharmacol* 6, 244-250 (2006).
13. Kurashima, Y., *et al.* Sphingosine 1-phosphate-mediated trafficking of pathogenic Th2 and mast cells for the control of food allergy. *J Immunol* 179, 1577-1585 (2007).
14. Lan, Y.Y., *et al.* Sphingosine 1-phosphate receptor agonism impairs skin dendritic cell migration and homing to secondary lymphoid tissue: association with prolonged allograft survival. *Transpl Immunol* 20, 88-94 (2008).
15. Rivera, J., Proia, R.L. & Olivera, A. The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. *Nat Rev Immunol* 8, 753-763 (2008).
16. Gude, D.R., *et al.* Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a "come-and-get-me" signal. *FASEB J* 22, 2629-2638 (2008).
17. Igarashi, J. & Michel, T. Agonist-modulated targeting of the EDG-1 receptor to plasmalemmal caveolae. eNOS activation by sphingosine 1-phosphate and the role of caveolin-1 in sphingolipid signal transduction. *J Biol Chem* 275, 32363-32370 (2000).
18. Lorenz, J.N., Arend, L.J., Robitz, R., Paul, R.J. & MacLennan, A.J. Vascular dysfunction in S1P2 sphingosine 1-phosphate receptor knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292, R440-446 (2007).
19. Salomone, S., *et al.* Analysis of sphingosine 1-phosphate receptors involved in constriction of isolated cerebral arteries with receptor null mice and pharmacological tools. *Br J Pharmacol* 153, 140-147 (2008).
20. Szczepaniak, W.S., Pitt, B.R. & McVerry, B.J. S1P2 receptor-dependent Rho-kinase activation mediates vasoconstriction in the murine pulmonary circulation induced by sphingosine 1-phosphate. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 299, L137-145 (2010).

21. Murakami, A., *et al.* Sphingosine 1-phosphate (S1P) regulates vascular contraction via S1P3 receptor: investigation based on a new S1P3 receptor antagonist. *Mol Pharmacol* 77, 704-713 (2010).
22. Graler, M.H., Bernhardt, G. & Lipp, M. EDG6, a novel G-protein-coupled receptor related to receptors for bioactive lysophospholipids, is specifically expressed in lymphoid tissue. *Genomics* 53, 164-169 (1998).
23. Regard, J.B., Sato, I.T. & Coughlin, S.R. Anatomical profiling of G protein-coupled receptor expression. *Cell* 135, 561-571 (2008).
24. Walzer, T., *et al.* Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor. *Nat Immunol* 8, 1337-1344 (2007).
25. Le Stunff, H., Peterson, C., Liu, H., Milstien, S. & Spiegel, S. Sphingosine-1-phosphate and lipid phosphohydrolases. *Biochim Biophys Acta* 1582, 8-17 (2002).
26. Mukerjee, D., *et al.* Prevalence and outcome in systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension: application of a registry approach. *Ann Rheum Dis* 62, 1088-1093 (2003).
27. Wigley, F.M., *et al.* The prevalence of undiagnosed pulmonary arterial hypertension in subjects with connective tissue disease at the secondary health care level of community-based rheumatologists (the UNCOVER study). *Arthritis Rheum* 52, 2125-2132 (2005).
28. Hachulla, E., *et al.* The three-year incidence of pulmonary arterial hypertension associated with systemic sclerosis in a multicenter nationwide longitudinal study in France. *Arthritis Rheum* 60, 1831-1839 (2009).
29. Simonneau, G., *et al.* Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 54, S43-54 (2009).
30. Gillespie, M.N., Olson, J.W., Reinsel, C.N., O'Connor, W.N. & Altieri, R.J. Vascular hyperresponsiveness in perfused lungs from monocrotaline-treated rats. *Am J Physiol* 251, H109-114 (1986).
31. Brink, C., Cerrina, C., Labat, C., Verley, J., Benveniste, J. The effect of contractile agonists on isolated pulmonary arterial and venous muscle preparations derived from patients with primary pulmonary hypertension. *Am. Rev. Resp. Dis.* 137(1988).
32. Humbert, M., *et al.* Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 43, 13S-24S (2004).
33. Cool, C.D., Kennedy, D., Voelkel, N.F. & Tuder, R.M. Pathogenesis and evolution of plexiform lesions in pulmonary hypertension associated with scleroderma and human immunodeficiency virus infection. *Hum. Pathol* 28, 434-442 (1997).
34. Runo, J.R. & Loyd, J.E. Primary pulmonary hypertension. *Lancet* 361, 1533-1544 (2003).
35. D'Alonzo, G.E., *et al.* Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med* 115, 343-349 (1991).
36. Jing, Z.C., *et al.* Registry and survival study in chinese patients with idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Chest* 132, 373-379 (2007).
37. Galie, N., *et al.* A meta-analysis of randomized controlled trials in pulmonary arterial hypertension. *Eur Heart J* 30, 394-403 (2009).
38. Thenappan, T., *et al.* Survival in pulmonary arterial hypertension: a reappraisal of the NIH risk stratification equation. *Eur. Respir. J.* 35, 1079-1087 (2010).
39. Dorfmueller, P., Perros, F., Balabanian, K. & Humbert, M. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 22, 358-363 (2003).
40. Hassoun, P.M., *et al.* Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *J Am Coll Cardiol* 54, S10-19 (2009).
41. Price, L.C., *et al.* Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Chest* 141, 210-221 (2012).
42. Humbert, M., *et al.* Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 151, 1628-1631 (1995).
43. Dorfmueller, P., *et al.* Chemokine RANTES in severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 165, 534-539 (2002).

