

DISSERTATION

Nachweis von Autoantikörpern gegen  
Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren bei Systemischer Sklerose und  
Pulmonal-Arterieller-Hypertonie

[Identification of autoantibodies against  
sphingosin-1-phosphate-receptors in systemic sclerosis and  
pulmonary artery hypertension]

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Hans Gluschke

Erstbetreuung: Prof. Dr. Lutz Schomburg

Datum der Promotion: 29.11.2024



## Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis .....	iii
Abbildungsverzeichnis .....	iv
Abkürzungsverzeichnis .....	v
Zusammenfassung .....	1
1 Einleitung.....	5
1.1 Pulmonale Hypertonie (PH) und Pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH).....	5
1.2 Systemische Sklerose (SSc) und PAH.....	6
1.3 Sphingosin-1-Phosphat-Signalweg.....	7
1.4 S1P-Signaling bei PAH und SSc .....	9
1.5 Autoantikörper (aAb) bei SSc ± PAH.....	9
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	10
2 Materialien und Methodik .....	12
2.1 Humanseren von Patient:innen mit SSc ± PAH, kardiovaskulären und autoimmunen Erkrankungen sowie gesunden Kontrollen .....	12
2.2 Chemikalien .....	13
2.3 Geräte.....	14
2.4 Design von S1PR-Luciferase-Fusionsproteine.....	15
2.5 Expression von S1PR-Luc in HEK-Zellen.....	15
2.6 Gewinnung von Zellextrakten .....	15
2.7 Immunopräzipitation von S1PR-aAb-Komplexen in Humanseren.....	16
2.8 Kommerzielle S1PR1–3 Antikörper zur internen Assay-Validierung .....	17
2.9 Statistische Auswertung .....	18
3 Ergebnisse .....	19
3.1 Quantitative Assays zu Detektion von S1PR-aAb .....	19
3.2 Signalstabilität nach multiplen Einfrier- und Auftauzyklen der Humanseren .....	20
3.3 Prävalenzen von S1PR-aAb bei SSc Patienten und gesunden Kontrollen .....	20
3.4 Prävalenz von S1PR-aAb bei SSc ± PAH .....	22
3.5 Prävalenz von S1PR-aAb bei autoimmunen und kardiovaskulären Erkrankungen.....	23
3.6 Kreuzreaktivität der aAb mit anderen S1PR.....	25
3.7 S1PR-aAb im Hinblick auf klinische Charakteristika.....	25
4 Diskussion .....	27
5 Schlussfolgerungen.....	32
Literaturverzeichnis.....	33
Eidesstattliche Versicherung.....	39

---

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen.....	40
Druckexemplar(e) der Publikation(en) .....	41
Lebenslauf .....	51
Komplette Publikationsliste .....	54
Danksagung.....	55

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Charakterisierung der Studienkohorten.....	13
Tabelle 2: Chemikalien.....	13
Tabelle 3: Puffer.....	14
Tabelle 4: Geräte.....	14
Tabelle 5: Kommerzielle S1PR1–3 Ab.....	17
Tabelle 6: Charakterisierung der SSc-Kohorte im Hinblick auf S1PR-aAb.....	26

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hypothese – Rolle von S1PR-aAb bei PAH / SSc.....	11
Abbildung 2: Immunopräzipitation von S1PR-aAb.....	17
Abbildung 3: Verdünnung von kommerziellen S1PR-Antikörpern. ....	19
Abbildung 4: Signalstabilität der Serumproben nach multiplen Einfrier-Auftau-Zyklen.....	20
Abbildung 5: Vergleich von S1PR-aAb Prävalenzen bei SSc und gesunden Kontrollen (HC). ....	21
Abbildung 6: S1PR-aAb Prävalenzen bei SSc ± PAH. ....	23
Abbildung 7: S1PR-aAb bei autoimmunen und kardiovaskulären Erkrankungen.....	24

## Abkürzungsverzeichnis

aAb	Autoantikörper
Ab	Antikörper
Abb.	Abbildung
ANA	Antinukleäre Antikörper
AT1R	Angiotensin-II Type 1 Receptor
BI	Binding Index
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CTD	Connective Tissue Disease (Kollagenose)
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
eNOS	Epitheliale NO-Synthethase
ERK1/2	Extracellular-Signal Regulated Kinase 1/2
ETAR	Endothelin-1 Type A Receptor
FDA	Federal Drug Administration
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
HC	Healthy Controls (gesunde Kontrollen)
HDL	High-Density-Lipoprotein
HEK293	Human Embryonic Kidney Cells 293
IgG	Immunglobulin G
IQR	Interquartile Range
Luc	Luciferase
mPAP	Pulmonalarterieller Mitteldruck
PAH	Pulmonalarterielle Hypertonie
PASMC	Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline

---

PH	Pulmonale Hypertonie
RHC	Right Heart Congestion
RLU	Relative Light Units
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1PR	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor
SphK	Sphingosinkinase
SSc	Systemische Sklerose
TSH-R	Thyreotropin-Rezeptor
w/o	Without

## Zusammenfassung

**KONTEXT:** Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen in unseren Breitengraden noch immer die häufigsten Todesursachen dar. Neben Wohlstandserkrankungen wie dem metabolischen Syndrom zählen auch seltene Entitäten wie die pulmonale Hypertonie (PH) zu dieser Gruppe. Durch einen erhöhten pulmonalarteriellen Druck leiden die Patient:innen unter Dyspnoe, Synkopen bis hin zum Herzversagen. Die pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH) ist eine Unterform der PH und ist gekennzeichnet durch Entzündungsprozesse sowie den Umbau der Pulmonalarterien. Bei der systemischen Sklerose (SSc) assoziierten PAH scheint Autoimmunität durch Autoantikörper (aAb) eine Rolle zu spielen. Ein möglicher Signalweg, welcher bei PAH diskutiert wird, läuft über Sphingosin-1-Phosphat (S1P), welches durch Bindung spezifischer GPCR neben Immunmodulation auch Einflüsse auf die Gefäßregulation und den Pulmonalarteriendruck (PAP) hat. Wir stellten die Hypothese auf, nach welcher S1P-Rezeptoren des kardiovaskulären Systems (S1PR1–3) potenzielle Ziele für aAb darstellen und sich bei SSc und SSc-PAH höhere Prävalenzen nachweisen lassen.

**METHODEN:** *In vitro* Assays für die Detektion von S1PR-aAb wurden konzipiert. Hierfür wurden Fusionsproteine aus S1PR und Luciferase (S1PR-Luc) als Reporter kloniert. Nach Inkubation der Humansenen mit S1PR-Luc folgte die Immunpräzipitation mittels Protein-A-Sepharose und die Bestimmung des Luciferasesignals. Je nach Höhe des Signals schlossen wir auf die Konzentration von spezifischen S1PR-aAb im Serum. Wir verglichen eine SSc Kohorte (n=158, 58 mit SSc-PAH) mit einer gesunden Kontrollgruppe (n=333). Eine weitere Kohorte von Patient:innen mit autoimmunen und kardiovaskulären Erkrankungen wurde auf die Prävalenz von S1PR-aAb untersucht.

**ERGEBNISSE:** Die neuen Assays wurden durch kommerzielle S1PR-Antikörper validiert. Die Signale waren spezifisch und nach multiplen Gefrier-und-Auftau-Zyklen der Serumproben ausreichend stabil. In der Kontrollgruppe reichten Prävalenzen von 2,7% für S1PR1-aAb und 3,6% für S1PR2-aAb bis hin zu 8,3% für S1PR3-aAb. In der SSc Kohorte zeigten sich signifikant höhere Prävalenzen von S1PR1-aAb (17,1%), S1PR2-aAb (19,0%) und S1PR3-aAb (21,5%), ( $p < 0,0001$ ). Bei Patient:innen mit SSc-PAH waren die Prävalenzen für aAb gegen den S1PR2 mit 25,9% und den S1PR3 mit 27,6% erhöht (versus SSc w/o PAH,  $p > 0,05$ ). Es konnte weiterhin eine Assoziation von Lungenfibrose

und S1PR2-aAb und S1PR3-aAb gezeigt werden (versus SSc w/o PAH,  $p > 0,05$ ). Weiterhin konnte bei autoimmunen und kardiovaskulären Erkrankungen eine erhöhte Prävalenz von aAb vornehmlich gegen S1PR2–3 festgestellt werden.

FAZIT: In dieser explorativen Querschnittsstudie wurde erstmalig das Vorkommen von natürlichen Antikörpern gegen die humanen S1PR1–3 beschrieben. Gemäß unserer Hypothese zeigte sich ein Zusammenhang von S1PR2–3 aAb Prävalenz und SSc sowie SSc-PAH. Longitudinale Studien und molekulare Analysen der aAb sind nötig, um die Rolle in der Pathogenese von SSc und PAH weiter aufzuschlüsseln.

## Abstract

**CONTEXT:** Cardiovascular disease remain the most frequent cause of death in our latitude. Besides so-called lifestyle diseases like the metabolic syndrome, less frequent entities as pulmonary hypertension (PH) belong to the group of cardiovascular disease as well. Due to elevated pressure in the pulmonary circulation, patients discover dyspnea, syncopes and right heart failure. Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a subtype of PH and characterized by inflammation processes and remodeling of the pulmonary arteries. The presence of autoimmunity and autoantibodies (aAb) against GPCR is especially relevant in systemic sclerosis (SSc) associated PAH. A pathway linked to the development of PAH is the signaling via sphingosine-1-phosphate (S1P). S1P binds to specific GPCR, leading (besides effects on the immune system) to modulation of the vasculature and the pulmonary artery pressure (PAP). Here, we hypothesized that S1P-receptors of cardiovascular relevance (S1PR1–3) serve as potential targets for aAb and appear more frequent in SSc and SSc-PAH subjects.

**METHODS:** In vitro assays for the detection of S1PR-aAb were developed. That for, whole protein S1PR sequences were fused in frame with luciferase as reporter. After incubation with human sera, receptor-antibody-complexes were precipitated with protein-A-sepharose. Depending on the signal intensity, S1PR-aAb concentrations were assumed. Here, we compared a cohort of SSc patients (n=158, 58 with SSc-PAH) with a healthy cohort (n=333). In another cohort, prevalence of S1PR-aAb was determined for patients with autoimmune or cardiovascular diseases.

**RESULTS:** The novel assays were validated through commercial S1PR antibodies. In a dilution series, they showed dose-dependent and receptor specific signals. Signal stability was proven by multiple freeze-and-thaw-cycles of sera samples. In the healthy cohort, prevalence of S1PR1-aAb was 2.7%; 3.6% for S1PR2-aAb and 8.3% for S1PR3-aAb. We saw higher prevalence in the SSc cohort, starting from 17.1% positivity in the S1PR1-assay, 19.0% for S1PR2 and 21.5% for S1PR3 ( $p < 0.0001$ ). In the subgroup of patients with SSc-PAH, prevalence was further elevated with 25.9% for S1PR2-aAb and 27.6% for S1PR3-aAb (versus SSc w/o PAH,  $p > 0.05$ ). In the subgroup-analysis, an association of interstitial lung disease and S1PR2-aAb positivity and S1PR3-aAb was seen (versus SSc w/o PAH,  $p > 0.05$ ). There was also a tendency of higher prevalence of aAb against predominantly S1PR2–3 in autoimmune and cardiovascular disease.

CONCLUSION: In this explorative, cross-sectional study, we described the presence of antibodies directed against human S1PR1–3 for the first time. In line with our hypothesis, our results impose a connection between prevalence of S1PR-aAb and SSc and SSc-PAH in particular. Nevertheless, longitudinal studies and molecular analyses of the aAb are needed to determine their potential role in the pathophysiology of SSc and PAH.

# 1 Einleitung

## 1.1 Pulmonale Hypertonie (PH) und Pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH)

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen in unseren Breitengraden noch immer die häufigsten Todesursachen dar. Neben sogenannten Wohlstandserkrankungen wie dem metabolischen Syndrom (arterielle Hypertonie, Glukoseintoleranz, Adipositas, Dyslipidiämie) zählen auch Syndrome wie die pulmonale Hypertonie (PH) zur Gruppe der kardiovaskulären Erkrankungen. Die PH betrifft circa 1 % der globalen Bevölkerung, bei Menschen älter als 65 Jahren beträgt die Prävalenz bis zu 10 % (1). Die PH ist definiert durch einen mittleren pulmonalarteriellen Druck (mPAP)  $\geq 20$  mmHg in Ruhe. Die Diagnosesicherung erfolgt durch eine Rechtsherzkatheteruntersuchung mit Druckmessung in den Pulmonalarterien sowie des postkapillären Verschlussdrucks. In der Praxis kommen jedoch auch weniger invasive Methoden zum Einsatz. Der Echokardiographie kommt im Screening auf PH eine besondere Bedeutung zu. Dabei können Auffälligkeiten wie eine Trikuspidalklappeninsuffizienz, ein hypertrophierter rechter Ventrikel sowie dilatierte Pulmonalarterien in Kombination mit suggestiver Klinik detektiert werden, welche eine PH wahrscheinlich machen (2). Klinisch können die Verläufe stark variieren: Nach einer initial asymptomatischen Phase leiden die Patient:innen im fortschreitenden Verlauf häufig unter Belastungsdyspnoe, Kurzatmigkeit, Synkopen bis hin zu Rechtsherzschwäche und Herzversagen.

Gemäß der Nizza Klassifikation von 2013 wird die PH nach ihrer Ätiologie in fünf Gruppen unterteilt, wobei die Untergruppe der PH mit Nachweis von erhöhtem postkapillären Verschlussdruck aufgrund einer Linksherzinsuffizienz mit Abstand die größte ist. Die pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH) stellt eine eher seltene Unterform der PH dar und liegt vor, wenn die pulmonal-vaskuläre Resistenz  $\geq 3$  Wood Units beträgt sowie eine präkapilläre Druckerhöhung nachgewiesen wird als auch der postkapilläre Wedge-Druck  $\leq 15$  mmHg misst (3). Weiterhin müssen gemäß der Definition als PAH schwerwiegende Lungenerkrankungen sowie chronisch-embolische Formen der PH ausgeschlossen werden. Etwa die Hälfte aller betroffenen Patient:innen leiden unter idiopathischen, hereditären oder medikamenten-induzierten PAH-Formen (4). In dieser Arbeit befassen wir uns primär mit der PAH-Form, welche im Rahmen von Kollagenosen, respektive der systemischen Sklerose (SSc) als häufigste Variante, auftritt.

Fortbestehende therapeutische Herausforderungen unterstreichen die Relevanz der andauernden wissenschaftlichen Auseinandersetzung mit der PAH. Aktuell ist das Therapieziel für Patient:innen mit PAH die langfristige Stabilisierung zur minimalen Beeinträchtigung der Rechtsherzfunktion. Klinische Risikostratifizierung und Verlaufskontrollen stützen sich derzeit auf die NYHA-Klassifikation, die 6-Minuten-Gehstrecke sowie den NT-pro-BNP Wert. Ansatzpunkt der pharmakologischen Therapie stellen in der Regel die Lungengefäße dar. Durch spezifische Vasodilatoren soll die Nachlast des rechten Ventrikels gesenkt werden, um einer fortschreitenden Rechtsherzbelastung entgegenzuwirken.

Des Weiteren ist zu beobachten, dass eine kleine Subgruppe der Patient:innen auf Calcium-Antagonisten anspricht (5). Andere vasoaktive Substanzklassen wie Endothelin-Antagonisten, Phosphodiesterase-Hemmer und Prostacyclinrezeptor-Agonisten finden sich ebenfalls in der Leitlinie (2). Unbehandelt führt die PAH zu Rechtsherzversagen und endet häufig letal (6).

Die PAH ist pathophysiologisch unter anderem gekennzeichnet durch Entzündungsprozesse, autoimmune Dysregulation, epigenetische Veränderungen und abnormen Metabolismus auf mitochondrialer Ebene. Bei den hereditären PAH-Formen sind zudem genetische Veränderungen im Bone morphogenetic protein (BMP) beschrieben (7). Histologisch zeigt sich eine gesteigerte Präsenz von Immunzellen und ein fibrotischer Umbau im Bereich der pulmonalen Arterien- und Arteriolen (8). Das vaskuläre Remodeling führt zur zunehmenden Verengung der Pulmonalarterien, was wiederum gemäß dem Hagen Poiseuille'schen Gesetz zur Abnahme des Volumenstroms um den Faktor 4 der Potenz des Innenradius führt und entsprechende kardiovaskuläre Komplikationen verursacht.

Aktuelle Studien haben bei der PAH eine erhöhte Aktivierung des angeborenen- und erworbenen Immunsystems nachweisen können. Spezifische Autoantikörper fanden sich vornehmlich bei Kollagenosen-assoziiierter PAH (9). Neben Veränderungen im Endothelin-, Prostacyclin- und NO-Signalweg werden in neueren Arbeiten auch Alterationen im Sphingosin-1-Phosphat-Signalweg diskutiert. So konnte die Arbeit von Chen et. al signifikant erhöhte S1P-Spiegel bei PAH im Mausmodell nachweisen (2, 10, 11).

## **1.2 Systemische Sklerose (SSc) und PAH**

Die SSc zählt mit einer weltweiten Prävalenz von etwa einem Fall auf 10.000 zu den seltenen Autoimmunerkrankungen und wird zur Familie der Kollagenosen gezählt (12).

Die namensgebende Vermehrung von Bindegewebe zeigt sich nicht nur durch Manifestationen an der Haut, sondern auch durch diverse Organbeteiligungen. Assoziierte Komplikationen reichen von gastrointestinalen Beschwerden, muskuloskelettalen Problemen über renale Krisen bis hin zur Lungenfibrose und PAH (13). Die pulmonale Beteiligung gilt als prognosebestimmend. So führt beispielsweise die Komplikation der PAH, welche bei bis zu 12 % der SSc Patient:innen auftritt, innerhalb von drei Jahren zu einer Mortalität von 25 bis zu 50 % (14, 15). Risikofaktoren für die Entwicklung einer PAH bei SSc sind, unter anderem ein langer Krankheitsverlauf mit langjährigem Raynaud-Phänom, ausgeprägte vaskuläre Manifestationen sowie der Nachweis von spezifischen antinukleären Antikörpern (ANA) im Serum (16).

Pathophysiologisch werden bei der SSc chronische Entzündungsprozesse, endotheliale Dysfunktionen und Dysregulationen des Immunsystems diskutiert (14). Autoantikörper (aAb) stellen ein vielbeschriebenes Phänomen bei SSc dar. Der Nachweis von spezifischen ANA ist seit 2004 ein Diagnosekriterium und wichtiger Bestandteil der aktuellen ACR/EULAR Leitlinie von 2015 (17). In der Übersichtsarbeit von Didier et al. von 2018 wird die Bedeutung vornehmlich anti-nukleärer Autoantikörper bei SSc detailliert beschrieben (9). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Sensitivität spezifischer aAb für die Diagnosestellung bei SSc zwar gering ist, ein Nachweis jedoch mit hoher Spezifität auf die Erkrankung schließen lässt. Darüber können die spezifischen aAb Auskunft über die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Komplikationen wie der PAH geben. So zeigt sich eine Assoziation von Anti-Centromer-Antikörpern, Anti-U1-RNP-AK, Anti-U3-RNP-AK und Anti-Th/To-AK mit SSc-assoziiierter PAH (9).