44. Itoh, T., *et al.* Increased plasma monocyte chemoattractant protein-1 level in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Respirology* 11, 158-163 (2006).
45. Quarck, R., Nawrot, T., Meyns, B. & Delcroix, M. C-reactive protein: a new predictor of adverse outcome in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 53, 1211-1218 (2009).
46. Serag, A.R., Hazaa, S.M., Afifi, I.K. & Ghoname, N.F. Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted chemokine and interleukin-6 in rheumatic pulmonary hypertension, targets for therapeutic decisions. *Eur J Cardiothorac Surg* 37, 853-858 (2010).
47. Soon, E., *et al.* Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 122, 920-927 (2010).
48. Tudor, R.M., Groves, B., Badesch, D.B. & Voelkel, N.F. Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am J Pathol* 144, 275-285 (1994).
49. World Health Organisation. Global Alliance Against Chronic Respiratory Diseases. http://www.who.int/entity/gard/publications/chronic_respiratory_diseases.pdf (Accessed 12 February 2011).
50. Tudor, R.M., *et al.* Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor receptor blockade. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29, 88-97 (2003).
51. Hogg, J.C., *et al.* The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 350, 2645-2653 (2004).
52. Seimetz, M., *et al.* Inducible NOS inhibition reverses tobacco-smoke-induced emphysema and pulmonary hypertension in mice. *Cell* 147, 293-305 (2011).
53. Mukaro, V.R. & Hodge, S. Airway clearance of apoptotic cells in COPD. *Curr Drug Targets* 12, 460-468 (2011).
54. Allende, M.L., *et al.* Mice deficient in sphingosine kinase 1 are rendered lymphopenic by FTY720. *J Biol Chem* 279, 52487-52492 (2004).
55. Golfier, S., *et al.* Shaping of terminal megakaryocyte differentiation and proplatelet development by sphingosine-1-phosphate receptor S1P4. *FASEB J* 24, 4701-4710 (2010).
56. Foster, P.S., Hogan, S.P., Ramsay, A.J., Matthaei, K.I. & Young, I.G. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J. Exp. Med.* 183, 195-201 (1996).
57. Temelkovski, J., Hogan, S.P., Shepherd, D.P., Foster, P.S. & Kumar, R.K. An improved murine model of asthma: selective airway inflammation, epithelial lesions and increased methacholine responsiveness following chronic exposure to aerosolised allergen. *Thorax* 53, 849-856 (1998).
58. Howard CV, R.M. Unbiased stereology. Three dimensional measurement in microscopy. *Oxford: Bios Scientific publications* (1998).
59. Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408 (2001).
60. Stefanini, M., De Martino, C. & Zamboni, L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* 216, 173-174 (1967).
61. Radonic, A., *et al.* Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 313, 856-862 (2004).
62. Liu, H., *et al.* Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform. *J Biol Chem* 275, 19513-19520 (2000).
63. Roberts, J.L., *et al.* An assay for sphingosine kinase activity using biotinylated sphingosine and streptavidin-coated membranes. *Anal Biochem* 331, 122-129 (2004).
64. Pabst, R. & Tschernig, T. Perivascular capillaries in the lung: an important but neglected vascular bed in immune reactions? *J Allergy Clin Immunol* 110, 209-214 (2002).

65. Fajardo, I., Svensson, L., Bucht, A. & Pejler, G. Increased levels of hypoxia-sensitive proteins in allergic airway inflammation. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 170, 477-484 (2004).
66. Tormanen, K.R., Uller, L., Persson, C.G. & Erjefalt, J.S. Allergen exposure of mouse airways evokes remodeling of both bronchi and large pulmonary vessels. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 171, 19-25 (2005).
67. Witzenth, M., *et al.* Allergic lung inflammation induces pulmonary vascular hyperresponsiveness. *Eur.Respir.J.* 28, 370-377 (2006).
68. Daley, E., *et al.* Pulmonary arterial remodeling induced by a Th2 immune response. *J.Exp.Med.* 205, 361-372 (2008).
69. Avdalovic, M.V., *et al.* Vascular remodeling is airway generation-specific in a primate model of chronic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 174, 1069-1076 (2006).
70. Rydell-Tormanen, K., Uller, L. & Erjefalt, J.S. Remodeling of extra-bronchial lung vasculature following allergic airway inflammation. *Respir Res* 9, 18 (2008).
71. Rydell-Tormanen, K., Johnson, J.R., Fattouh, R., Jordana, M. & Erjefalt, J.S. Induction of vascular remodeling in the lung by chronic house dust mite exposure. *Am J Respir Cell Mol Biol* 39, 61-67 (2008).
72. Su, X., *et al.* Spatial and phenotypic characterization of vascular remodeling in a mouse model of asthma. *Pathobiology* 75, 42-56 (2008).
73. Vieira, R.P., *et al.* Aerobic conditioning and allergic pulmonary inflammation in mice. II. Effects on lung vascular and parenchymal inflammation and remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295, L670-679 (2008).
74. Medoff, B.D., *et al.* Adiponectin deficiency increases allergic airway inflammation and pulmonary vascular remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41, 397-406 (2009).
75. Rydell-Tormanen, K., Uller, L. & Erjefalt, J.S. Allergic airway inflammation initiates long-term vascular remodeling of the pulmonary circulation. *Int Arch Allergy Immunol* 149, 251-258 (2009).
76. Lundequist, A., *et al.* Prostaglandin E(2) exerts homeostatic regulation of pulmonary vascular remodeling in allergic airway inflammation. *J Immunol* 184, 433-441 (2010).
77. Moreno-Alvarez, P., *et al.* Aerosolized polymerized type I collagen reduces airway inflammation and remodelling in a guinea pig model of allergic asthma. *Lung* 188, 97-105 (2010).
78. Weng, M., *et al.* Adiponectin decreases pulmonary arterial remodeling in murine models of pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45, 340-347 (2011).
79. Shreiner, A.B., *et al.* Repeated exposure to *Aspergillus fumigatus* conidia results in CD4+ T cell-dependent and -independent pulmonary arterial remodeling in a mixed Th1/Th2/Th17 microenvironment that requires IL-4 and IL-10. *Infect Immun* (2011).
80. Nagayoshi, M., *et al.* Inhalation of *Stachybotrys chartarum* evokes pulmonary arterial remodeling in mice, attenuated by Rho-kinase inhibitor. *Mycopathologia* 172, 5-15 (2011).
81. Weng, M., *et al.* Eosinophils are Necessary for Pulmonary Arterial Remodeling in a Mouse Model of Eosinophilic-Inflammation Induced Pulmonary Hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2011).
82. Prado, C.M., *et al.* Effects of inducible nitric oxide synthase inhibition in bronchial vascular remodeling-induced by chronic allergic pulmonary inflammation. *Exp Lung Res* 37, 259-268 (2011).
83. Fernandes, D.J., *et al.* Do inflammatory mediators influence the contribution of airway smooth muscle contraction to airway hyperresponsiveness in asthma? *J Appl Physiol* 95, 844-853 (2003).
84. Delannoy, E., *et al.* Hypoxia-induced hyperreactivity of pulmonary arteries: role of cyclooxygenase-2, isoprostanes, and thromboxane receptors. *Cardiovasc Res* 85, 582-592 (2010).
85. Stewart, D.J., Levy, R.D., Cernacek, P. & Langleben, D. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann Intern Med* 114, 464-469 (1991).