### **1.3 Sphingosin-1-Phosphat-Signalweg**

Sphingosine sind bioaktive Lipide, welche aus Ceramiden durch membranständige Ceramidasen synthetisiert werden. Die Ausschüttung und Produktion erfolgt vornehmlich durch aktivierte Thrombozyten, Erythrozyten und Endothelzellen in den Extrazellularraum (18). Sphingosinkinase-1 (SphK1) und SphK2 überführen Sphingosine durch Phosphorylierung in ihre aktive Form, das sogenannte Sphingosin-1-Phosphat (S1P). Die Synthese aus den Vorläufer-Sphingosinen erfolgt an der Innenseite der Zellmembran. Nach der Synthese werden die Sphingosine anschließend über spezifische S1P-Transportproteine wie das major Facilitator Superfamily domain-containing Protein 2B aus Erythrozy-

ten und Thrombozyten oder das Spinster-Homologue-2 aus dem Endothel in die Blutzirkulation entlassen (19). S1P bindet extrazellulär an Chaperone wie high Density Lipoproteine (HDL), Apolipoprotein M oder Albumin (20, 21).

Im menschlichen Körper fungiert S1P als ubiquitärer Botenstoff mit pleiotropen Effekten, welche maßgeblich durch Rezeptortyp und -besatz der Zielzellen bestimmt werden. Räumliche Gradienten von S1P kontrollieren Migration und Lymphknotenaustritt von Lymphozyten und spielen eine entscheidende Rolle im adaptiven Immunsystem und bei Inflammationsprozessen. Wird das physiologische Level von S1P in Zellen oder Geweben überschritten, so kann daraus eine profibrotische, proinflammatorische, antiapoptische und / oder promigratorische Wirkung entstehen (22). Neben einer direkten, intrazellulären Wirkung des S1P auf Histone, Zellzyklus und Zytokinproduktion wirkt das Sphingosin hauptsächlich über Bindung an spezifische, extrazelluläre Rezeptoren (21).

S1P bindet extrazellulär an membranständige G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren (GPCR). Bisher wurden fünf spezifische S1P-Rezeptoren (S1PR1–5) beschrieben, wobei im kardiovaskulären System die Rezeptor-Subtypen S1PR1, S1PR2 und S1PR3 dominieren (23, 24). So spielen S1PR1- und S1PR3-Signaling eine herausragende Rolle in der Homöostase des Blutdrucks, unter anderem bedingt durch die Kontrolle der endothelialen NO-Synthase (eNOS) (25). Die intrazelluläre Signaltransduktion erfolgt über heterotrimere G-Proteine und nachgeschaltete Proteinkinasen. In Hinblick auf das Endothel führt die S1PR1-Bindung zur Beeinflussung der vaskulären Integrität (20), was durch die Wirkung auf Integrine und zelluläre Junctions erklärt werden kann. Allgemein werden dem S1PR2- und S1PR3-Signaling im Gefäßsystem vasokonstriktive Effekte zugeschrieben (26). Die Aktivierung von S1PR2 und S1PR3 (u.a. in Makrophagen) kann durch vermehrte zelluläre Produktion von extrazellulärer Matrix, gesteigerter Proliferation von glatten Muskelzellen und epithelial-mesenchymaler Transformation zur pathologischen Gewebsfibrose bis hin zur Organdysfunktion führen (20, 26).

Auf glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien (PASMC) befindet sich ebenfalls ein hoher Besatz der Rezeptor-Subtypen S1PR1–3 (10). Erhöhte Gradienten von S1P sowie eine erhöhte Aktivität der Sphingosinkinase-1 in PASMC bei PAH wurden bereits in experimentellen Studien nachgewiesen (27) (28). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine exogene Zugabe von S1P in der Zellkultur von PASMC und pulmonal-arteriellem Endothel zur Proliferation der Zellreihen führte (11).

#### 1.4 S1P-Signaling bei PAH und SSc

Das physiologische Gleichgewicht aus vasokonstriktiven und vasodilatativen Signalen im Bereich der Pulmonalarterien und Arteriolen bedarf u.a. einer genauen Feinjustierung der PASMC Funktion und des pulmonal-arteriellen Endothels. Hierfür spielt das S1P/S1PR-Signaling eine entscheidende Rolle. So konnte beispielsweise in einem Mausmodell gezeigt werden, dass SphK1- und S1PR2-Knockout-Mäuse einen deutlich schwächeren Verlauf einer chronisch-hypoxischen PH aufwiesen. Ein S1PR2-Antagonist zeigte im gleichen Mausmodell einen vergleichbaren Effekt. Passend dazu fanden sich auch im Lungengewebe von Patient:innen mit PAH signifikant erhöhte S1P- und SphK1-Spiegel (10). Nicht nur bei der PAH, sondern auch bei der SSc wurden Veränderungen im S1P-Signaling nachgewiesen. So konnte die Arbeitsgruppe um Tokumura erhöhte S1P-Spiegel in einer kleinen SSc-Kohorte nachweisen (29). Erste Tierstudien konnten bereits zeigen, dass am ehesten S1PR1-Antagonisten die vaskuläre Permeabilität und den vaskulären Widerstand reduzieren – zwei Eigenschaften, welche sich möglicherweise positiv auf den Verlauf von SSc auswirken könnten (30). Der S1PR1- und S1PR5-Modulator Cenerimod konnte bereits bei Sklerodermie als auch in einem Mausmodell mit Bleomycin-induzierter Lungen- und Hautfibrose die Fibrose reduzieren (31).

#### 1.5 Autoantikörper (aAb) bei SSc ± PAH

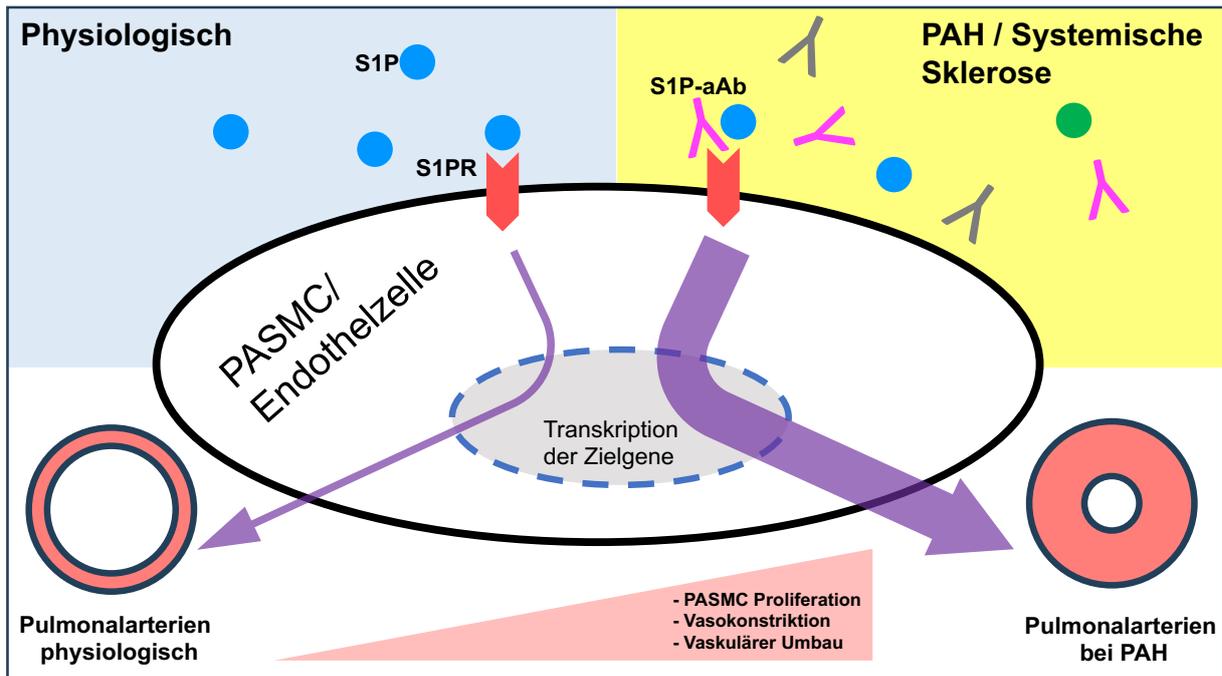
Es ist allgemein bekannt, dass Antikörper neben lebenswichtigen Funktionen des Immunsystems einen entscheidenden Faktor in der Pathogenese vieler Autoimmunerkrankungen darstellen, wenn sie sich gegen körpereigene Antigene/Zielstrukturen richten. Abhängig von den körpereigenen Zielantigenen und dem spezifischen Zelltyp unterscheiden sich die aus einer Antikörper-Antigen-Bindung resultierenden Signalkaskaden erheblich. Autoantikörper lassen sich anhand unterschiedlicher Kriterien einteilen. Generell werden stimulierende, inhibierende und neutrale Autoantikörper unterschieden (32). Handelt es sich bei dem Zielantigen um ein Rezeptor- oder Transporterprotein, so kann die Antikörperbindung auch potenziell zu einer allosterischen Hemmung führen. Entsprechend ihres Epitops können aAb weiterhin nach ihren Zielstrukturen und der Bindungsaffinität unterteilt werden. Während sich bei Kollagenosen hauptsächlich gegen intrazelluläre Strukturen gerichtete ANA nachweisen lassen, richten sich beispielsweise bei Morbus Basedow stimulierende Antikörper gegen einen (membranständigen) GPCR, den Thyreotropinrezeptor (TSH-R).

Es mehrt sich jedoch die Evidenz, dass sich im humanen Serum ein Spektrum von aAb ohne zwingend pathologischer Relevanz befindet. In der Normalbevölkerung zeigen je nach Studie und Referenzbereich 5 bis 30% der Menschen erhöhte ANA-Titer, wohin gegen die Anzahl der rheumatologischen Erkrankungen dahinter zurückbleibt (9). Es ist somit anzumerken, dass die Bestimmung gewisser Antikörper in Patient:innenseren nur bei entsprechendem Verdacht zur verwertbaren Spezifität und Aussagekraft führt. Wie die Übersichtsarbeit von Meyer et al. 2018 zeigte, wurden bereits diverse Anti-GPCR-Antikörper in Autoimmun- und Nicht-Autoimmunerkrankungen nachgewiesen (33). Auch im Hinblick auf Anti-GPCR-aAb deuten neuste Erkenntnisse darauf hin, dass es natürliche, individuelle aAb Signaturen gibt, welche neben Prädispositionen für bestimmte Erkrankungen u.a. Rückschlüsse auf die Immunfunktion zulassen (34).

Neben den antinukleären Antikörpern wurde jüngst das Vorhandensein von Anti-GPCR-Antikörpern als Faktor der Pathogenese der SSc ins Spiel gebracht. Riemekasten et al. 2011 wiesen in einer Kohorte von SSc Patient:innen mittels Sandwich-ELISA hohe Prävalenzen von Antikörpern gegen den Angiotensin II Type 1 Receptor (AT1R) und den Endothelin-1 Type A Receptor (ETAR) nach. Das Auftreten von AT1R-aAb und ETAR-aAb war mit schwereren Manifestationen und einer höheren Mortalität bei Individuen mit SSc assoziiert (35). Das Vorkommen der SSc-assoziierten PAH ist neben einer Reihe von spezifischen ANA auch mit der Prävalenz von AT1R-aAb und ETAR-aAb assoziiert. Ein weiterer Hinweis für die autoimmune Genese der Kollagenosen-assoziierten PAH ist das klinische Ansprechen auf aggressive immunsuppressive Therapien (14).

## **1.6 Zielsetzung der Arbeit**

In dem Wissen, dass der S1P-Signalweg eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der PAH und Autoantikörper einen entscheidenden Faktor in der Pathogenese der SSc darstellen, stellten wir die Hypothese auf, dass die Prävalenz spezifischer Autoantikörper gegen S1PR1–3 bei SSc-assoziiierter PAH höher als in der Normalbevölkerung ist. Um eine Messung und Charakterisierung der S1PR-aAb zu ermöglichen, wurden neue in vitro Fusionsprotein-Assays etabliert. Mittels der neuen Assays wurden im zweiten Schritt Serumproben einer Patientenkohorte mit SSc ± PAH (n=158) mit einer gesunden Kontrollkohorte (n=333) als auch mit einer Kohorte von Patient:innen mit autoimmunen und kardiovaskulären Erkrankungen (n=116) im Hinblick auf S1PR-aAb Prävalenzen verglichen.



**Abbildung 1: Hypothese – Rolle von S1PR-aAb bei PAH / SSc**

Vereinfachte Darstellung einer Endothelzelle/PASMC und potenzieller Auswirkungen einer Stimulation des S1P-Signalweges bei Gesunden (hellblau unterlegt) sowie bei Patient:innen mit PAH/SSc (gelb unterlegt). Hier postuliert: Interaktion von spezifischen aAb mit S1PR und S1P bei SSc/PAH, welche über intrazelluläre Second Messenger und subsequeute Transkription intranukleärer Zielgene zur vermehrten Proliferation, Vasokonstriktion und zum Gefäßwandumbau im Bereich der Pulmonalarterien führen könnte. Bildlicher Vergleich des physiologischen Gefäßdurchschnittes linksseitig, rechts präkapilläre Gefäßverengung mit Hypertrophie von Media und Adventitia bei PAH durch mögliche S1PR-Überstimulation. (eigene Abbildung, bislang unpubliziert)

## 2 Materialien und Methodik

### 2.1 Humansenen von Patient:innen mit SSc ± PAH, kardiovaskulären und auto-immunen Erkrankungen sowie gesunden Kontrollen

Diese explorative Studie wurde gemäß der Deklaration von Helsinki nach informierter Zustimmung der Patient:innen und den gesunden Kontrollproband:innen durchgeführt. Der Studie wurde durch ein Ethikvotum der Charité, Universitätsmedizin Berlin (30.10.2017, EA1/178/17) sowie der Universität Köln (#04-037) stattgegeben. Für die Studie wurden venöse Blutproben von Patient:innen mit SSc im Zeitraum von 2004 bis 2019 in der Rheumatologie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein sowie der Klinik für Rheumatologie der Charité Berlin entnommen und bei -80°C bis zur späteren Analytik aufbewahrt. Einschlusskriterien für die Querschnittskohorte waren die Diagnosekriterien gemäß der ACR/EULAR Leitlinie von 2015 für SSc (17). Es wurden insgesamt 158 Patient:innen eingeschlossen. Bei den SSc Patient:innen mit klinischem Verdacht auf PAH wurde zur Diagnosesicherung eine Rechtsherzkatheteruntersuchung durchgeführt. Gemäß des World Symposium on Pulmonary Artery Hypertension wurde bei mittlerem pulmonal-arteriellen Druck (mPAP)  $\geq 20$  mmHg in Ruhe, pulmonal-vaskulärer Resistenz  $\geq 3$  Wood Units sowie einem postkapillären Wedge-Druck  $\leq 15$  mmHg die Diagnose einer PAH gestellt (36). Etwa ein Drittel (n=58) litt zum Einschlusszeitpunkt an der Komplikation einer PAH. Eine kommerziell-erworbene Kohorte (in.vent Diagnostica GmbH, Henningsdorf) von 303 Proband:innen, welche angaben, gesund zu sein sowie weitere 30 Serumproben gesunder Spender:innen aus der Rheumatologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein dienten als Vergleichsgruppe. Jede Serumprobe ist genau einer Person zuzuordnen – es wurden im Verlauf keine weiteren Serumproben mehr eingeschlossen. Eine weitere Kohorte („Graz Cohort“) wurde ebenfalls für Analysen herangezogen (EK-Nr. 23-408 ex10/11). Hierbei handelte es sich um Serumproben von Patient:innen mit idiopathischer PAH (IPAH, n=32), PAH bei Kollagenose (CTD-PAH, n=16), Kollagenoseerkrankungen ohne PH (CTD w/o PH, n=43) und Patient:innen mit Rechtsherzschwäche ohne PH (RHC w/o PH, n=25) nebst gesunden Kontrollen (HC, n=18). Die laborchemischen Analysen erfolgten verblindet für jegliche klinische Charakterisierung. In **Tabelle 1** sind die anthropometrischen Charakteristika der Kohorten dargestellt.