86. Christman, B.W., *et al.* An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 327, 70-75 (1992).
87. Giaid, A., *et al.* Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 328, 1732-1739 (1993).
88. Herve, P., *et al.* Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *Am J Med* 99, 249-254 (1995).
89. Moral-Sanz, J., *et al.* Ceramide inhibits Kv currents and contributes to TP-receptor-induced vasoconstriction in rat and human pulmonary arteries. *Am J Physiol Cell Physiol* 301, C186-194 (2011).
90. Spijkers, L.J., Alewijnse, A.E. & Peters, S.L. FTY720 (Fingolimod) increases vascular tone and blood pressure in spontaneously hypertensive rats via inhibition of sphingosine kinase. *Br J Pharmacol* (2012).
91. Smith, P., *et al.* The ultrastructure of plexogenic pulmonary arteriopathy. *J Pathol* 160, 111-121 (1990).
92. Rabinovitch, M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest* 118, 2372-2379 (2008).
93. Wilkinson, M., Langhorne, C.A., Heath, D., Barer, G.R. & Howard, P. A pathophysiological study of 10 cases of hypoxic cor pulmonale. *Q J Med* 66, 65-85 (1988).
94. Barbera, J.A., Peinado, V.I. & Santos, S. Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 21, 892-905 (2003).
95. Nishiuma, T., *et al.* Inhalation of sphingosine kinase inhibitor attenuates airway inflammation in asthmatic mouse model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294, L1085-1093 (2008).
96. Lai, W.Q., *et al.* The role of sphingosine kinase in a murine model of allergic asthma. *J Immunol* 180, 4323-4329 (2008).
97. Chiba, Y., *et al.* Sphingosine-1-phosphate aggravates antigen-induced airway inflammation in mice. *Open Respir Med J* 4, 82-85 (2010).
98. Roviezzo, F., *et al.* Sphingosine-1-phosphate/sphingosine kinase pathway is involved in mouse airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36, 757-762 (2007).
99. Roviezzo, F., *et al.* Systemic administration of sphingosine-1-phosphate increases bronchial hyperresponsiveness in the mouse. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 42, 572-577 (2010).
100. Chiba, Y., Takeuchi, H., Sakai, H. & Misawa, M. SKI-II, an inhibitor of sphingosine kinase, ameliorates antigen-induced bronchial smooth muscle hyperresponsiveness, but not airway inflammation, in mice. *J Pharmacol Sci* 114, 304-310 (2010).
101. French, K.J., *et al.* Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase. *Cancer Res* 63, 5962-5969 (2003).
102. Ryan, J.J. & Spiegel, S. The role of sphingosine-1-phosphate and its receptors in asthma. *Drug News Perspect* 21, 89-96 (2008).
103. Voelkel, N.F. & Spiegel, S. Why is effective treatment of asthma so difficult? An integrated systems biology hypothesis of asthma. *Immunol Cell Biol* 87, 601-605 (2009).
104. Edmonds, Y., Milstien, S. & Spiegel, S. Development of small-molecule inhibitors of sphingosine-1-phosphate signaling. *Pharmacol Ther* 132, 352-360 (2011).
105. Karmouty-Quintana, H., *et al.* Treatment with a sphingosine-1-phosphate analog inhibits airway remodeling following repeated allergen exposure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2012).
106. Schnyder-Candrian, S., *et al.* Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *J Exp Med* 203, 2715-2725 (2006).
107. Sunyer, J., *et al.* Relationship between serum IgE and airway responsiveness in adults with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 95, 699-706 (1995).
108. Sunyer, J., Anto, J.M., Castellsague, J., Soriano, J.B. & Roca, J. Total serum IgE is associated with asthma independently of specific IgE levels. The Spanish Group of the European Study of Asthma. *Eur Respir J* 9, 1880-1884 (1996).

109. Nakae, S., *et al.* Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* 17, 375-387 (2002).
110. Voelkel, N.F. & Cool, C.D. Pulmonary vascular involvement in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J Suppl* 46, 28s-32s (2003).
111. Joppa, P., Petrasova, D., Stancak, B. & Tkacova, R. Systemic inflammation in patients with COPD and pulmonary hypertension. *Chest* 130, 326-333 (2006).
112. Yamato, H., Sun, J.P., Churg, A. & Wright, J.L. Guinea pig pulmonary hypertension caused by cigarette smoke cannot be explained by capillary bed destruction. *J Appl Physiol* 82, 1644-1653 (1997).
113. Petrache, I., *et al.* Ceramide upregulation causes pulmonary cell apoptosis and emphysema-like disease in mice. *Nat Med* 11, 491-498 (2005).
114. Im, D.S., Clemens, J., Macdonald, T.L. & Lynch, K.R. Characterization of the human and mouse sphingosine 1-phosphate receptor, S1P5 (Edg-8): structure-activity relationship of sphingosine1-phosphate receptors. *Biochemistry* 40, 14053-14060 (2001).
115. Costabel, U., Maier, K., Teschler, H. & Wang, Y.M. Local immune components in chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration* 59 Suppl 1, 17-19 (1992).
116. Prieto, A., *et al.* Defective natural killer and phagocytic activities in chronic obstructive pulmonary disease are restored by glycoposphopeptical (immunoforon). *Am J Respir Crit Care Med* 163, 1578-1583 (2001).
117. Zeidel, A., *et al.* Immune response in asymptomatic smokers. *Acta Anaesthesiol Scand* 46, 959-964 (2002).
118. Hodge, S., Hodge, G., Scicchitano, R., Reynolds, P.N. & Holmes, M. Alveolar macrophages from subjects with chronic obstructive pulmonary disease are deficient in their ability to phagocytose apoptotic airway epithelial cells. *Immunol Cell Biol* 81, 289-296 (2003).
119. Majo, J., Ghezzi, H. & Cosio, M.G. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J* 17, 946-953 (2001).
120. Hu, W.M., *et al.* Effect of S1P5 on proliferation and migration of human esophageal cancer cells. *World J Gastroenterol* 16, 1859-1866 (2010).

Anteilerklärung

Christoph Tabeling hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

Role of sphingosine kinase 1 in allergen-induced pulmonary vascular remodeling and hyperresponsiveness.

Haberberger RV*, **Tabeling C***, Runciman S, Gutbier B, König P, Andratsch M, Schütte H, Suttorp N, Gibbins I, Witzenrath M.

J Allergy Clin Immunol. 2009 Nov;124(5):933-41.e1-9.

IF: 9.273

***contributed equally**

Anteil 40 Prozent

Der Promovend hat das Thema selbstständig ausgewählt, experimentelle Modelle und Methoden selbstständig etabliert und Experimente durchgeführt. Er hat in enger Zusammenarbeit mit den Kooperationspartnern in Adelaide/ Australien – teilweise vor Ort – auch deren experimentelle Beiträge mitgeplant und die Daten für die Publikation ausgewählt. Er hat das Manuskript geschrieben und unter Anleitung bis zur Publikation betreut und bearbeitet.

Sphingosine-1-phosphate receptor 4 (S1P₄) deficiency profoundly affects dendritic cell function and T_H17-cell differentiation in a murine model.

Schulze T, Golfier S, **Tabeling C**, Räbel K, Gräler MH, Witzenrath M, Lipp M.

FASEB J. 2011 Nov;25(11):4024-36.

IF: 6.515

Anteil 20 Prozent

Der Promovend hat in Kooperation mit Kollegen des Max-Delbrück-Centrums das Thema selbstständig gewählt und inhaltlich gestaltet, die experimentellen Modelle und Methoden selbstständig etabliert und Experimente durchgeführt. Er hat die Daten ausgewertet und war an der Erstellung des Manuskriptes und seiner Publikation maßgeblich beteiligt.

Expression profile of the sphingosine kinase signalling system in the lung of patients with chronic obstructive pulmonary disease.

Cordts F, Pitson S, **Tabeling C**, Gibbins I, Moffat DF, Jersmann H, Hodge S, Haberberger RV.

Life Sci. 2011 Nov 21;89(21-22):806-11.