**Tabelle 1: Charakterisierung der Studienkohorten**

	Rheumatologie, Universitäts- klinik Lübeck und Charité Ber- lin		In.vent Diag- nostica	Graz Cohort	
Diagnose	Systemische Sklerose n=158	Gesunde Kontrollen n=30	Gesunde Kontrollen n=303	Autoimmune / kardiovaskuläre Erkrankung n=116	Gesunde Kontrollen n=18
<b>Geschlecht</b>					
Weiblich, n (%)	116 (73,9 %)	19 (63,3 %)	171 (56,4 %)	87 (77,7 %)	9 (50 %)
Männlich, n (%)	41 (26,1 %)	11 (36,7 %)	132 (43,6 %)	25 (23,3 %)	9 (50 %)
<b>Alter</b> , Median (Spanne) [Jahre]	63 (26–84)	52 (22–59)	32 (19–63)	64 (84–19)	45 (28–63)
<b>BMI</b> , Median (Spanne) [kg/m <sup>2</sup> ]	24 (16–48)	-	-	25,7 (15–45,9)	-
<b>Krankheitsdauer</b> , Median (Spanne) [Mo- nate]	84 (0–588)	-	-	-	-

(modifiziert nach Gluschke et al, 2022)

## 2.2 Chemikalien

**Tabelle 2: Chemikalien**

Bezeichnung	Hersteller
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific
Geneticin (G418)	Sigma-Aldrich
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
KOH	Roth
Luciferin	Synchem
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	Merck
Milchpulver	Roth
Na-Azid	Merck
NaCl	Roth
NaOH	Thermo Fisher Scientific
PBS	Gibco

POROS (Toyopearl AF-rProtein A650F 45µm)	ASKA
TRIS-HCl	Roth
Triton X 100	Roth
POROS (Toyopearl AF-rProtein A650F 45µm)	ASKA

**Tabelle 3: Puffer**

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
Waschpuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 10 % Glycerol, 0,5 % Triton-X-100 in dH <sub>2</sub> O	IEE-Charité*
Luciferase-Substrat	1,5 mM Luciferin Lösung, 1,5 mM ATP, 7,5 mM DTT in Luciferase-Puffer pH 7,8	IEE-Charité*
Reaktionspuffer	5 % Milchpulver, 5 % Glukose, 0,5 % Triton-X100, 0,005 % NaN <sub>3</sub> in Waschpuffer	IEE-Charité*
Serumpuffer	50 % Glycerol, 100 mM NaCl, 50 mM TrisHCl, 0,01 % NaN <sub>3</sub> in dH <sub>2</sub> O	IEE-Charité*
Rezeptorpuffer	50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10% Glycerol, 0.01 % NaN <sub>3</sub> in dH <sub>2</sub> O	IEE-Charité*
BSA	Bovine Serum Albumin	Roth
DMEM/F12	siehe Herstellerangaben	Thermo Fisher Scientific

\*erstellt nach internen SOP-Vorgaben. (eigene Abbildung, bislang unpubliziert)

## 2.3 Geräte

**Tabelle 4: Geräte**

Bezeichnung	Hersteller	Modell
Zentrifuge für 96-Well-Platten	Eppendorf	5810R
Zentrifuge für Falcons	Heraeus	Megafuge 1.0R
Dispenser, 5 ml für Schottflasche	Roth	Rotilabo® II-Dispenser #HAC7.1

Multi tube Luminometer	Berthold	Automat Plus LB953
Plattenschüttler	Heidolph	Titramax 1000
Schüttler	Serono diagnostics	Vibrax
Vacuumpumpe	Neuberger	KNF laboport

(eigene Abbildung, bislang unpubliziert)

## 2.4 Design von S1PR-Luciferase-Fusionsproteine

Die offenen Leseraster der DNS-Sequenzen für S1PR1–3 wurden C-terminal mit einer Firefly-Luciferase (Luc) fusioniert (S1PR-Luc), wobei die DNS-Leseraster für die S1PR durch einen kommerziellen Hersteller synthetisiert wurden (Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland). Die Stopcodone wurden jeweils am Übergang zu der Luciferase-Sequenz durch ein Sensecodon ausgetauscht. Jede Rezeptor-Sequenz enthielt entsprechende Restriktionsschnittstellen, um mittels Restriktionsverdau und Ligation in die eukaryotischen Plasmide pSP-Luc+NF (Promega GmbH, Walldorf, Deutschland) eingebracht zu werden. Die Expressionskassetten wurden zu Verifikationszwecken vor der Nutzung extern sequenziert (Promega GmbH, Walldorf, Deutschland). Die resultierenden Rezeptor-Luciferase-Fusionsproteine dienten nachfolgend als potenzielle Epitope für Autoantikörper der Humansenen. Der physiologisch extrazellulär lokalisierte N-Terminus der Rezeptoren wurde nicht weiter modifiziert und stellte somit ebenfalls eine potenzielle Bindungsstelle für Antikörper dar.

## 2.5 Expression von S1PR-Luc in HEK-Zellen

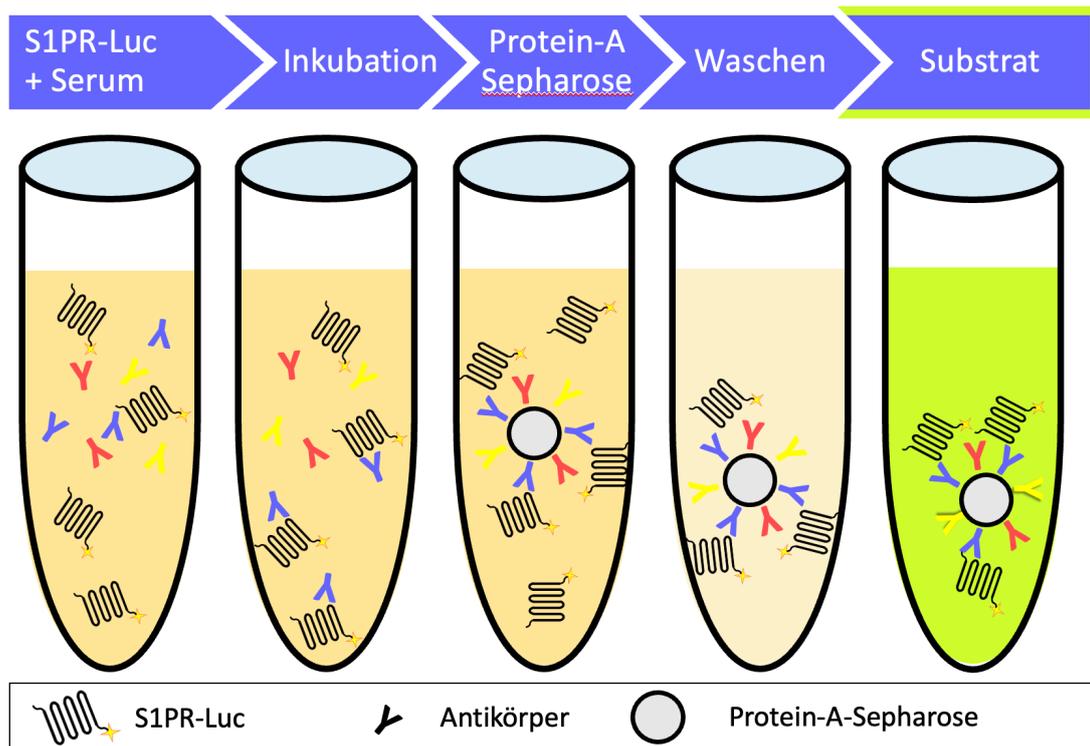
Human Embryonic Kidney Cells (HEK 293) wurden mit den Expressionsvektoren für S1PR-Luc transfiziert und in DMEM/F12 mit 10 % (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS) und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin kultiviert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden mittels G418 transfizierte Klone selektiert. Einzelne stabile Zellklone wurden nach Wachstumskriterien und Luciferase-Aktivität ausgewählt und unter Zugabe von Medium versetzt mit 0,2 mg/mL G418 (Selektion der transfizierten Zellen mit G418-Resistenz) zum Zwecke der Proteinproduktion weiter expandiert.

## 2.6 Gewinnung von Zellextrakten

Die transfizierten HEK 293 Zellen wurden in 165 cm<sup>2</sup> Zellkulturplatten expandiert und bei einer Konfluenz  $\geq 80\%$  geerntet. Die Zellen wurden mittels eines Zellschabers vorsichtig von der Zellkulturplatte abgelöst und samt Medium in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde für 10 min bei 1000 g und 4 ° zentrifugiert und die Zellpellets wurden zweimal mit gekühltem PBS gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und das Zellpellet wurde in Rezeptorpuffer resuspendiert. Es erfolgte die Zugabe von Triton-X100, sodass eine finale Konzentration von 1% (v/v) erreicht wurde. Nach vorsichtigem Durchmischen und einer erneuten Zentrifugation (15 min, 4000 g, 4 °C) wurde bei dem Überstand die Luciferase-Aktivität bestimmt. Dazu wurden 5 µL Zellextrakt zu 100 µL Luciferase-Substrat hinzugegeben und es erfolgte die direkte Messung der Luciferase-Aktivität für 5 s im Luminometer. Die Zellextrakte wurden einheitliche auf eine Signalstärke von  $1 \times 10^6$  relative light Units (RLU) verdünnt und die Aliquots wurden bis zur Nutzung bei -80 °C gelagert.

## 2.7 Immunopräzipitation von S1PR-aAb-Komplexen in Humanseren

Für den quantitativen Nachweis von Antikörpern, welche sich spezifisch gegen S1PR1–3 richteten, wurde jeweils Zellextrakt samt der enthaltenen rekombinanten Fusionsproteine (S1PR1–3-Luc) in Reaktionspuffer so verdünnt, dass bei Testung auf Luciferase-Aktivität eine Signalstärke von  $2\text{--}4 \times 10^5$  RLU erreicht wurde. Für die S1PR-Antikörperbestimmung wurden jeweils 40 µL verdünnten Zellextrakts bei 4°C für 24 Stunden mit 10 µL verdünnter humaner Serumprobe 1:1 (v/v) in Serumpuffer inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 40 µL von Protein-A-Sepharose verdünnt 1:5 (v/v) in Reaktionspuffer. Die Proben wurden für 1 h auf einem Schüttler gemischt, um adäquate Bindungen der Protein-A-Sepharose an die Antikörper zu gewährleisten. Für die Immunopräzipitation wurden die Proben anschließend zentrifugiert (2 min, 1000 g, 4°C) und mit 200 µL Waschpuffer fünf Mal gewaschen, um die nicht über Antikörper an Protein-A gebundenen S1PR-Luc-Fusionsproteine zu entfernen. Nach dem letzten Waschvorgang wurden die präzipitierten Pellets in Reaktionspuffer resuspendiert. Die Messung der Luciferase-Aktivität erfolgte direkt nach Injektion von 200 µL Luciferase-Substrat. Signalstärke jeder einzelnen Probe wurde in RLU ausgegeben und genutzt, um spezifische Binding Indices (BI) für jeden Messdurchgang als Faktor der Signalstärke über dem Hintergrundsignal jeder Messreihe zu bestimmen. Wir verweisen bei dieser Methodik zur Bestimmung und Auswertung der Signale in derartigen Antikörperassays auf vorangegangenen Publikationen unserer Laborgruppe (37-40).



**Abbildung 2: Immunopräzipitation von S1PR-aAb.**

Humanseren wurden über 24 h bei Raumtemperatur mit S1PR-Luc-enthaltendem Zellextrakt inkubiert. Anschließend wurde jeder Probe Protein-A Sepharose hinzugegeben. Inkubation über 1 h auf dem Schüttler. Nach 5 Waschdurchläufen mit jeweiliger Abzentrifugation der Protein-A-Antikörper-Komplexe erfolgte unmittelbar nach Zugabe von Luciferase-Substrat die Lumineszenzmessung via Luminometer. (eigene Abbildung, bislang unpubliziert)

## 2.8 Kommerzielle S1PR1–3 Antikörper zur internen Assay-Validierung

Zur internen Validierung unserer Assays wurden kommerziell verfügbare Antikörper gegen die S1PR1–3 erworben (**Tabelle 5**). Für den S1PR1 wurde ein monoklonaler Mausantikörper der Immunglobulin (Ig) Klasse G2B verwendet. Als Positivkontrolle für den S1PR2 diente ein monoklonaler Mausantikörper der IgG1-Klasse. Polyklonale unkonjugierte Anti-S1PR3-Antikörper aus Mäusen ermöglichten im S1PR3-Assay den Konzeptnachweis.

**Tabelle 5: Kommerzielle S1PR1–3 Ab**

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
Human S1P1 Antibody	Monoclonal Mouse IgG2B Clone#218713	R&D Systems

Human S1P2 Antibody	Monoclonal Mouse IgG1 Clone#638510	R&D Systems
Human S1PR3	Polyclonal Mouse	Max Pab

(eigene Abbildung, bislang unpubliziert)

## 2.9 Statistische Auswertung

Unter der Annahme, dass weniger als 50 % aller Proben positiv für S1PR-aAb getestet würden, bestimmten wir das durchschnittliche Signal [RLU] der unteren 50 % aller Proben jeder Messreihe. Diesen Durchschnittswert definierten wir als Binding Index (BI) = 1,0. Um für vergleichbare Bedingungen zwischen den Platten und Messungen der Immuno-präzipitation zu sorgen, dividierten wir alle Signale einer Messreihe durch den errechneten BI, um spezifische BI zu erhalten, die sich als Faktor über dem Hintergrundsignal darstellten. Zur Festlegung eines Grenzwertes für S1PR-aAb-positive Proben verwendeten wir ein statistisches Ausreißer-Kriterium. Hierfür addierten wir auf das Signal der 75. Perzentile jeweils die 1,5fache Interquartile Range ( $P75 + 1,5 \times IQR$ ). Alle statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism v8.4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) durchgeführt. Mittels D'Agostino-Pearson Test, Shapiro-Wilk Test, und Komolgorov-Smirnov Test wurden die Gruppen im Hinblick auf S1PR-aAb-Positivität sowie die klinischen Parameter auf Normalverteilung untersucht, wobei alle Subgruppen eine nichtparametrische Verteilung aufwiesen.

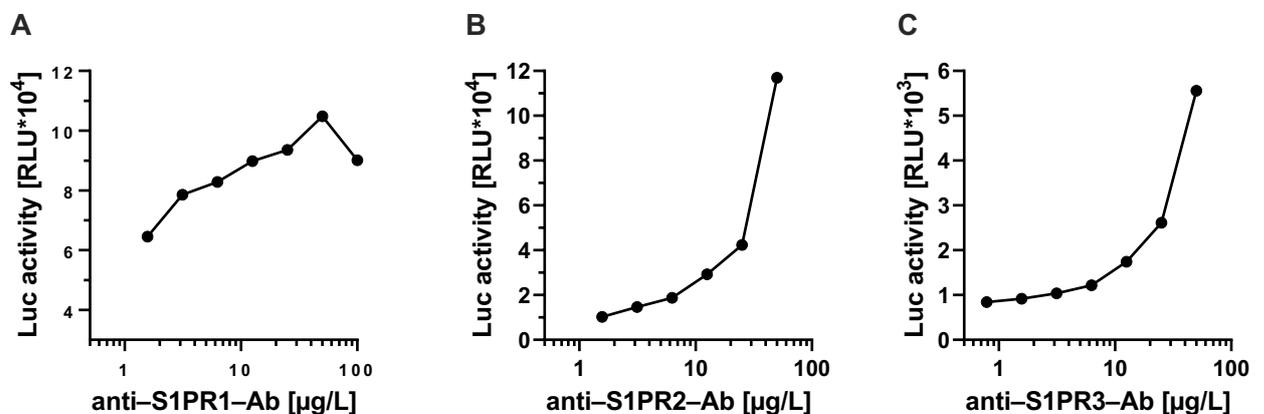
Das Signifikanzniveau setzten wir in unseren Analysen auf  $p < 0,05$ ; wobei unserer Auswertungen explorativer Natur waren und wir das Signifikanzniveau nicht für multiples Testen anpassten. Gruppenvergleiche kontinuierlicher klinischer Variablen wurden mit zweiseitigen Mann-Whitney Tests auf signifikante Unterschiede untersucht. Binäre Variablen wurden je nach Hypothese (erwartete Differenz, explorative Analyse) mit ein- oder zweiseitigem Chi-Quadrat Test auf relevante Differenzen zwischen den Gruppen analysiert.

### 3 Ergebnisse

Die im Folgenden dargelegten Ergebnisse dieser medizinischen Doktorarbeit wurden bereits zum Großteil in der Publikation von Gluschke et al. beschrieben (41).

#### 3.1 Quantitative Assays zu Detektion von S1PR-aAb

Stabil-transfizierte HEK293-Zell-Klone wurde für die Expression von S1PR1-, S1PR2- und S1PR3-Luc genutzt. Diese rekombinanten Proteine wurden in unseren Assays zur Ausfällung spezifischer aAb mittels des Immunglobulin-bindenden Protein-A in Humanseren verwendet. Diese aAb wurden anschließend indirekt über das Signal des Reporterenzyms Luciferase quantifiziert. Um die Spezifität der Nachweismethode zu überprüfen, wurden kommerzielle Ab gegen S1PR1–3 in dem Assay getestet und dienen als Positivkontrollen. Repetitive Messungen der Positivkontrollen ergaben durchweg stabile Signale mit intra-Assay Varianzkoeffizienten von 14,3 % für den S1PR1-, 6,6 % für den S1PR2- und 5,3 % für den S1PR3-Assay. Schrittweise Verdünnungskurven konnten die Abhängigkeit der Signalstärke von der Antikörperkonzentration zeigen (**Abbildung 2**).



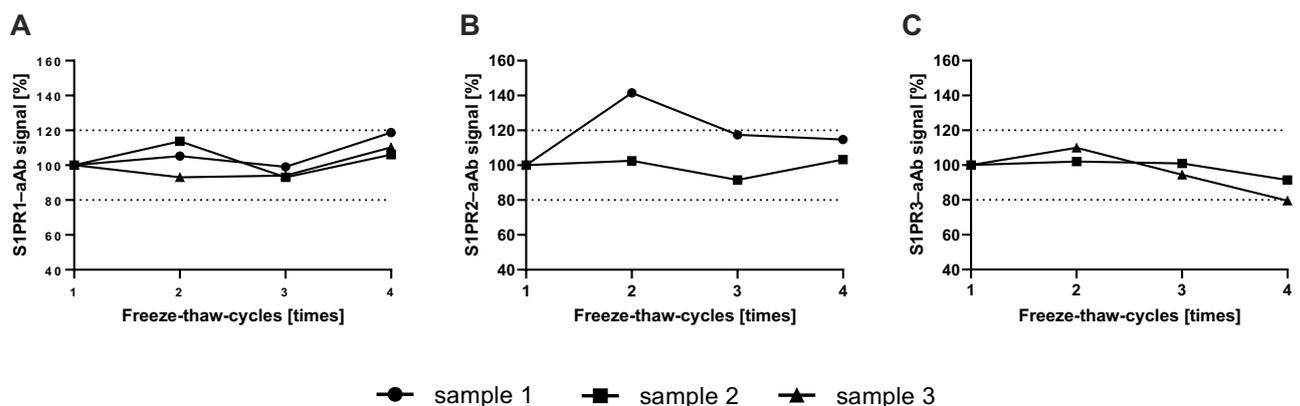
**Abbildung 3: Verdünnung von kommerziellen S1PR-Antikörpern.**

Dargestellt sind die Verdünnungsreihen von kommerziell erworbener S1PR-Antikörpern in den jeweiligen Immunopräzipitations-Assay. Hierfür wurden je 40 µL der jeweiligen S1PR-Luc-Suspension mit dem Antikörper als auch Humanseren als Kontrollen über 24 h inkubiert, um anschließend die Luciferase-Aktivität zu messen. In **Abb. 3A** zeigt sich ein annähernd linearer Signalabfall bei Verdünnung des monoklonalen Anti-S1PR1-Antikörper, wohingegen der monoklonale Anti-S1PR2-Antikörper (**Abb. 3B**) als auch der polyklonale Anti-S1PR3-Antikörper (**Abb. 3C**) einen exponentiellen Signalabfall bei Verdünnung zeigte. Die Signale der Kontrollen waren stets um ein Vielfaches unterhalb denen der S1PR-Antikörper. Die Analyse der kommerziellen Antikörper in den

jeweils anderen rezeptorspezifischen Assays zeigte eine rezeptorspezifische Bindung der Antikörper. (aus Gluschke et al., 2022)

### 3.2 Signalstabilität nach multiplen Einfrier- und Auftauzyklen der Humanseren

Um ein Signalabfall aufgrund von wiederholtem Einfrieren und Auftauen der Serumproben auszuschließen, analysierten wir je Assay zwei bis drei als S1PR-aAb-positiv getestete Serumproben nach je ein bis vier Einfrier- und Auftauzyklen in den entsprechenden Assays. Das Einfrieren erfolgte auf Trockeneis und anschließender Lagerung bei einer Temperatur von  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Der Tauprozess fand bei Raumtemperatur ( $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) bis zur vollständigen Verflüssigung statt. Die Lumineszenz-Signale in den Immunpräzipitationsassays blieben nach den Einfrier- und Auftauzyklen relativ konstant; die Signalwerte differierten bis auf einen Messwert im S1PR2-Assay nicht mehr als  $\pm 20\%$  des Ausgangswertes, welcher hierbei das Signal nach dem ersten Auftauen darstellte. Somit bestätigten diese multiplen Frier- und Tauzyklen die Stabilität der aAb in den humanen Serumproben und unterstreichen die Eignung der neuen Assays.