IF: 2.451

Anteil 20 Prozent

Der Promovend hat im Rahmen zweier mehrmonatiger Forschungsaufenthalte in Adelaide/ Australien experimentelle Methoden selbstständig etabliert und wesentlich zur Akquirierung der Patientendaten sowie des Probenmaterials beigetragen. Er hat die Gewebeaufarbeitung, die mRNA-Analysen sowie die Datenauswertung selbstständig durchgeführt und war an der Erstellung des Manuskriptes intensiv beteiligt.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Originalarbeiten

- (1) Hypoxic pulmonary vasoconstriction requires endothelial signal conduction via connexin 40.
Wang L, Yin J, Nickles H, Ranke H, Tabuchi A, Hoffmann J, **Tabeling C**, Barbosa-Sicard E, Chanson M, Kwak BR, Shin HS, Wu S, Isakson B, Witzenrath M, de Wit C, Fleming I, Kuppe H, Kuebler WM.
J Clin Invest. 2012 Sep; accepted.
IF: 13.069
- (2) Intermedin stabilized endothelial barrier function and attenuated ventilator-induced lung injury in mice.
Müller-Redetzky HC, Kummer W, Pfeil U, Hellwig K, Will D, Paddenberg R, **Tabeling C**, Hippenstiel S, Suttorp N, Witzenrath M.
PLoS ONE. 2012 May; 10.1371/journal.pone.0035832
IF: 4.092
- (3) Expression profile of the sphingosine kinase signalling system in the lung of patients with chronic obstructive pulmonary disease.
Cordts F, Pitson S, **Tabeling C**, Gibbins I, Moffat DF, Jersmann H, Hodge S, Haberberger RV.
Life Sci. 2011 Nov 21;89(21-22):806-11.
IF: 2.527
- (4) Sphingosine-1-phosphate receptor 4 (S1P₄) deficiency profoundly affects dendritic cell function and T_H17-cell differentiation in a murine model.
Schulze T, Golfier S, **Tabeling C**, Räbel K, Gräler MH, Witzenrath M, Lipp M.
FASEB J. 2011 Nov;25(11):4024-36.
IF: 5.712
- (5) Dissection of a type I interferon pathway in controlling bacterial intracellular infection in mice.
Lippmann J, Müller HC, Naujoks J, **Tabeling C**, Shin S, Witzenrath M, Hellwig K, Kirschning CJ, Taylor GA, Barchet W, Bauer S, Suttorp N, Roy CR, Opitz B.
Cell Microbiol. 2011 Nov;13(11):1668-82.
IF: 5.458
- (6) The NLRP3 inflammasome is differentially activated by pneumolysin variants and contributes to host defense in pneumococcal pneumonia.
Witzenrath M, Pache F, Lorenz D, Koppe U, Gutbier B, **Tabeling C**, Reppe K, Meixenberger K, Dorhoi A, Ma J, Holmes A, Trendelenburg G, Heimesaat MM, Bereswill S, van der Linden M, Tschopp J, Mitchell TJ, Suttorp N, Opitz B.
J Immunol. 2011 Jul 1;187(1):434-40.
IF: 5.788
- (7) Role of sphingosine kinase 1 in allergen-induced pulmonary vascular remodeling and hyperresponsiveness.
Haberberger RV*, **Tabeling C***, Runciman S, Gutbier B, König P, Andratsch M, Schütte H, Suttorp N, Gibbins I, Witzenrath M.
J Allergy Clin Immunol. 2009 Nov;124(5):933-41.e1-9.
IF: 11.003
***contributed equally**

Abstracts

- Pathogenic effects of autoantibodies against vascular receptors in patients with SSc. Becker M, Kill A, Undeutsch R, **Tabeling C**, Witzenrath M, Kuebler WM, Bock S, Samapati R, Heidecke H, Ghofrani H, Hoepfer M, Lukitsch I, Dragun D, Riemekasten G.
2nd Systemic Sclerosis World Congress 2012
Rheumatology 2012;51:ii27–ii123
- Systemic sclerosis as prototypic disease for functional antibodies against vascular receptors: From bedside to bench and mouse models.
Kill A, Undeutsch R, **Tabeling C**, Witzenrath M, Kuebler WM, Bock S, Samapati R, Heidecke H, Lukitsch I, Dragun D, Riemekasten G.
Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology 2011.
Arthritis Rheum 2011;63 Suppl 10 :1495
- Role of functional antibodies against vascular receptors in systemic sclerosis.
Becker M, Kill A, Undeutsch R, **Tabeling C**, Witzenrath M, Kuebler WM, Bock S, Samapati R, Heidecke H, Lukitsch I, Dragun D, Riemekasten G.
10th Dresden Symposium on Autoantibodies 2011.
From Prediction to Prevention of Autoimmune Diseases, Pabst Science Publishers; ISBN 978-3-89967-735-5
- The NLRP3 Inflammasome is Differentially Activated by Pneumolysin Variants and Contributes to Host Defense in Pneumococcal Pneumonia.
Witzenrath M, Pache F, Lorenz D, Koppe U, Gutbier B, Meixenberger K, **Tabeling C**, Dorhoi A, Ma J, Holmes A, Trendelenburg G, Heimesaat MM, Bereswill S, van der Linden M, Tschopp J, Mitchell TJ, Suttorp N, Opitz B.
Herbsttagung Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin 2010.
Pneumologie 2011; 65 DOI: 10.1055/s-0030-1270363
- Expression profile of the sphingosine 1-phosphate system in human lung.
Jersmann HJP, Tam Tam S, Ivanov R, **Tabeling C**, Pitson S, Haberberger RV.
Annual Scientific Meeting of The Thoracic Society of Australia and New Zealand 2009.
Respirology (2009) 14, (Suppl. 1) A11–A31; DOI: 10.1111/j.1400-1843.2009.01502.x
- Sphingosine kinase 1 deficiency leads to increased remodelling and responsiveness of pulmonary vasculature in chronic airway inflammation.
Haberberger RV, **Tabeling C**, König P, Runciman S, Gibbins I, Witzenrath M.
104th Anatomical Record/Wiley Symposium: Respiratory biology 2009.
DOI: 10.3337/anatges.2009.0009
- Rolle der Sphingosin-Kinase 1 bei inflammatorischem pulmonalvaskulärem Remodelling und vaskulärer Hyperreagibilität der Lunge.
Haberberger RV, **Tabeling C**, Runciman S, König P, Proia R, Andratsch M, Gutbier B, Schütte H, Suttorp N, Gibbins I, Witzenrath M.
50. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin 2009.
Pneumologie 2009; 63 DOI: 10.1055/s-0029-1214132

- Rolle der Sphingosin-Kinase 1 bei inflammatorischem pulmonalvaskulärem Remodelling und vaskulärer Hyperreagibilität der Lunge.
Haberberger RV, **Tabeling C**, Runciman S, König P, Proia R, Andratsch M, Gutbier B, Schütte H, Suttorp N, Gibbins I, Witzenrath M.
Herbsttagung Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin 2008.
Pneumologie 2009; 63 DOI: 10.1055/s-0029-1202460
- Role of sphingosine-kinase 1 in allergen-induced pulmonary vascular remodelling and hyperresponsiveness.
Haberberger RV, **Tabeling C**, Runciman S, König P, Proia RL, Schütte H, Suttorp N, Gibbins I, Witzenrath M.
19th European Students' Conference 2008
Eur J Med Res 13(Supplement 1): I-XX, 1-180(2008)
- Absence of Sphingosine Kinase-1 Increased Pulmonary Vascular Remodeling and Hyperresponsiveness in Allergic Lung Inflammation.
Haberberger RV, **Tabeling C**, Runciman S, Proia RL, Suttorp N, Gibbins I, Witzenrath M.
American Thoracic Society – Annual Conference 2008.
Am. J. Respir. Crit. Care Med., Apr 2008;177.
- Absence of sphingosine kinase 1 lead to remodeling and increased responsiveness of pulmonary vasculature in chronic airway inflammation.
Haberberger RV, **Tabeling C**, Runciman S, Proia RL, Suttorp N, Gibbins I, Witzenrath M.
Thoracic Society of Australia and New Zealand Annual Scientific Meeting 2008.
Respirology (2008) 13, (Suppl. 2) A25-A74; DOI: 10.1111/j.1440-1843.2008.01252.x
- Differenzierung von malignem und benignem Lungengewebe mittels quantitativer real-time PCR.
Fleischhacker M, Schmidt B, **Tabeling C**, Weickmann S, Klemm W, Merk J, Schäper F, Leschber G.
Deutsche Gesellschaft für Thoraxchirurgie. 15. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thoraxchirurgie. German Medical Science; 2006. Doc06dgt65