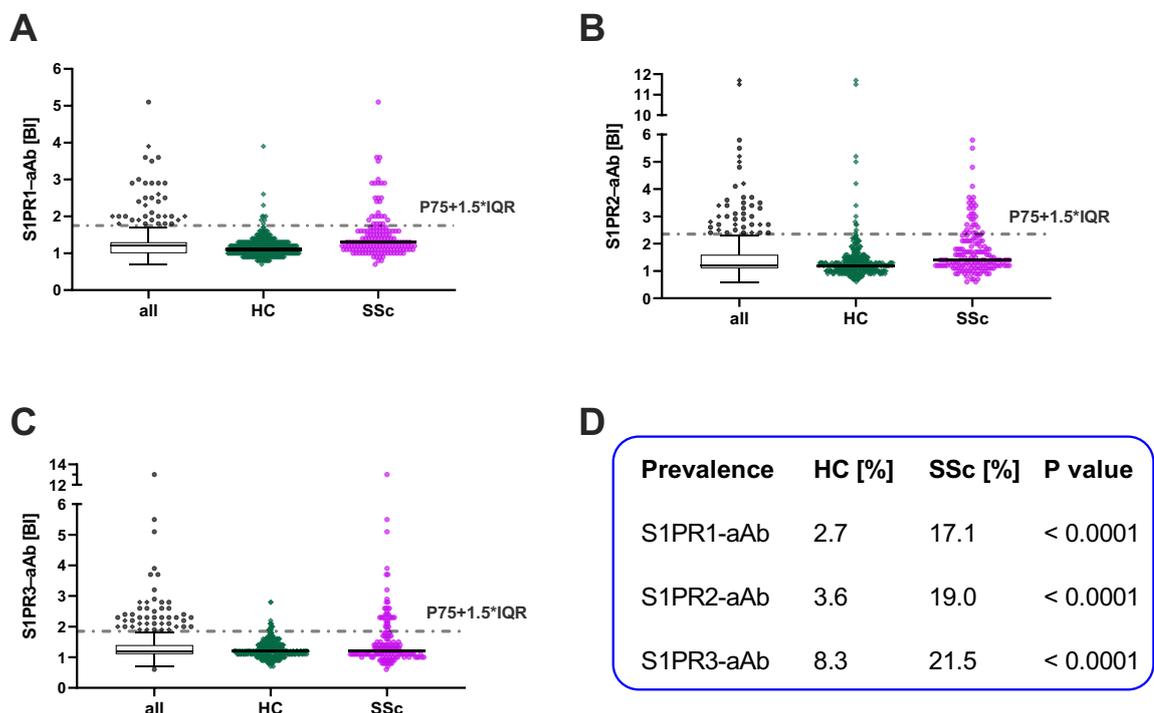


**Abbildung 4: Signalstabilität der Serumproben nach multiplen Einfrier-Auftau-Zyklen.**

Serumproben wurde nach 1-4 Einfrier-Auftau-Zyklen in den jeweiligen Immunpräzipitations-Assays gemessen. In den Abbildungen ist auf der y-Achse die Signalstärke im Verhältnis zum Ausgangswert (=1 Frier-Tau-Zyklus) aufgetragen. Die Abweichungen im S1PR1-Assay (**Abb. 4A**) betragen  $\pm 20\%$ , während im S1PR2-Assay (**Abb. 4B**) aus Ermangelung an Probevolumen nur 2 als S1PR2-aAb-positiv getestete Humanseren analysiert werden konnten und ein Wert um  $40\%$  vom Ausgangswert abwich. Im S1PR3-Assay (**Abb. 4C**) betragen die Abweichung wiederum ebenfalls weniger als  $\pm 20\%$ . (aus Gluschke et al., 2022)

### 3.3 Prävalenzen von S1PR-aAb bei SSc Patienten und gesunden Kontrollen

Eine Querschnittskohorte von SSc Patient:innen (n = 158) sowie ein gesundes Kontrollkollektiv (n = 333) wurden konsekutiv mit unseren neu-etablierten, Rezeptor-spezifischen Assays auf S1PR-aAb untersucht. Die Signale [RLU] wurden anschließend so umgerechnet, dass sie den Faktor des Hintergrundsignals darstellten (BI = 1,0). Die Schwellenwerte, ab denen wir eine Serumprobe als aAb-positiv definierten, ergaben sich aus der Anwendung von statistischen Ausreißer-Kriterien ( $P75 + 1,5 * IQR$ ) und sind in **Abb. 5** als gestrichelte Linie abgebildet. Bei Anwendung dieser Schwellenwerte zeigte sich für S1PR-aAb eine Positivrate von 17,1 % im SSc-Kollektiv versus 2,7 % in der Kontrollgruppe (**Abb. 5A**). Vergleichbare Prävalenzen zeigten sich bei der Analyse auf S1PR2-aAb. Hier waren 19 % der SSc Patient:innenproben positiv und 3,6 % der gesunden Kontrollen (**Abb. 5B**). Für S1PR3-aAb zeigte sich in der SSc Gruppe eine Prävalenz von 21,5 % aller analysierten Proben, wobei 8,3 % der Kontrollseren den mathematischen Schwellenwert überschritten (**Abb. 5C**). Alle Gruppenunterschiede waren statistisch signifikant ( $p$ -Werte < 0,0001). In **Abb. 5D** findet sich eine Gegenüberstellung der Prävalenzen inklusive der  $p$ -Werte.

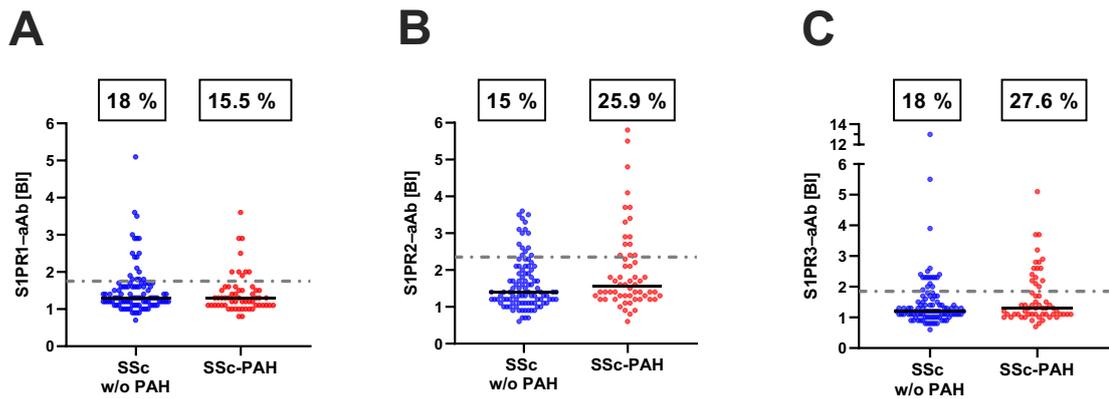


**Abbildung 5: Vergleich von S1PR-aAb Prävalenzen bei SSc und gesunden Kontrollen (HC).**

Serumproben von gesunden Probanden und SSc Patient:innen wurden in Immunopräzipitations-S1PR-aAb-Assays auf receptorspezifische Antikörper untersucht und verglichen. Die spezifischen Schwellenwerte ( $P75+1,5 \cdot IQR$ ) der Assays sind durch eine gestrichelte Linie dargestellt. Die schwarze Linie markiert den Median. Gesunde Kontrollen sind als grüne, SSc Signale als magentafarbene Punkte aufgetragen. Ein Graph mit allen Messwerten ist für jedes Assay links in schwarz als Boxplot ( $P25-P75$ , Whiskers  $P75/P25 \pm 1,5 \cdot IQR$ ) abgebildet. Die Prävalenzen für Antikörper gegen S1PR1 (**Abb. 5A**), S1PR2 (**Abb. 5B**) und S1PR3 (**Abb. 5C**) waren in der SSc Kohorte im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht, wie es in **Abb. 5D** tabellarisch illustriert ist. Ein statistischer Vergleich wurde mittels zweiseitigem Chi-Quadrat-Test angestellt,  $p$ -Werte  $< 0,0001$ . (aus Gluschke et al., 2022)

### 3.4 Prävalenz von S1PR-aAb bei SSc $\pm$ PAH

In der Annahme, dass aAb gegen S1PR1–3 eine Rolle in der Pathogenese der PAH spielen, unterteilten wir die Gruppe der SSc Patient:innen in eine Subgruppe mit der Manifestation einer PAH (SSc-PAH,  $n = 58$ ) und eine ohne (SSc w/o PAH,  $n = 100$ ). Für S1PR1-aAb zeigten sich vergleichbare Prävalenzen in SSc-PAH (18 %) und SSc w/o PAH (15,5 %) (**Abb. 6A**). Im Gegensatz dazu zeigten sich signifikante Unterschiede ( $p$ -Wert = 0,0467) bei den Prävalenzen von S1PR2-aAb. Hier waren 25,9 % der SSc-PAH Subjekte positiv. Nur 15,5 % der SSc w/o PAH überschritten den Schwellenwert für S1PR2-aAb (**Abb. 6B**). Auch bei den S1PR3-aAb zeigte sich ein deutlicher Unterschied – hier waren 27,6 % der SSc-PAH Proben positiv versus 18 % bei SSc w/o PAH. Die Gruppendifferenz erreichte hier keine statistische Signifikanz ( $p$ -Wert = 0,1133, **Abb. 6C**).



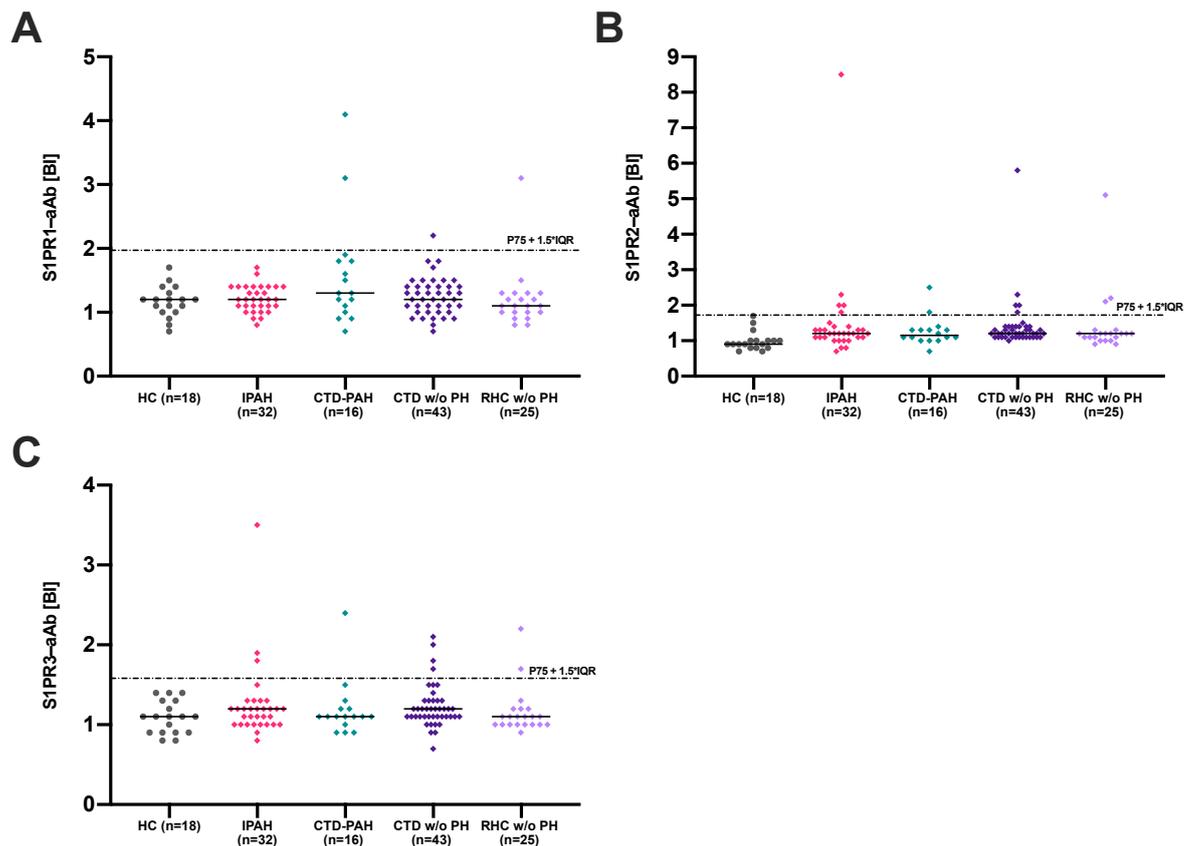
**Abbildung 6: S1PR-aAb Prävalenzen bei SSc ± PAH.**

In dieser Darstellung wurde die SSc-Kohorte nach der Komplikation PAH (SSc-PAH, SSc w/o PAH) unterteilt. SSc w/o PAH dargestellt als blaue, SSc-PAH als rote Punktwolke. In **Abb. 6A** sind die Prävalenzen für S1PR1-aAb dargestellt, welche sich nicht signifikant unterscheiden. Eine deutliche Differenz zeigt sich im S1PR2-aAb-Assay (**Abb. 6B**), hier waren 25,9 % der SSc-PAH Proben positiv versus 15 % der SSc w/o PAH (p-Wert 0,0467). 27,6 % der Proben mit SSc-PAH zeigten sich für S1PR3-aAb positiv (**Abb. 6C**), auch wenn die Differenz zu SSc w/o PAH (18 %) nicht statistisch signifikant war (p-Wert 0,1133). Gruppenvergleiche wurden mittels 2-seitigem Chi-Quadrat Test berechnet. (aus Gluschke et al., 2022)

### 3.5 Prävalenz von S1PR-aAb bei autoimmunen und kardiovaskulären Erkrankungen

In einer weiteren Analyse wurde die Graz Cohort aus Patient:innenseren unterschiedlicher Krankheitsentitäten im Zusammenhang mit und als Abgrenzung zu PH auf die Prävalenz von S1PR-aAb untersucht. Die Analyse erfolgte verblindet gegen gesunde Kontrollen. In **Abb. 7** sind die Prävalenzen nach Erkrankungsgruppen aufgeschlüsselt. In **Abb. 7A** ist an den Punktwolken zu erkennen, dass zwei Proben der Kollagenose Patient:innen mit PAH (CTD-PAH) auf S1PR1-aAb positiv gescreent wurden (2/16, 12,5 %). Eine weitere Probe ließ sich den Kollagenosen ohne PH zuordnen (1/43, 2,3 %) und eine den Patient:innen mit Rechtsherzschwäche ohne PH (RHC w/o PH, 1/25, 4 %). Bei den gesunden zeigten sich keine S1PR1-aAb-positiven Seren. Wie in **Abb. 7B** visualisiert, zeigten sich für S1PR2-aAb vergleichbare Prävalenzen bei IPAH (5/32, 15,6 %), CTD-PAH mit 2/16 (12,5 %), CTD w/o PH (5/43, 11,6 %) und RHC w/o PH (3/25, 12 %). Lediglich eine Probe der gesunden Kontrollen wurde positiv auf S1PR2-aAb gescreent

(1/18, 5,6 %). Niedrigere Prävalenzen zeigten sich im S1PR3-aAb-Assay (**Abb. 7C**). In diesem wurden 3 der 32 IDAH Proben positiv getestet (9,4 %). Ähnliche Prävalenzen zeigten sich bei den anderen Krankheitsentitäten (CTD w/o PH 4/43, 9,3 %; RHC w/o PH 2/25, 8 %; CTD-PAH 1/16, 6,3 %). Bei den gesunden Kontrollen zeigten sich keine positiven Proben. Aufgrund der kleinen Gruppengrößen verzichteten wir auf statistische Gruppenvergleiche.



### Abbildung 7: S1PR-aAb bei autoimmunen und kardiovaskulären Erkrankungen

In dieser Darstellung sind die Messwerte der Grazer Cohort aus den S1PR-Assays nach den Erkrankungsgruppen unterteilt. Die spezifischen Schwellenwerte (P75+1,5\*IQR) der Assays sind durch eine gestrichelte Linie dargestellt. Auf der y-Achse sind die BI in den spezifischen Assays aufgetragen. Die schwarzen Linien markieren je Punktwolke den Median. Jeder Punkt entspricht dem Messwert einer Serumprobe. Von links nach rechts: Gesunde Kontrollen (HC) in grau, idiopathische PAH (IPAHA) in rot, Kollagenosen-assoziierte PAH (CTD-PAH) in grün, Kollagenosen ohne PH (CTD w/o PH) in lila und Rechtsherzinsuffizienz ohne PH (RHC w/o PH) in rosa. Für S1PR1-aAb zeigte sich eine Häufung bei CTD-PAH (**Abb. 7A**), wohingegen im Hinblick auf S1PR2-aAb höhere Prävalenzen bei IPAHA (16,6 %) und CTD-PAH (12,5 %) auffielen (**Abb. 7B**). Im S1PR3-aAb-Assay zeigten sich bei IPAHA (9,4 %) und CTD w/o PAH (9,3 %) die meisten positiven Proben (**Abb. 7C**). (eigene Abbildung, bislang unpubliziert)

### 3.6 Kreuzreaktivität der aAb mit anderen S1PR

Proben, welche in einem der Assays als S1PR-aAb-positiv getestet wurden, zeigten teilweise auch in den anderen Assays hohe Signale. Acht Proben überschritten in allen drei Assays (S1PR1–3-aAb) den Grenzwert für Positivität. Hiervon waren drei Proben von SSc-PAH Patient:innen, zwei SSc w/o PAH, eine aus der Kontrollkohorte, eine mit CTD-PAH und eine mit RHC w/o PH. Darüber hinaus waren weitere zwei Proben von SSc Patient:innen positiv für S1PR1-aAb und S1PR2-aAb und eine aus der Gruppe CTD-PAH. Vier weitere Proben waren zugleich S1PR1- und S1PR3-aAb-positiv. Insgesamt 21 andere Proben zeigten simultan S1PR2-aAb und S1PR3-aAb. Die kommerziellen mono- (Anti-S1PR1 und Anti-S1PR2) und polyklonalen (Anti-S1PR3) Antikörper zeigten lediglich in den korrespondierenden Assays hohe Signalintensitäten.

### 3.7 S1PR-aAb im Hinblick auf klinische Charakteristika

Die Kohorte der SSc Patient:innen wurde auf klinische Unterschiede in Relation zum S1PR-aAb-Status untersucht. In der Übersichtstabelle (**Tabelle 6**) sind die klinischen Charakteristika (Zeilen) je nach S1PR-aAb-Status (Spalten) dargestellt. Hinsichtlich der kutanen Manifestationsformen der SSc zeigt sich eine deutliche Häufung der limitierten Form (85,2 %) bei Patient:innen, welche S1PR1-aAb-positiv gescreent wurden. In der gesamten SSc Kohorte lag der Anteil der limitierten Form hingegen bei 58 %. In den S1PR2- und S1PR3-aAb-positiven Gruppen zeigte sich keine ausgeprägte Tendenz zu einer kutanen Manifestationsform. Neben der erhöhten Prävalenz von S1PR2- und S1PR3-aAb bei SSc-PAH zeigte sich auch die Lungenfibrose im Verhältnis zu den aAb-negativen Patient:innen gehäuft (S1PR2-aAb-positiv: 60,7 % versus 45,3 %; S1PR3-aAb-positiv 71,9 % vs. 41,9 %). Bei Betrachtung SSc typischer ANA sahen wir bis auf eine Häufung von Anti-Centromer-Ab (CENP-B-Ab) bei Nachweis von S1PR1-aAb keine statistischen oder augenscheinlichen Zusammenhänge.

**Tabelle 6: Charakterisierung der SSc-Kohorte im Hinblick auf S1PR-aAb**

	SSc n=158	S1PR1-aAb		S1PR2-aAb		S1PR3-aAb	
		positiv* n=27 (17,1 %)	negativ n=131 (82,9 %)	positiv* n=30 (19 %)	negativ n=128 (81 %)	positiv* n=34 (21,5%)	negativ n=124 (78,5 %)
<b>Hautmanifestationen</b>							
Limitiert, n (%)	91 (58 %)	23 (85,2 %)	77 (59,2 %)	14 (48,3 %)	77 (60,2 %)	13 (39,4 %)	78 (62,9 %)
Diffus, n (%)	59 (38 %)	4 (14,8 %)	45 (34,6 %)	14 (48,3 %)	45 (35,2 %)	19 (57,6 %)	40 (32,3 %)
Sine scleroderma, n (%)	7 (4 %)	0 (0 %)	6 (4,6 %)	1 (3,4 %)	6 (4,7 %)	1 (3,0 %)	6 (4,8 %)
mRSS, Median (Spanne)	6 (0–39)	4 (0–24)	6 (0–39)	5 (0–27)	6 (0–39)	5 (0–27)	6 (0–39)
<b>Pulmonale &amp; kardiale Beteiligung</b>							
NTproBNP [ng/L], Median (Spanne)	206 (5–19066)	296 (46–4884)	196 (5–19066)	135 (5–19066)	235 (29–14414)	135 (5–4884)	242 (29–19066)
PAH, n (%)	58 (37 %)	9 (33,3 %)	49 (37,4 %)	15 (50 %)	43 (33,6 %)	16 (47,1 %)	42 (33,9 %)
Lungenfibrose, n (%)	75 (48 %)	11 (40,7 %)	64 (49,6 %)	17 (60,7 %)	58 (45,3 %)	23 (71,9 %)	52 (41,9 %)
<b>Autoantikörper**</b>							
Anti-topoisomerase-1 (Scl70) Ab, n (%)	50 (33 %)	4 (15,4 %)	46 (36,2 %)	11 (39,3 %)	39 (31,2 %)	16 (48,5 %)	34 (28,3 %)
Anti-RNA-Pol-III Ab (ARA), n (%)	13 (8 %)	2 (7,4 %)	11 (8,7 %)	2 (7,4 %)	11 (8,7 %)	4 (12,5 %)	9 (7,4 %)
anti-centromere- CENP-B Ab, n (%)	63 (41,4 %)	21 (75 %)	42 (33,6 %)	11 (40,7 %)	52 (41,6 %)	9 (29,0 %)	54 (44,6 %)
Anti-citrullinated- peptide Ab, n (%)***	30 (54,5 %)	6 (66,7 %)	24 (52,2 %)	10 (71,4 %)	20 (48,8 %)	8 (53,3 %)	22 (55 %)

Fehlende Werte wurden von der Kalkulation exkludiert; mRSS: modified Rodnan-Skin-Score, \* P75+1.5xIQR, \*\* Alle Proben waren ANA positiv, \*\*\* positiv:  $\geq 7$  U/ml

(aus Gluschke et al., 2022)

## 4 Diskussion

Mit dieser Arbeit beschreiben wir erstmalig den Aufbau und die Durchführung von *in vitro* Assays zur Quantifizierung von aAb in humanen Serumproben, welche die S1PR1–3 als Zielstrukturen haben. Die Assays dienen in erster Linie der Prävalenzbestimmung jener Autoantikörper in epidemiologischen Studien. Die Qualität zeigte sich durch die zuverlässige und spezifische Erkennung von kommerziell-erhältlichen Antikörpern in den jeweiligen S1PR-aAb-Assays. Die Abhängigkeit der Signalintensität von der Antikörperkonzentration konnte eindrücklich durch Verdünnungsreihen gezeigt werden. Mittels Einfrier- und Auftauzyklen, denen die Serumproben unterworfen wurden, demonstrierten wir in unseren Assays die Signalstabilität und damit die Eignung gefrorener Humanproben für die quantitative Analyse dieser neuen Assays.

Die neuen Screening-Assays zum Nachweis von S1PR-aAb aus kleinen Aliquots von Humansenen stellen somit eine schnelle, kostengünstige und tierfreie Methode mit Potenzial zu hohem Durchsatz dar und eignen sich zum Screening großer Kohorten. Wir demonstrierten in dieser Arbeit die Reproduzierbarkeit, Signalstabilität und Spezifität der Messwerte der neuen Methodik. Unsere Assays zeigten Rezeptor-spezifische Signale durch kommerzielle Antikörper gegen S1PR1–3, welche auch in folgenden Studien als Positivkontrollen dienen können. Zu den Stärken unserer Studie zählt das Assay-Design für den Nachweis von S1P-aAb, da wir die Rezeptoren in voller Länge für die Antikörperbindung nutzten. Die Expression jener Rezeptoren in humanen HEK293-Zellen ermöglichte selbst posttranslationale Modifikationen, sodass wir von korrekt gefalteten, alle physiologischen Epitope-abdeckenden S1PR als Autoantigenproteine ausgehen (42, 43).

Mithilfe dieser Assays konnten wir experimentell zeigen, dass sich in einer SSc Kohorte ( $n = 158$ ) im Vergleich zur Kontrollkohorte ( $n = 333$ ) signifikant höhere Prävalenzen von Autoantikörpern gegen die Rezeptoren S1PR1–3 nachweisen ließen. Weiterhin konnten wir zeigen, dass es auch bei anderen PH-Formen und Kollagenosen erhöhte Prävalenzen von S1PR-aAb in Patient:innenseren gibt. Auch in der Subgruppe von Patient:innen mit Rechtsherzinsuffizienz ( $n = 25$ ) wurde ein kleiner Teil positiv für aAb gegen S1PR2–3 gescreent. Aus den Untersuchungen lässt sich ableiten, dass Patient:innen mit kardiovaskulären- und autoimmunen Erkrankungen eine Häufung von S1PR-aAb im Serum aufweisen. Bei systemischen Autoimmunerkrankungen wie Kollagenosen, welche durch

eine andauernde, überschießende und systemische Aktivierung des Immunsystems gekennzeichnet sind, ist die erhöhte Prävalenz von Autoantikörpern naheliegend (44). In anderen Studien konnten bei kardiovaskulären Erkrankungen bereits aAb gerichtet gegen GPCR nachgewiesen werden (45). Eine Alteration des S1P-Signalweges durch Anti-GPCR-Autoantikörper bei kardiovaskulären Erkrankungen ist somit denkbar.

Die Hypothese dieser Studie wurde verifiziert, da besonders bei SSc-PAH erhöhte Prävalenzen von S1PR-aAb nachgewiesen werden konnten. Darüber hinaus wurden überdurchschnittlich häufig S1PR2-aAb und S1PR3-aAb bei SSc-PAH nachgewiesen, so ist das Auftreten im Verhältnis zu SSc w/o PAH statistisch nicht signifikant, im Vergleich mit gesunden Kontrollen jedoch schon. Das Vorhandensein von S1PR2- und S1PR3-aAb korrelierte außerdem mit der Manifestation einer Lungenfibrose in der SSc-Kohorte, welche bei mehr als der Hälfte der SSc-PAH Patient:innen zum Erfassungszeitpunkt auch diagnostiziert war.

In dem Wissen, dass S1P-Stimulation der Rezeptoren S1PR2 und S1PR3 in glatten Muskelzellen zur Vasokonstriktion und subsequent zum vaskulären Remodellierung führen kann, scheint eine Beeinflussung des Signalwegs durch Autoantikörper bei einer Subgruppe von Patient:innen, welche an SSc-PAH leiden, möglich (18, 26). Zudem konnte die S1PR2-Stimulation in PASMC, isolierten und perfundierten Mäuselungen wie auch in *in vivo* Mausmodellen von chronisch hypoxischer PH als Trigger für pulmonale Vasokonstriktion identifiziert werden (46, 47). Die medikamentöse Inhibition des S1PR2 hingegen verhinderte die Entstehung von chronisch-hypoxischer PH im Mausmodell (10). Außerdem ist hervorzuheben, dass im Mausmodell gezeigt werden konnte, dass die Aktivierung des S1PR3 auch an der Entstehung von Strahlungs- und Bleomycin-induzierter Lungenfibrose beteiligt ist (48, 49). In einer weiteren Studie konnte ein Zusammenhang von Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) und einem potenzierten Signaling via SphK1 und S1PR3 gezeigt werden – zwei Signalwege, welche bei der Entwicklung von PAH diskutiert werden (50). Der S1PR1-Agonismus auf Endothelzellebene würde hingegen über die Aktivierung der eNOS zu einer Vasodilatation führen (26).

Unter der Annahme, dass es sich bei den nachgewiesenen S1PR2-aAb und S1PR3-aAb um stimulierende Antikörper handelt, könnte dies die deutlich höhere Prävalenz bei PAH und Lungenfibrose durch pulmonalarterielle Vasokonstriktion, eine gesteigerte Proliferation von PASMC und einen daraus folgenden Umbau des Lungengewebes und der Pulmonalarterien, erklären.

Unsere Ergebnisse zeigten außerdem, dass es gemäß unserer Vermutung signifikant höhere Prävalenzen für S1PR-aAb im Kollektiv der SSc gibt. Bei dieser seltenen Autoimmunerkrankung konnten bereits in der Vergangenheit (Auto)Antikörper gegen verschiedene GPCR nachgewiesen werden. So waren Antikörper gegen den AT1R sowie gegen den ETAR mit einem schwereren Verlauf der SSc assoziiert und konnten die SSc-abhängige Mortalität prognostizieren (35). Bei SSc ist eine Überstimulation der S1PR1–3 Signalwege denkbar, da die Krankheitsentstehung unter anderem durch Bindegewebsvermehrung der Haut, Fibrosierung innerer Organe und vaskuläre Dysfunktion charakterisiert ist (51). Stimulierende Eigenschaften von aAb gegen S1PR2 und S1PR3 könnten hier pathophysiologisch zur Migration von Fibroblasten beitragen, Vaskulopathien fördern und proinflammatorisch wirken. Es ist außerdem möglich, dass gegen S1PR1 gerichtete Antikörper zur Dysfunktion des Immunsystems in SSc beitragen. Eine weitere Erklärung für die erhöhten Prävalenzen jener Antikörper bei SSc wären nicht-funktionelle S1PR-aAb. Bis dato wurden den meisten beschriebenen aAb bei SSc keine kausalen, pathophysiologischen Eigenschaften zugesprochen, sie korrelierten lediglich mit unterschiedlichen Manifestationsformen, der Mortalität oder dem Auftreten von Komplikationen (9).

Über den Nachweis von funktionellen S1PR-aAb findet sich in der Literatur aktuell nur ein Fallbericht. Hierbei handelte es sich um den Nachweis von agonistischen S1PR1-aAb bei einem Patienten. Das Epitop der spezifischen S1PR1-aAb lag extrazellulär im Bereich des Amino-Terminus. Der im Fallbericht beschriebene Patient hatte eine Lymphopenie und litt unter rezidivierenden Infektionen. Die isolierten Immunglobuline des Patienten führten im Mausmodell zur Immunsuppression, reduzierter Chemotaxis von T-Zellen und Lymphozyten Trapping in Lymphknoten (52). Solche Ausprägungen wurden bei Patient:innen unserer Kohorte(n) nicht dezidiert erfasst.

Dass in unserer Studie vereinzelte Serumproben in mehr als einem S1PR-aAb-Assay positiv gescreent wurden, kann einerseits durch die strukturellen Ähnlichkeiten der S1PR-Subtypen begründet sein, andererseits sind polyklonale Antikörper mit Reaktivität gegen unterschiedliche Epitope der S1PR1–3 ebenfalls denkbar. Beispielsweise haben S1PR-Modulatoren wie Fingolimod auch eine hohe Affinität für mehrere S1PR-Subtypen (53).

In unserer explorativen Analyse beschrieben wir die Detektion von aAb gegen S1PR1 – und erstmalig Antikörper gegen S1PR2 und S1PR3 in einer großen Kohorte von SSc Patient:innen als auch bei gesunden Proband:innen. Das Screening der Kohorte der SSc Patient:innen mit der doppelten Anzahl an Kontrollproben ermöglichte eine zuverlässige

Definition des Schwellenwerts für positive Autoimmunität, einen belastbaren Fall-Kontroll-Vergleich sowie eine Analyse der Subgruppe von Patient:innen mit SSc-PAH. Auch wenn sich signifikant erhöhte Prävalenzen bei SSc und im Speziellen bei SSc-PAH und/oder SSc-Lungenfibrose nachweisen ließen, würden aAb gegen S1PR2 und -3 bei niedriger Sensitivität- und Spezifität einen Biomarker mit nur geringer Aussagekraft darstellen. Als Diagnostikum für PAH oder Lungenfibrose innerhalb der SSc Kohorte wäre der Nachweis von S1PR-aAb bei fehlender statistischer Signifikanz erst recht nicht geeignet.

Zu den Limitationen unserer Studie zählt, dass wir nach dem Screening keine Isolation der Immunoglobuline und damit keine weitere funktionale Charakterisierung der Antikörper vornehmen konnten. Dies war unter anderem durch die geringen Probenvolumina nicht möglich. Es bedarf weiterer Studien zur strukturellen und funktionellen Charakterisierung der S1PR-aAb. Je nach spezifischem Epitop kann sich der Effekt der Antikörperbindung theoretisch gravierend unterscheiden. So können die Antikörper agonistische, antagonistische, modulatorische oder auch einen neutralen Effekt auf die Rezeptoren haben (48). Wie wir es bei pharmakologischer S1PR-Modulation sehen, kann die Bindung von Agonisten oder Antagonisten außerdem *in vivo* zur Desensitivierung über die sekundäre Internalisierung und Rezeptordegradation führen und dementsprechend gegenteilige Effekte bewirken (21, 54). Darüber hinaus ist es eine enorme Herausforderung, von den *in vitro* Eigenschaften der Antikörper auf deren Wirkung *in vivo* zu schließen. Hierbei spielen u.a. die Antikörperklasse, die post-translationale Modifikation (Glykosylierung) sowie das individuelle Immunsystem eine Rolle (55). Auch die Affinität der Antikörper zu ihren korrespondierenden GPCR ist von funktioneller Bedeutung (56).

Ferner wählten wir in unserer Studie statistische Ausreißerkriterien, nach welchen wir Serumproben in S1PR-aAb-positiv und -negativ unterschieden. Ohne biologische Funktionsanalyse bleibt es ungewiss, ob und ab welchem Antikörpertiter von pathophysiologischen Auswirkungen auszugehen ist.

Ein theoretischer Ansatz, um die zellulären Auswirkungen der S1PR-aAb zu untersuchen könnte darin bestehen, die Antikörper aus der Protein-A-Sepharose aufzureinigen und auf humane Endothelzellen zu bringen. In einem nächsten Schritt könnten zur Quantifizierung der intrazellulären Reaktion nach Exposition cAMP-Spiegel oder die ERK1/2 Phosphorylierung gemessen werden.

Aufgrund der in unseren Assays verwendeten gelösten Form der S1PR1–3 ist die Antikörperbindung an Epitope, die physiologischerweise durch die Zellmembran verdeckt wären oder intrazellulär liegen würden, nicht sicher auszuschließen (57). Wohingegen bei zellbasierten Antikörper-Nachweismethoden wie der Immunfluoreszenz nur physiologisch extrazelluläre Rezeptordomänen den Antikörpern zugänglich sind. Bei dem „klassischen“ ELISA hingegen dienen nur kleine Peptide stellvertretend als Antigene für Rezeptoren und bilden nur einen Bruchteil der möglichen Epitope ab.

Eine weitere methodische Einschränkung stellt die verwendete Protein-A-Sepharose dar, da durch diese herstellergemäß nur humane IgG-Subklassen unter Aussparung von IgG3 gebunden werden (58). Bei den meisten antikörperassoziierten Autoimmunerkrankungen sind IgG vorherrschend, IgG3 scheint in manchen Erkrankungen jedoch eine herausragende Rolle zu spielen (59, 60).

Es ist anzumerken, dass es sich bei dieser Arbeit um eine nicht randomisierte Fall-Kontroll-Studie handelt; die Gruppen wurden nicht normiert, Alter und Geschlecht von Erkrankten und Kontrollen differierten in den Gruppen stark. Da die Kontrollkohorte kommerziell erworben wurde, fehlt es in dieser an detaillierten klinischen Daten.

Die explorative Natur dieser Studie weist mögliche Korrelationen aus – Kausalitäten verlangen hingegen nach einem anderen Studiendesign. Um kausale Interpretationen zu ermöglichen, wäre eine longitudinale, randomisierte Studie mit lückenloser klinischer Charakterisierung von Nöten.

Die Ergebnisse der dieser Studie, welche erstmalig eine Korrelation von aAb gegen S1PR1–3 und dem Auftreten von SSc und PAH beschreiben, reihen sich ein in eine Vielzahl wissenschaftlicher Studien, welche dem Verständnis der Pathogenese und damit neuen Therapieansätzen der PAH auf den Grund gehen.