Weitere Vorträge und Poster

- Decoding the role of type I and II interferons in Legionella pneumophila infection. Naujoks J, **Tabeling C**, Lippmann J, Mollenkopf H, Witzentrath M, Suttorp N, Opitz B. 64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) e.V..
- Aged mice overexpressing prepro-Endothelin-1 develop severe systemic amyloidosis. Kershaw O, **Tabeling C**, Sander LE, Gruber AD, Witzentrath M. International Conference „Innate immunity of the lung – Improving pneumonia outcome“ 2012 in Berlin.
- PKC alpha ablation reduces mortality in a murine pneumococcal pneumonia model. Doehn JM, Fischer K, **Tabeling C**, Gutbier B, Suttorp N, Witzentrath M, Hippenstiel S. International Conference „Innate immunity of the lung – Improving pneumonia outcome“ 2012 in Berlin.
- Decoding the role of type I and II interferons in Legionella pneumophila infection. Naujoks J, **Tabeling C**, Lippmann J, Mollenkopf H, Witzentrath M, Suttorp N, Opitz B. International Conference „Innate immunity of the lung – Improving pneumonia outcome“ 2012 in Berlin.
- Anti-AT1R Abs and anti-ETAR Abs in systemic sclerosis: clues for possible involvement in disease pathogenesis. Kill A, **Tabeling C**, Günther J, Becker M, Witzentrath M, Dragun D, Burmester GR, Riemekasten G. 40. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie 2012.
- Decoding the role of type I interferons in murine Legionella pneumophila infections. Naujoks J, **Tabeling C**, Suttorp N, Opitz B. ZIBI Graduate School Berlin, Retreat 2012.
- Seminar (Gastredner): Pulmonary vascular remodeling in allergen-induced lung inflammation
Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG
Dept. of Respiratory Diseases Research (Dr. Stefan-Lutz Wollin), 2011.
- Expression profile of the sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate system in the human lung. Cordts F, **Tabeling C**, Chegeni N, Tam Tam S, Jersmann H, Hodge S, Haberberger RV. Australian Society for Medical Research – South Australian Annual Scientific Meeting 2010.
- Sphingosine kinase 1 deficiency leads to increased remodelling and responsiveness of pulmonary vasculature in chronic airway inflammation. Haberberger RV, **Tabeling C**, Runciman S, König P, Proia RL, Schütte H, Suttorp N, Gibbins I, Witzentrath M. The German Academy of Sciences Leopoldina – Leopoldina Symposium on Lipid Signalling 2008.

Selbstständigkeitserklärung

Ich, Christoph Tabeling, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Experimentelle Untersuchungen zur Rolle des Sphingosinkinase/ Sphingosin-1-Phosphat-Systems bei pulmonaler Inflammation“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin 07.05.2012

Christoph Tabeling

Danksagung

Ich danke meinen Eltern Christiane und Michael ganz herzlich für ihre immerwährende liebevolle und grenzenlose Unterstützung. Ebenso danke ich meinem Bruder Andreas und meiner lieben Schwägerin Christina für ihren Rückhalt und ihr Interesse an meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mentor Herrn PD Dr. Martin Witzenrath für die engagierte Betreuung in jeder Phase dieser Arbeit, sowie für die vielen hilfreichen Diskussionen und Anregungen. Für die fortwährende Motivation und das mir entgegengebrachte Vertrauen empfinde ich große Dankbarkeit.

Ich danke Prof. Dr. Norbert Suttrop, Direktor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie, für die Möglichkeit, diese experimentelle Promotionsarbeit durchführen zu können, sowie für die intensive Unterstützung und Förderung.

Herrn PD Dr. Rainer V. Haberberger danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit, die fruchtbaren und lehrreichen Forschungsaufenthalte an seinem Institut und nicht zuletzt für die Freude am gemeinsamen Forschen.

Großer Dank gilt allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe PD Dr. Witzenrath für die enorme Hilfsbereitschaft, den konstruktiven Austausch und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Von ganzem Herzen danke ich meinen lieben Freunden für ihr Verständnis und ihren uneingeschränkten Rückhalt.