## 5 Schlussfolgerungen

Wir konnten mit dieser Arbeit eine neue Methode zur Quantifizierung von S1PR-aAb aufzeigen. Durch das Screening einer SSc- und Kontrollkohorte konnte der erste systematische Nachweis von serologischen Autoantikörpern gegen S1PR1–3 erbracht werden. Im Vergleich zu gesunden Kontrollen zeigte sich eine deutlich erhöhte Prävalenz der Antikörper bei SSc, insbesondere bei pulmonalen Manifestationen der SSc. Weiterhin zeigte sich eine Häufung von S1PR-aAb bei autoimmun- und kardiovaskulären Erkrankungen. Eine Typisierung der Antikörper gemäß ihrer biologischen Wirkung wäre perspektivisch wünschenswert und um die genaue klinische Relevanz von S1P-aAb bei PAH und SSc besser zu erfassen, sind weitere Studien an großen Kohorten unabdingbar.

## Literaturverzeichnis

1. Hoeper MM, Humbert M, Souza R, Idrees M, Kawut SM, Sliwa-Hahnle K, Jing ZC, Gibbs JS. A global view of pulmonary hypertension. *Lancet Respir Med*. 2016;4(4):306-22.
2. Galiè N, Humbert M, Vachiery J-L, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Vonk Noordegraaf A, Beghetti M, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Hansmann G, Klepetko W, Lancellotti P, Matucci M, McDonagh T, Pierard LA, Trindade PT, Zompatori M, Hoeper M. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. 2015;46(4):903-75.
3. Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Krishna Kumar R, Landzberg M, Machado RF, Olschewski H, Robbins IM, Souza R. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62(25 Suppl):D34-41.
4. Peacock AJ, Murphy NF, McMurray JJ, Caballero L, Stewart S. An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2007;30(1):104-9.
5. Galiè N, Channick RN, Frantz RP, Grünig E, Jing ZC, Moiseeva O, Preston IR, Pulido T, Safdar Z, Tamura Y, McLaughlin VV. Risk stratification and medical therapy of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2019;53(1).
6. Hassoun PM. Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med*. 2021;385(25):2361-76.
7. Joshi-Barr S, Haberland A, Bartel S, Muller J, Choi T, Wallukat G. High throughput bioassay for beta1-adrenoceptor autoantibody detection. *International journal of cardiology*. 2016;219:98-104.
8. Gorelova A, Berman M, Al Ghouleh I. Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Pulmonary Arterial Hypertension. *Antioxid Redox Signal*. 2021;34(12):891-914.
9. Didier K, Bolko L, Giusti D, Toquet S, Robbins A, Antonicelli F, Servettaz A. Autoantibodies Associated With Connective Tissue Diseases: What Meaning for Clinicians? *Frontiers in immunology*. 2018;9:541.
10. Chen J, Tang H, Sysol JR, Moreno-Vinasco L, Shioura KM, Chen T, Gorshkova I, Wang L, Huang LS, Usatyuk PV, Sammani S, Zhou G, Raj JU, Garcia JG, Berdyshev E, Yuan JX, Natarajan V, Machado RF. The sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate pathway in pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2014;190(9):1032-43.

11. Gairhe S, Joshi SR, Bastola MM, McLendon JM, Oka M, Fagan KA, McMurtry IF. Sphingosine-1-phosphate is involved in the occlusive arteriopathy of pulmonary arterial hypertension. *Pulmonary circulation*. 2016;6(3):369-80.
12. Bossini-Castillo L, López-Isac E, Mayes MD, Martín J. Genetics of systemic sclerosis. *Seminars in Immunopathology*. 2015;37(5):443-51.
13. Allanore Y, Simms R, Distler O, Trojanowska M, Pope J, Denton CP, Varga J. Systemic sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15002.
14. Chaisson NF, Hassoun PM. Systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension. *Chest*. 2013;144(4):1346-56.
15. Kolstad KD, Li S, Steen V, Chung L. Long-Term Outcomes in Systemic Sclerosis-Associated Pulmonary Arterial Hypertension From the Pulmonary Hypertension Assessment and Recognition of Outcomes in Scleroderma Registry (PHAROS). *Chest*. 2018;154(4):862-71.
16. Shah AA, Wigley FM, Hummers LK. Telangiectases in scleroderma: a potential clinical marker of pulmonary arterial hypertension. *J Rheumatol*. 2010;37(1):98-104.
17. Johnson SR. New ACR EULAR guidelines for systemic sclerosis classification. *Curr Rheumatol Rep*. 2015;17(5):32.
18. Proia RL, Hla T. Emerging biology of sphingosine-1-phosphate: its role in pathogenesis and therapy. *J Clin Invest*. 2015;125(4):1379-87.
19. Li C, Liu P, Song R, Zhang Y, Lei S, Wu S. Immune cells and autoantibodies in pulmonary arterial hypertension. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2017;49(12):1047-57.
20. Cartier A, Hla T. Sphingosine 1-phosphate: Lipid signaling in pathology and therapy. *Science*. 2019;366(6463).
21. Pérez-Jeldres T, Alvarez-Lobos M, Rivera-Nieves J. Targeting Sphingosine-1-Phosphate Signaling in Immune-Mediated Diseases: Beyond Multiple Sclerosis. *Drugs*. 2021;81(9):985-1002.
22. Spiegel S, Milstien S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(5):397-407.
23. Takabe K, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S. "Inside-out" signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. *Pharmacol Rev*. 2008;60(2):181-95.

24. Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL, Cyster JG. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature*. 2004;427(6972):355-60.
25. Cantalupo A, Gargiulo A, Dautaj E, Liu C, Zhang Y, Hla T, Di Lorenzo A. S1PR1 (Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1) Signaling Regulates Blood Flow and Pressure. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2017;70(2):426-34.
26. Waeber C, Blondeau N, Salomone S. Vascular sphingosine-1-phosphate S1P1 and S1P3 receptors. *Drug News Perspect*. 2004;17(6):365-82.
27. Li F, Wang J, Zhu Y, Liu L, Feng W, Shi W, Wang Q, Zhang Q, Chai L, Li M. SphK1/S1P Mediates PDGF-Induced Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cell Proliferation via miR-21/BMPRII/Id1 Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem*. 2018;51(1):487-500.
28. Zhao YD, Chu L, Lin K, Granton E, Yin L, Peng J, Hsin M, Wu L, Yu A, Waddell T, Keshavjee S, Granton J, de Perrot M. A Biochemical Approach to Understand the Pathogenesis of Advanced Pulmonary Arterial Hypertension: Metabolomic Profiles of Arginine, Sphingosine-1-Phosphate, and Heme of Human Lung. *PloS one*. 2015;10(8):e0134958.
29. Tokumura A, Carbone LD, Yoshioka Y, Morishige J, Kikuchi M, Postlethwaite A, Watsky MA. Elevated serum levels of arachidonoyl-lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate in systemic sclerosis. *International journal of medical sciences*. 2009;6(4):168-76.
30. Burg N, Salmon JE, Hla T. Sphingosine 1-phosphate receptor-targeted therapeutics in rheumatic diseases. *Nature reviews Rheumatology*. 2022;18(6):335-51.
31. Kano M, Kobayashi T, Date M, Tennichi M, Hamaguchi Y, Strasser DS, Takehara K, Matsushita T. Attenuation of murine sclerodermatous models by the selective S1P(1) receptor modulator cenerimod. *Scientific reports*. 2019;9(1):658.
32. Kapingidza AB, Kowal K, Chruszcz M. Antigen-Antibody Complexes. *Subcell Biochem*. 2020;94:465-97.
33. Meyer C, Heidecke H. Antibodies Against GPCR. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2018;23(11):2177-94.
34. Cabral-Marques O, Marques A, Giil LM, De Vito R, Rademacher J, Gunther J, Lange T, Humrich JY, Klapa S, Schinke S, Schimke LF, Marschner G, Pitann S, Adler S, Dechend R, Muller DN, Braicu I, Sehoul J, Schulze-Forster K, Trippel T, Scheibenbogen C, Staff A, Mertens PR, Lobel M, Mastroianni J, Plattfaut C, Gieseler F, Dragun D, Engelhardt BE, Fernandez-Cabezudo MJ, Ochs HD, Al-Ramadi BK, Lamprecht P, Mueller A, Heidecke H, Riemekasten G. GPCR-specific autoantibody

signatures are associated with physiological and pathological immune homeostasis. *Nat Commun.* 2018;9(1):5224.

35. Riemekasten G, Philippe A, Näther M, Slowinski T, Müller DN, Heidecke H, Matucci-Cerinic M, Czirják L, Lukitsch I, Becker M, Kill A, van Laar JM, Catar R, Luft FC, Burmester GR, Hegner B, Dragun D. Involvement of functional autoantibodies against vascular receptors in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(3):530-6.
36. Simonneau G, Montani D, Celermajer DS, Denton CP, Gatzoulis MA, Krowka M, Williams PG, Souza R. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal.* 2019;53(1):1801913.
37. Eleftheriadou AM, Mehl S, Renko K, Kasim RH, Schaefer JA, Minich WB, Schomburg L. Re-visiting autoimmunity to sodium-iodide symporter and pendrin in thyroid disease. *Eur J Endocrinol.* 2020;183(6):571-80.
38. Minich WB, Dehina N, Welsink T, Schwiebert C, Morgenthaler NG, Kohrle J, Eckstein A, Schomburg L. Autoantibodies to the IGF1 receptor in Graves' orbitopathy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2013;98(2):752-60.
39. Sattler L-M, Schniewind HA, Minich WB, Haudum CW, Niklowitz P, Münzker J, Kovács GL, Reinehr T, Obermayer-Pietsch B, Schomburg L. Natural autoantibodies to the gonadotropin-releasing hormone receptor in polycystic ovarian syndrome. *PloS one.* 2021;16(4):e0249639.
40. Schniewind HA, Sattler LM, Haudum CW, Münzker J, Minich WB, Obermayer-Pietsch B, Schomburg L. Autoimmunity to the Follicle-Stimulating Hormone Receptor (FSHR) and Luteinizing Hormone Receptor (LHR) in Polycystic Ovarian Syndrome. *International journal of molecular sciences.* 2021;22(24).
41. Gluschke H, Siegert E, Minich WB, Hackler J, Riemekasten G, Kuebler WM, Simmons S, Schomburg L. Autoimmunity to Sphingosine-1-Phosphate-Receptors in Systemic Sclerosis and Pulmonary Arterial Hypertension. *Frontiers in immunology.* 2022;13:935787.
42. Ju MS, Jung ST. Antigen Design for Successful Isolation of Highly Challenging Therapeutic Anti-GPCR Antibodies. *International journal of molecular sciences.* 2020;21(21).
43. Corin K, Baaske P, Ravel DB, Song J, Brown E, Wang X, Geissler S, Wienken CJ, Jerabek-Willemsen M, Duhr S, Braun D, Zhang S. A robust and rapid method of producing soluble, stable, and functional G-protein coupled receptors. *PloS one.* 2011;6(10):e23036.
44. Pisetsky DS. Pathogenesis of autoimmune disease. *Nat Rev Nephrol.* 2023;19(8):509-24.

45. Wallukat G, Schimke I. Agonistic autoantibodies directed against G-protein-coupled receptors and their relationship to cardiovascular diseases. *Semin Immunopathol.* 2014;36(3):351-63.
46. Tabeling C, Yu H, Wang L, Ranke H, Goldenberg NM, Zabini D, Noe E, Krauszman A, Gutbier B, Yin J, Schaefer M, Arenz C, Hocke AC, Suttorp N, Proia RL, Witzernath M, Kuebler WM. CFTR and sphingolipids mediate hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(13):E1614-23.
47. Grimmer B, Kuebler WM. The endothelium in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Appl Physiol (1985).* 2017;123(6):1635-46.
48. Ludwig RJ, Vanhoorelbeke K, Leyboldt F, Kaya Z, Bieber K, McLachlan SM, Komorowski L, Luo J, Cabral-Marques O, Hammers CM, Lindstrom JM, Lamprecht P, Fischer A, Riemekasten G, Tersteeg C, Sondermann P, Rapoport B, Wandinger K-P, Probst C, El Beidaq A, Schmidt E, Verkman A, Manz RA, Nimmerjahn F. Mechanisms of Autoantibody-Induced Pathology. *Frontiers in immunology.* 2017;8.
49. Cabral-Marques O, Riemekasten G. Functional autoantibodies targeting G protein-coupled receptors in rheumatic diseases. *Nature reviews Rheumatology.* 2017;13(11):648-56.
50. Ji Y, Lisabeth EM, Neubig RR. Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 Increases Expression of Contractile Genes in Human Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells by Potentiating Sphingosine-1-Phosphate Signaling. *Molecular pharmacology.* 2021;100(2):53-60.
51. Denton CP, Khanna D. Systemic sclerosis. *The Lancet.* 2017;390(10103):1685-99.
52. Liao JJ, Huang MC, Fast K, Gundling K, Yadav M, Van Brocklyn JR, Wabl MR, Goetzl EJ. Immunosuppressive human anti-lymphocyte autoantibodies specific for the type 1 sphingosine 1-phosphate receptor. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2009;23(6):1786-96.
53. Marciniak A, Camp SM, Garcia JGN, Polt R. An update on sphingosine-1-phosphate receptor 1 modulators. *Bioorg Med Chem Lett.* 2018;28(23-24):3585-91.
54. Verstockt B, Vetrano S, Salas A, Nayeri S, Duijvestein M, Vande Casteele N. Sphingosine 1-phosphate modulation and immune cell trafficking in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2022;19(6):351-66.
55. Markina YV, Gerasimova EV, Markin AM, Glanz VY, Wu WK, Sobenin IA, Orekhov AN. Sialylated Immunoglobulins for the Treatment of Immuno-Inflammatory Diseases. *International journal of molecular sciences.* 2020;21(15).

56. Zhao Q, Chapman A, Huang Y, Ferguson M, McBride S, Kelly M, Weiner M, Li X. Ligand-Directed GPCR Antibody Discovery. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2022;2394:319-42.
57. MINICH WB, LENZNER C, MORGENTHALER NG. Antibodies to TSH-receptor in thyroid autoimmune disease interact with monoclonal antibodies whose epitopes are broadly distributed on the receptor. *Clinical and Experimental Immunology*. 2004;136(1):129-36.
58. Zarrineh M, Mashhadi IS, Farhadpour M, Ghassempour A. Mechanism of antibodies purification by protein A. *Anal Biochem*. 2020;609:113909.
59. Patel JK. The  $\beta(1)$ -Adrenergic Receptor IgG Subclass 3 Autoantibody in Dilated Cardiomyopathy: Friend or Foe? *Journal of the American College of Cardiology*. 2017;69(8):978-80.
60. Zeng Y, Zhang Y, Chen Q, Huang Q, Lin Y, Wang X, Wang JJ, Jiang L, Xiao Y. Distribution of IgG subclass anti-nuclear antibodies (ANAs) in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2021;30(6):901-12.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Hans Gluschke, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Nachweis von Autoantikörpern gegen Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren bei Systemischer Sklerose und Pulmonal-Arterieller-Hypertonie / Identification of autoantibodies against sphingosin-1-phosphate-receptors in systemic sclerosis and pulmonary artery hypertension“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

---

## Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

[**Hans Gluschke**] hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: [H. Gluschke, E. Siegert, W. B. Minich, J. Hackler, G. Riemekasten, W. M. Kuebler, et al.], [**Autoimmunity to Sphingosine-1-Phosphate-Receptors in Systemic Sclerosis and Pulmonary Arterial Hypertension**], [Frontiers Immunology], [2022], [Impact Factor 2022: 8.786]

Beitrag im Einzelnen:

Conceptualization, ES, SS, and LS; Methodology: **Hans Gluschke**, WM, and JH; Software: **Hans Gluschke** and JH; Validation, SS, GR, and WK; Formal Analysis: **Hans Gluschke**, JH, SS, and LS; Investigation: **Hans Gluschke** (all experiments), ES, WM, SS, and LS; Resources: ES, WM, GR, and LS; Data Curation: **Hans Gluschke**, JH, SS, and LS; Writing—Original Draft Preparation, **Hans Gluschke** (first draft, all figures and tables), ES, SS, and LS; Writing, Review and Editing; WM, JH, GR, and WK; Supervision, SS and LS; Project Administration, LS; Funding Acquisition, LS.

\_\_\_\_\_  
Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

\_\_\_\_\_  
Unterschrift des Doktoranden

## Druckexemplar(e) der Publikation(en)



# Autoimmunity to Sphingosine-1-Phosphate-Receptors in Systemic Sclerosis and Pulmonary Arterial Hypertension

Hans Gluschke<sup>1</sup>, Elise Siegert<sup>2,3</sup>, Waldemar B. Minich<sup>1</sup>, Julian Hackler<sup>1</sup>, Gabriela Riemekasten<sup>4</sup>, Wolfgang M. Kuebler<sup>5,6</sup>, Szandor Simmons<sup>5,6\*</sup> and Lutz Schomburg<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Institute for Experimental Endocrinology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany, <sup>2</sup> Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany, <sup>3</sup> Berlin Institute of Health at Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany, <sup>4</sup> Department of Rheumatology, University Medical Center Schleswig Holstein, Lübeck, Germany, <sup>5</sup> Institute of Physiology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany, <sup>6</sup> Deutsches Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung e.V. (DZHK) (German Centre for Cardiovascular Research), Partner Site Berlin, Berlin, Germany

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Juan Bautista De Sanctis,  
Palacký University Olomouc,  
Czechia

### Reviewed by:

Michael Rodney Mijales Tussaint,  
Central University of Venezuela,  
Venezuela  
Luis E. Munoz,  
Friedrich-Alexander-University  
Erlangen-Nürnberg (FAU), Germany

### \*Correspondence:

Szandor Simmons  
szandor.simmons@charite.de  
Lutz Schomburg  
lutz.schomburg@charite.de

### Specialty section:

This article was submitted to  
Inflammation,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

Received: 04 May 2022

Accepted: 07 June 2022

Published: 04 July 2022

### Citation:

Gluschke H, Siegert E, Minich WB, Hackler J, Riemekasten G, Kuebler WM, Simmons S and Schomburg L (2022) Autoimmunity to Sphingosine-1-Phosphate-Receptors in Systemic Sclerosis and Pulmonary Arterial Hypertension. *Front. Immunol.* 13:935787. doi: 10.3389/fimmu.2022.935787

**Context:** Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a frequent extracutaneous manifestation of systemic sclerosis (SSc). PAH is characterized by increased vasomotor tone, progressive remodeling of pulmonary arteries and arterioles, consequentially increased pulmonary vascular resistance, right heart hypertrophy, and eventually right ventricular failure. Autoimmunity against G-protein coupled receptors (GPCRs) has been implicated in the development of SSc-associated PAH. Sphingosine-1-phosphate (S1P) receptors (S1PR) present a potential, yet so far untested antigen for PAH autoimmunity, given the documented role of S1P/S1PR signaling in PAH pathogenesis.

**Objective:** We hypothesized that S1P receptors (S1PR) may constitute autoantigens in human patients, and that the prevalence of autoantibodies (aAb) to S1PR1, S1PR2 and S1PR3 is elevated in SSc patients and associated with PAH.

**Methods:** For this exploratory study, serum samples from 158 SSc patients, 58 of whom with PAH, along with 333 healthy control subjects were screened for S1PR-aAb. S1PR1-3 were expressed as fusion proteins with luciferase in human embryonic kidney cells and used to establish novel *in-vitro* assays for detecting and quantifying S1PR-aAb. The fusion proteins were incubated with serum samples, the aAb-S1PR complexes formed were precipitated by protein-A, washed and tested for luciferase activity. Commercial anti-S1PR-antibodies were used to verify specificity of the assays.

**Results:** All three assays showed dose-dependent signal intensities when tested with S1PR-subtype specific commercial antibodies. Natural aAb to each S1PR were detected in healthy controls with a prevalence of <10% each, i.e., 2.7% for S1PR1-aAb, 3.6% for S1PR2-aAb, and 8.3% for S1PR3. The respective prevalence was higher in the cohort of SSc patients without PAH, with 17.1% for S1PR1-aAb, 19.0% for S1PR2-aAb, and

21.5% for S1PR3. In the subgroup of SSC patients with PAH, prevalence of aAb to S1PR2 and S1PR3 was further elevated to 25.9% for S1PR2-aAb, and 27.6% for S1PR3. Notably, the majority of patients with positive S1PR2-aAb (60.7%) or S1PR3-aAb (71.9%) displayed interstitial lung disease.

**Conclusion:** S1PR1–3 can constitute autoantigens in humans, particularly in SSC patients with PAH. The potential pathophysiological significance for the etiology of the disease is currently unknown, but the elevated prevalence of S1PR2-aAb and S1PR3-aAb in SSC patients with PAH merits further mechanistic investigations.

**Keywords:** autoantibodies, G-protein coupled receptor, autoimmune disease, immunoglobulin, rheumatology, immunology, sphingolipid, sphingosine-1-phosphate

## INTRODUCTION

Pulmonary hypertension (PH) is characterized by a mean pulmonary arterial pressure (mPAP) of  $\geq 20$  mmHg at rest. Its clinical features may gradually progress from an initial asymptomatic course to dyspnea and orthopnea, and eventually to right heart hypertrophy, failure and death. The pathophysiology of PH is characterized by vascular remodeling, endothelial dysfunction and increased vascular tone, predominantly in small to medium-sized pulmonary arterioles (1). Precapillary pulmonary arterial hypertension (PAH) constitutes the first group in the 2018 consensus on the clinical classification of PH into five groups (2). 'PAH' is diagnosed when mPAP at rest is measured  $\geq 20$  mmHg, yet pulmonary artery wedge pressure is  $\leq 15$  mmHg and other causes of pre-capillary PH (e.g. lung disease or chronic thromboembolic pulmonary hypertension) are excluded (3). The subcategory PAH can be specified further by etiology into idiopathic, hereditary, drug- and toxin-induced forms of PAH, or PAH associated with connective tissue disease, HIV or congenital heart disease (4). While essential pathophysiological elements have been elucidated over the past decades, the etiology of PAH remains incompletely understood (5). Besides an epigenetic dysregulation, alterations in bone morphogenetic protein signaling, abnormalities in mitochondrial metabolism, and dynamic inflammatory, autoimmune processes contribute to the pathogenesis of PAH (6). Specifically, cell-based and autoantibody (aAb) related immune dysregulation have been implicated in the development of PAH, predominantly with respect to idiopathic and connective tissue disease-associated PAH (7). Antinuclear Ab (ANA) serve as diagnostic hallmark of connective tissue disease, and specific ANA are associated with an increased risk for PAH. In addition, aAb to certain G-protein coupled receptors (GPCR) such as angiotensin I-receptor or endothelin receptor-1 have recently been associated with PAH, and may promote pathological vasoconstriction and vascular remodeling by acting as agonists of the respective GPCR (8). Another line of research has recently identified signaling *via* the small bioactive lipid mediator sphingosine-1-phosphate (S1P) and its receptors (S1PR), which regulate vasoconstriction, fibrosis, and lymphocyte trafficking (9–11) as potential pathomechanism in PAH.

S1P can be generated at the inner layer of the cell membrane from its sphingolipid precursor sphingosine by sphingosine-kinase (SPHK)-1 or -2 *via* the specific S1P-transporters major facilitator superfamily domain-containing protein 2B (MFSD2B, in erythrocytes and platelets) (12), or spinster-homologue-2 (SPNS2, in blood and lymphatic endothelial cells) S1P can then be released into the extracellular space and the circulation (13, 14). Extracellular S1P can bind and activate five different human S1P-receptors (S1PR), namely S1PR1 to S1PR5, all of which belong to the superfamily of GPCR (15, 16). Besides the crucial role of S1PR1, S1PR2 and S1PR3 in the maturation, activation and chemotaxis of immune cells (11, 17), these ubiquitously expressed S1PR are also the major receptor subtypes in the cardiovascular system with high expression in pulmonary artery smooth muscle cells (PASMC) (18). Of note, S1PR1- and S1PR3-signaling plays an important role in preserving vascular functions and blood pressure homeostasis by controlling endothelial nitric oxide synthase (eNOS)-derived nitric oxide (NO) production, which underlies the anti-hypertensive effect of S1P (19). However, elevated levels of SPHK1 in PASMC result in an autocrine "inside-out" S1PR-signaling that can stimulate PASMC proliferation *via* S1PR2, which has been proposed appears upregulated in PASMC of idiopathic PAH patients (9, 15). In parallel, activation of S1PR2 (and potentially also S1PR4) in PASMC causes pulmonary vasoconstriction (20–22). In combination, the effects of S1P on pulmonary arterial endothelial and smooth muscle cells emphasize the importance of a tightly controlled S1P/S1PR-signaling in vascular homeostasis that when impaired can drive vasoconstriction, vascular remodeling, and endothelial dysfunction, which increase pulmonary vascular resistance and mPAP ultimately resulting in the development of PAH. Experimental proof-of-principle for this concept was demonstrated by the fact that genetic deficiency or pharmacological inhibition of either SPHK1 or S1PR2 effectively attenuated the development of PH in rodent models of chronic hypoxic PH (9). Further, a specific role of S1PR2 and S1PR3 has been described in fibrosis, in particular in relation to inflammation and tissue injury, leading to cell death, matrix deposition and finally end organ dysfunction (23). Due to the crucial role of S1P-signaling in homeostasis of the immune system and the endothelium, specific S1PR-modulators are

already used in autoimmune disease such as multiple sclerosis and inflammatory bowel disease and constitute a promising therapeutic option for rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus or systemic sclerosis (SSc) (24–26).

Systemic sclerosis, as one of the rheumatic diseases with the highest mortality, is also characterized by autoimmune dysregulation, endothelial dysfunction and chronic inflammation (27, 28). In more than 90% of patients, ANA are detected, constituting an important cornerstone of the diagnosis and supporting the classification of SSc as an autoimmune disease (29). Additional aAb to other members of the GPCR superfamily have recently been described in SSc by us and others (28, 30). The complication of PAH on a background of SSc (SSc-PAH) affects up to 12% of patients with SSc, constituting the major cause of death in SSc. Still, diagnostic and prognostic markers for PAH are few, therapeutic measures remain poorly effective and treatment options are limited, causing physicians to pursue symptomatic approaches rather than curative strategies (31, 32). Besides established immunosuppressive therapies, S1P modulators such as cenerimod already showed promising results in a mouse model of bleomycin-induced fibrosis (33).

In view of the ubiquitous function of S1P/S1PR1/eNOS signaling in the vasculature, the established role of S1P/S1PR2 signaling in PASMC proliferation, contraction, and the development of PH, and the specific contribution of S1PR2 and S1PR3 to disease-related extracellular matrix deposition and tissue fibrosis, we speculated that any alterations to the function of one of these three S1PR may be associated with SSc, in particular with respect to PAH development. To this end, we established as a first step novel *in vitro* assays for detection and quantification of aAb binding to S1PR1, S1PR2 or S1PR3, and compared the prevalence of these GPCR-specific aAb in serum samples from healthy controls and SSc patients with or without PAH. Our results indicate an elevated prevalence of S1PR-specific aAb in SSc, in particular for S1PR2-aAb and S1PR3-aAb in patients with SSc-PAH.

## MATERIALS AND METHODS

### Human Samples From Healthy Controls and SSc Patients

An explorative study was conducted on the prevalence of S1PR-aAb. To this end, a set of commercially available serum samples

(n=303) from subjects with a self-assessed status as 'healthy' (HC; healthy controls) served as reference (in.vent Diagnostica GmbH, Hennigsdorf, Germany). An additional set of 30 serum samples from healthy subjects were collected at the Rheumatology Department in Lübeck, Germany. Patients suffering from SSc with or without PAH were identified and enrolled into the study at the Rheumatology Department at the Charité – University Medicine Berlin, Berlin, Germany, or at the University Hospital Lübeck, Schleswig Holstein, Germany, in the time period from Nov. 2004 to Dec. 2019. The final cohort consisted of n=158 serum samples from SSc patients, n=58 of which had an additional diagnosis of PAH. Samples were stored at -80°C until transfer to the analytical laboratory in Berlin, and provided to the scientists conducting the laboratory analyses in a blinded fashion. All patients provided their written informed consent for enrollment into the study after detailed explanation of purpose, procedures (blood sampling and analysis) and right to withdraw from participation at any time point. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Ethical counselling was provided by the Charité Medical School Berlin (10/30/2017, EA1/178/17) and the Board of Ethics of the University of Cologne (#04-037). Baseline characteristics of patients and healthy controls are displayed in **Table 1**.

### Construction of the Receptor-Luciferase Fusion Proteins for Autoantibody Detection

The construction of these novel assays followed an established path, whereby the full open reading frames of the human coding sequences of the three S1PR were individually fused in frame to a luciferase (Luc) reading frame. The resulting receptor-luciferase fusion proteins served as autoantigen baits for autoantibody detection. Briefly, the open reading frames of the human S1PR1, S1PR2 and S1PR3 were synthesized by a commercial supplier (BioTeZ, Berlin-Buch GmbH, Berlin, Germany), each containing suitable restriction sites for directed insertion into a eukaryotic expression plasmid. The strategy is similar to the recently generated assays for the insulin-like growth factor receptor 1, the thyroid hormone transporters MCT8 and MCT10, the GPCR for gonadotropin-releasing hormone, luteinizing hormone or follicle-stimulating hormone or the iodide transporters sodium-iodide symporter and pendrin (34–38). The stop codons were each replaced by a sense codon in order to enable read-through. The expression

**TABLE 1** | Baseline characteristics of the study cohorts.

Diagnosis	Rheumatology Departments Univ. of Lübeck & Charité Berlin		In.vent Diagnostica
	Systemic sclerosis n=158	Healthy controls n=30	Healthy controls n=303
<b>Sex</b>			
Female, n (%)	116 (73.9%)	19 (63.3%)	171 (56.4%)
Male, n (%)	41 (26.1%)	11 (36.7%)	132 (43.6%)
<b>Age</b> , median (range) [y]	63 (26–84)	52 (22–59)	32 (19–63)
<b>BMI</b> , median (range) [kg/m <sup>2</sup> ]	24 (16–48)	–	–
<b>Disease duration</b> , median (range) [months]	84 (0–588)	–	–

Missing values were excluded from the calculation.

plasmid backbone pSP-Luc+NF was obtained from Promega (Promega GmbH, Walldorf, Germany). DNA-sequencing for verification of the correct expression cassettes was conducted by LGC Genomics (LGC Genomics GmbH, Berlin, Germany).

### Stable Expression of Fusion Proteins in Human Embryonic Kidney Cells

In order to achieve stable and reproducible expression of the fusion proteins, human embryonic kidney cells (HEK 293) were transfected with the expression vectors and cultured in DMEM/F12 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin. Two days after transfection, 0.8 mg/mL G418 (geneticin, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Germany) was added to the medium, and stable clones were selected by the criteria of robust cell growth characteristics and high luciferase activity. Selected clones were expanded and seeded on 165 cm<sup>2</sup> cell culture dishes for recombinant protein production in medium supplemented with 0.2 mg/dL G418.

### Preparation of Cell-Extracts for Autoantibody Tests

After reaching confluency of 80% or more, stable HEK293 cells expressing the fusion protein of choice were harvested with a cell scraper and collected by centrifugation (10 min, 1000 g, 4°C). Cell pellets were washed twice with pre-cooled PBS and collected again by centrifugation. The resulting pellet was resolved in collection buffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10% glycerol, 0.01% NaN<sub>3</sub> in dH<sub>2</sub>O) and subsequently lysed by adding 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich). After gentle shaking and final centrifugation (15 min, 4000 g, 4°C), the supernatants were tested for luciferase activity. The resulting cell extracts were diluted in collection buffer to achieve signal intensities of > 1\*10<sup>6</sup> relative light units (RLU) per measurement and stored in aliquots at -80°C until use.

### Quantitative Analysis of Antibodies Binding to Human S1P Receptors

For the quantitative analysis of antibodies reactive with S1P receptors, the cell extracts containing S1PR-Luc fusion proteins were diluted in reaction buffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10% glycerol, 5% milk powder, 5% glucose, 1% Triton X-100, 0.005% NaN<sub>3</sub> in dH<sub>2</sub>O) to a concentration equivalent to providing 2-4\*10<sup>5</sup> RLU per reaction (Automat Plus LB953, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). Each measurement was conducted by incubating 40 µL of diluted cell extract overnight at 4°C with 10 µL of serum sample diluted 1:1 (v/v) with serum buffer (50% glycerol, 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 0.01% NaN<sub>3</sub> in dH<sub>2</sub>O). After 24 h, an aliquot of 40 µL of protein-A sepharose (ASKA Biosciences GmbH, Berlin, Germany) diluted in reaction buffer (20% v/v) was added to capture the fusion-protein-aAb-complexes that had formed overnight. The samples were centrifuged (1000 g, 2 min, 4°C) and pellets were washed five times using 200 µL Tris-based buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 10% glycerol, 0.5% Triton X-100 in dH<sub>2</sub>O). After resuspension, luciferase activity was determined by injection of luciferase substrate, signal

intensities were measured as RLU with a luminometer (Automat Plus LB953 or Mithras LB943), and used to calculate specific binding indices (BI) as factor above background noise.

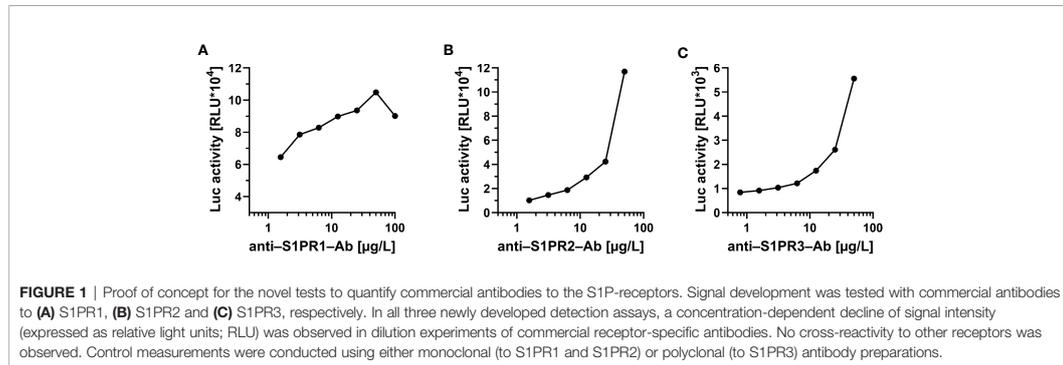
### Statistical Analysis

Under the assumption of less than 50% of positive samples in the analysis, average background noise of negative samples was determined for each experimental run in 96-well plates by calculating the mean RLU from the lower half of the obtained signals. This signal was defined as binding index one (BI = 1.0). For analytical comparison, all signals [RLU] were divided by this background signal [RLU] and expressed as BI, denoting the signal strength as times background signal. In order to determine the cut-off for S1PR-aAb-positive samples, a mathematical outlier criterion was used. To this end, a threshold was calculated representing the BI of the 75<sup>th</sup> percentile of all signals plus 1.5-times the inter quartile range (P75 + 1.5 x IQR). In this manner, a separation of aAb-positive from aAb-negative samples was achieved. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism v8.4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Intra-assay coefficients of variation were determined from repeated measurements of the same positive samples. Tests for normal distribution (D'Agostino-Pearson test, Shapiro-Wilk test, Kolmogorov-Smirnov test) showed a non-parametric distribution of S1PR-aAb-positivity and of the clinical parameters. Group comparisons of continuous clinical characteristics were analyzed for significant differences with two-sided Mann-Whitney test. Binary variables were compared with one-sided (expected direction of difference) or two-sided (explorative hypothesis) Chi Square test for statistical significance, as indicated. Significance was assumed when the p-value was below 0.05; however, the p-values may not be interpreted as confirmative as all analyses were considered exploratory and not adjusted for multiple testing.

## RESULTS

### Establishment of Quantitative Tests for Measuring Autoantibodies to the S1P Receptors

Stable HEK293 cell clones were established expressing human S1PR1-, S1PR2- and S1PR3-luciferase (S1PR1-Luc, S1PR2-Luc, S1PR3-Luc) fusion proteins, respectively. Recombinant expression of the fusion proteins to be used as bait in the aAb analyses yielded comparable luciferase activities per preparation. To verify specificity, commercial antibodies recognizing human S1PR1, S1PR2 or S1PR3 were obtained and used as positive standards. Each of the commercial antibodies produced strong signals in the respective assay. Intra-assay coefficients of variation were 14.3% for the S1PR1-, 6.6% for the S1PR2- and 5.3% for the S1PR3-assay. Stepwise dilution experiments using commercial antibodies revealed concentration-dependent signals for all three aAb assays (Figure 1).



### Stability of S1PR-aAb in Serum Samples Upon Freezing and Thawing

To ensure that freezing and thawing does not interfere with the analysis of S1PR-aAb in human serum, selected samples that had been screened positive for S1PR-aAb were tested after one to four consecutive freeze and thaw cycles. Freezing was achieved on dry ice at  $-80^{\circ}\text{C}$  and thawing by standing without agitation at room temperature until completely thawed. The signal intensities remained relatively unaffected by the repeated freezing and thawing, and final signal strength after four rounds of freezing and thawing was within 20% of the initial values determined after the first thawing in all three analytical assays (Figure 2). The results support the suitability of frozen human serum samples for assessing aAb to the S1PR by the newly generated analytical tests.

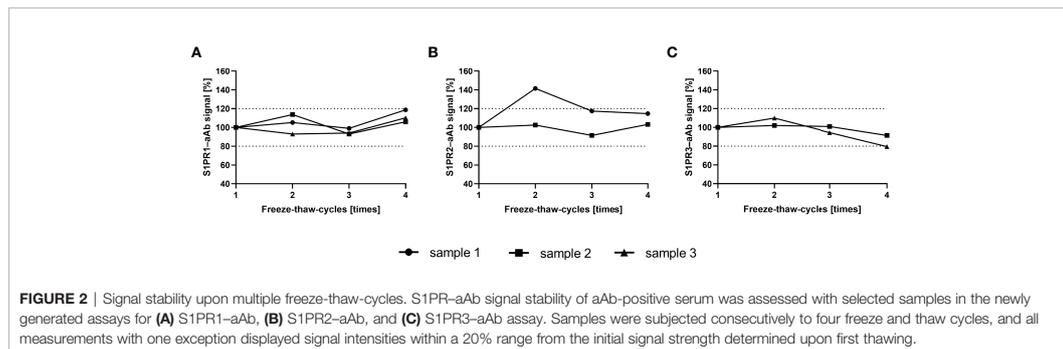
### Prevalence of S1PR-aAb in SSc Patients Versus Healthy Controls

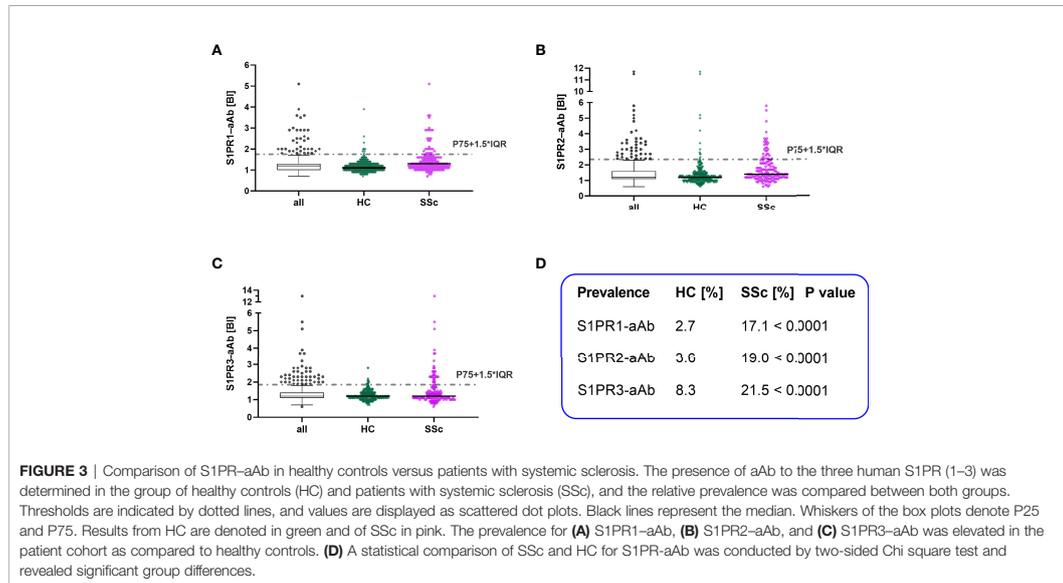
A cohort of serum samples from patients with SSc ( $n=158$ ) and a collection of serum samples from healthy controls ( $n=333$ ) was analyzed for natural aAb to S1PR by the three receptor-specific tests. The signals (RLU) were converted into relative binding indices (BI), with  $\text{BI}=1.0$  representing background noise.

Thresholds for positive aAb signals were determined by applying the mathematical outlier criterion of  $P75+1.5$ -times IQR as indicated by a dotted line (Figure 3). According to these criteria, several samples with positive aAb were identified in all three tests in both control and patient group. Prevalence of natural S1PR1-aAb was 17.1% in SSc versus 2.7% in controls (Figure 3A). Similarly, prevalence of S1PR2-aAb was elevated with 19.0% in SSc patients versus 3.6% in controls (Figure 3B). In comparison of all three assays, S1PR3-aAb displayed the highest prevalence, with 8.3% in controls and 21.5% in patients, with one sample showing exceptionally high signal intensity with a BI of 13 (Figure 3C). A direct comparison of the prevalence for each of the three S1PR-aAb is provided in (Figure 3D) and highlights the statistically significant differences in S1PR-aAb prevalence in SSc versus controls.

### Prevalence of S1PR-aAb in Patients as a Function of Pulmonary Arterial Hypertension

Pursuing the hypothesis that S1PR-aAb may be involved in the pathogenesis of PAH and therefore more prevalent in PAH, we subsequently divided the group of SSc patients into patients without PAH (SSc w/o PAH,  $n=100$ ) and a smaller group of





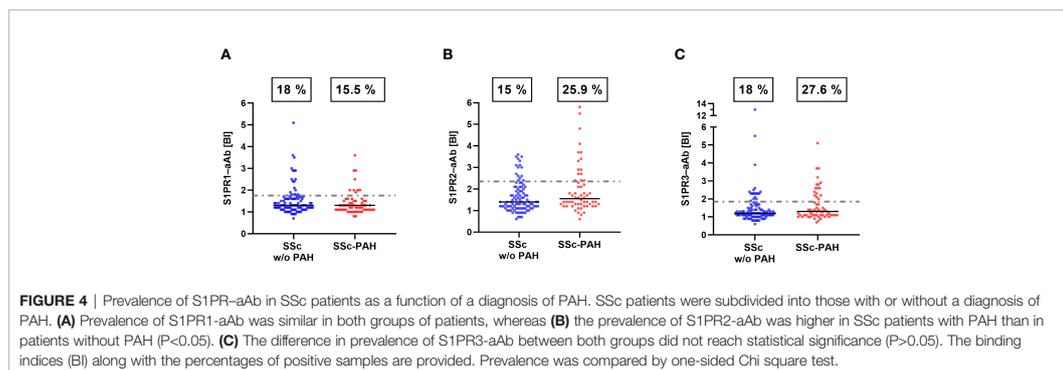
**FIGURE 3** | Comparison of S1PR-aAb in healthy controls versus patients with systemic sclerosis. The presence of aAb to the three human S1PR (1–3) was determined in the group of healthy controls (HC) and patients with systemic sclerosis (SSc), and the relative prevalence was compared between both groups. Thresholds are indicated by dotted lines, and values are displayed as scattered dot plots. Black lines represent the median. Whiskers of the box plots denote P25 and P75. Results from HC are denoted in green and of SSc in pink. The prevalence for **(A)** S1PR1-aAb, **(B)** S1PR2-aAb, and **(C)** S1PR3-aAb was elevated in the patient cohort as compared to healthy controls. **(D)** A statistical comparison of SSc and HC for S1PR-aAb was conducted by two-sided Chi square test and revealed significant group differences.

PAH-positive SSc patients (SSc-PAH, n=58). S1PR1-aAb appeared unrelated to PAH, and prevalence in the SSc w/o PAH group (18/100, 18.0%) was similar to the prevalence in the SSc-PAH group (9/58, 15.5%) (Figure 4A). In contrast, a quarter of samples in the SSc-PAH group displayed positivity for S1PR2-aAb (15/58, 25.9%), whereas a smaller percentage of SSc patients without PAH was positive for S1PR2-aAb (15/100, 15.0%), with the difference reaching statistical significance ( $P=0.0467$ ) (Figure 4B). With regards to the prevalence of S1PR3-aAb, a higher fraction of samples from the SSc-PAH was identified as positive (16/58, 27.6%) in comparison to the SSc w/o PAH group (18/100, 18.0%), albeit without reaching statistical significance ( $P=0.1133$ ) (Figure 4C). An overview of these three sets of measurements highlights the differential

picture, with a particularly elevated prevalence of S1PR2-aAb in patients with SSc-PAH.

### Serum Samples With Positive Autoantibodies to More Than One S1PR

The samples showing positive autoimmunity were further analyzed with respect to recognizing more than one receptor, i.e., being positive in two or even in all three S1PR-aAb assays. In total, six positive samples were identified with aAb exceeding the threshold in all three S1PR-aAb assays, suggesting either a cross-reactivity of a single aAb to the different receptors or a polyclonal nature of the aAb within a given serum, with aAb co-existing and recognizing either S1PR1, (or) S1PR2 or S1PR3. All of the respective patients were female, five derived from the SSc



**FIGURE 4** | Prevalence of S1PR-aAb in SSc patients as a function of a diagnosis of PAH. SSc patients were subdivided into those with or without a diagnosis of PAH. **(A)** Prevalence of S1PR1-aAb was similar in both groups of patients, whereas **(B)** the prevalence of S1PR2-aAb was higher in SSc patients with PAH than in patients without PAH ( $P<0.05$ ). **(C)** The difference in prevalence of S1PR3-aAb between both groups did not reach statistical significance ( $P>0.05$ ). The binding indices (BI) along with the percentages of positive samples are provided. Prevalence was compared by one-sided Chi square test.

cohort whereas only one healthy control was triple positive. Three of the triple positive subjects were suffering from SSC-PAH. Four samples were tested positive for both S1PR1-aAb and S1PR3-aAb. In addition, two SSC patient samples were simultaneously positive in the tests for S1PR1-aAb and S1PR2-aAb. A total number of 19 other samples were positive for S1PR2-aAb and S1PR3-aAb. The commercial antibodies yielded high signals only when tested for one receptor subtype, and not in the related assays.

### Comparison of Clinical Characteristics With Respect to S1PR-aAb

The full cohort of SSC patients was analyzed for clinical characteristics in relation to the results from the S1PR-aAb tests. In general, patients with S1PR3-aAb were younger than average (median age; 51 vs. 63). With respect to cutaneous manifestation of SSC, 85.2% of patients positive for S1PR1-aAb had a limited cutaneous form, whereas the diffuse manifestations were dominating in patients that were positive for S1PR2-aAb or S1PR3-aAb. Besides the elevated prevalence of S1PR2-aAb and S1PR3-aAb in the group of SSC patients with PAH, there was also a higher share of patients suffering from lung fibrosis in these groups (S1PR2-aAb; 60.7% vs. 45.3%, S1PR3-aAb; 71.9% vs. 41.9%). None of the groups showed remarkable differences in the prevalence of specific anti-nuclear Ab (Table 2).

## DISCUSSION

In this manuscript, we describe the establishment of novel analytical *in vitro* assays for assessing the prevalence of natural

autoantibodies recognizing human S1PR1, S1PR2 or S1PR3. A first analysis on the specificity of the assays was positively passed by using commercial receptor-specific antibodies, recognizing only the respective receptor type and not cross-reacting to a related S1PR. Dependence of signals to antibody levels was observed in dilution experiments with commercial antibodies. As another important prerequisite for the present analysis, signal stability was shown by repeated freezing and thawing of aAb-positive human samples. In agreement with our hypothesis, prevalence of natural S1PR-aAb was significantly elevated in SSC patients as compared to healthy controls, with some further increase in the subgroup of patients who developed PAH. S1PR2-aAb and S1PR3-aAb showed a particular association with both PAH and lung fibrosis, in line with their established local biochemical function (39).

The balance between vasoconstriction and vasodilation in the (pulmonary) arterial system is fine-tuned by the expression of S1PR1, S1PR2 and S1PR3 on vascular endothelial cells and smooth muscle cells. While S1PR1 agonism in endothelial cells stimulates NO formation and causes vasodilation, S1PR2 and S1PR3 signaling in smooth muscle cells mediate vasoconstriction. Analyses in primary pulmonary artery smooth muscle cells, isolated perfused lungs and *in vivo* models of PH specifically identified signaling via S1PR2 to trigger pulmonary vasoconstriction and vascular remodeling (21, 22), while pharmacological inhibition of S1PR2 effectively prevented the development of chronic hypoxic PH in mice (9). Agonism of S1PR3, on the other hand, has been implicated in the development of radiation- and bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice (40, 41).

**TABLE 2** | Characterization of the cohort of patients with systemic sclerosis regarding S1PR-aAb.

	SSc n=158	S1PR1-aAb		S1PR2-aAb		S1PR3-aAb	
		positive* n=27 (17.1%)	negative n=131 (82.9%)	positive* n=30 (19%)	negative n=128 (81%)	positive* n=34 (21.5%)	negative n=124 (78.5%)
<b>Cutaneous manifestation</b>							
Limited, n (%)	91 (58%)	23 (85.2%)	68 (52.3%)	14 (48.3%)	77 (60.2%)	13 (39.4%)	78 (62.9%)
Diffuse, n (%)	59 (38%)	4 (14.8%)	55 (42.3%)	14 (48.3%)	45 (35.2%)	19 (57.6%)	40 (32.3%)
Sine scleroderma, n (%)	7 (4%)	0 (0%)	7 (5.4%)	1 (3.4%)	6 (4.7%)	1 (3.0%)	6 (4.8%)
mRSS, median (range)	6 (0–39)	4 (0–24)	6 (0–39)	5 (0–27)	6 (0–39)	5 (0–27)	6 (0–39)
<b>Pulmonary &amp; cardiac involvement</b>							
NTproBNP [ng/L], median (range)	206 (5– 19066)	296 (46–4884)	196 (5–19066)	135 (5–19066)	235 (29–14414)	135 (5–4884)	242 (29–19066)
PAH, n (%)	58 (37%)	9 (33.3%)	49 (37.4%)	15 (50%)	43 (33.6%)	16 (47.1%)	42 (33.9%)
ILD, n (%)	75 (48%)	11 (40.7%)	64 (49.6%)	17 (60.7%)	58 (45.3%)	23 (71.9%)	52 (41.9%)
<b>Autoantibodies**</b>							
anti-topoisomerase-1 (Scl70) Ab, n (%)	50 (33%)	4 (15.4%)	46 (36.2%)	11 (39.3%)	39 (31.2%)	16 (48.5%)	34 (28.3%)
anti-RNA-Pol-III Ab (ARA), n (%)	13 (8%)	2 (7.4%)	11 (8.7%)	2 (7.4%)	11 (8.7%)	4 (12.5%)	9 (7.4%)
anti-centromere-CENP-B Ab, n (%)	63 (41.4%)	21 (75%)	42 (33.6%)	11 (40.7%)	52 (41.6%)	9 (29.0%)	54 (44.6%)
anti-citrullinated-peptide Ab, n (%)***	30 (54.5%)	6 (66.7%)	24 (52.2%)	10 (71.4%)	20 (48.8%)	8 (53.3%)	22 (55%)

Missing values were excluded from the calculation; mRSS, modified Rodnan-Skin-Score; ILD, interstitial lung disease; \*P75+1.5xIQR, \*\*all were antinuclear Ab (ANA) positive, \*\*\*positive:  $\geq 7$  U/ml.

The increased prevalence of S1PR2- and S1PR3- but not S1PR1-specific aAb in SSc-PAH patients may thus point towards an autoimmune-supported pathomechanism that could contribute to elevated pulmonary vascular resistance and the development of lung fibrosis in SSc-associated PAH. In line with this notion, PAH patients show elevated expression of S1PR2 on PASMC (9). Given that pharmacologic S1PR2 inhibition could prevent the development of hypoxic PH in rodents, an agonistic aAb against S1PR2/3 may conceivably promote PASMC proliferation and medial thickening (9). Yet, the biochemical nature of the S1PR-aAb and their functional effects on receptor signaling are presently unclear, as our newly developed assays only detect binding characteristics, while data probing whether the identified aAb act as antagonists to inhibit the receptors, as agonists to stimulate receptor signaling, or rather elicit allosteric effects are lacking and remain to be elucidated in future studies (40).

Our findings support earlier reports describing a set of GPCR-specific aAb in patients with autoimmune disease such as systemic sclerosis (28, 41). While aAb against a variety of GPCR including the endothelin type A receptor and angiotensin II receptor type 2 have been identified in a wide range of cardiovascular diseases where they have been proposed to contribute critically to disease initiation and/or progression, aAb against S1PR have so far only been reported in a single case report. In this lymphopenic patient with recurrent infections, aAb to human S1PR1 were identified (42). Adoptive transfer of the purified human aAb into mice caused immunosuppression, decreased T-cell chemotaxis and reduced lymph node egress *via* direct interaction with a subset of T-cells (42), thus highlighting the functional relevance of these aAb. The epitope recognized by the S1PR1-aAb was within the amino-terminal domain of S1PR1. Yet as therapeutic antibodies against certain S1PR demonstrated, binding is often not restricted to just one receptor (43). As such, it will be important to characterize the major antigenic epitopes for the specific receptor subtypes identified in the present study. Here, we describe for the first time the prevalence of S1PR-aAb including the first identification of S1PR2- and S1PR3-aAb in a large cohort of patients and healthy individuals, and report their potential use as both biomarkers and potential therapeutic targets in SSc, PAH, and/or lung fibrosis.

Among the particular strengths of our study are the rigorous assay designs, using full-length human receptor molecules as bait and human cells as system for the recombinant expression, thereby enabling regular posttranslational modifications, full coverage of potential epitopes and correct trafficking (44, 45). Moreover, the identification of commercial receptor-specific antibodies to each of the three receptor subtypes verified specificity of the assays, and enables other research groups to conduct similar analyses using the same type of positive controls, thereby increasing transparency and comparability between analytical techniques. The cohort size of the controls and of the patients provided considerable numbers of samples, allowing for a solid case-control comparison and a focused analysis of patients with versus without PAH. Finally, assay sensitivity was

high and only small amounts of serum were required to obtain the aAb result, enabling fast, cost-effective and high throughput analyses in future studies on larger cohorts of samples with related cardiovascular phenotypes.

No study is without limitation, and the lack of biological characterization of the identified aAb as potential agonists, antagonists or modulators of receptor function constitutes an important knowledge gap. Unfortunately, sample volumes were limited and not sufficient to isolate immunoglobulins for further biochemical analyses. The nature of the study design as case-control study precludes any causal interpretations, and detailed structural and functional analyses of the identified aAb along with analyses with longitudinal patient samples and clinical data are required to elucidate a potential etiologic role of the aAb in SSc, and in particular in PAH. In addition, information on anthropometric and clinical characteristics of the participants contributing to the cohort of healthy subjects is sparse, as the samples were obtained from a commercial supplier, and subject-specific information was not provided for reasons of data safety. Finally, genetic background and place of residency of the patients was relatively uniform, precluding extrapolations to patients from other populations or different genetic background. That notwithstanding, this is the first systematic analysis of aAb to human S1PR in healthy and diseased subjects, providing some positive results in relation to PAH which warrant further analysis in larger clinical studies.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material. Further inquiries can be directed to the corresponding authors.

## ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Charité Medical School Berlin (10/30/2017, EA1/178/17) and the Board of Ethics of the University of Cologne (#04-037). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, ES, SS, and LS; Methodology: HG, WM, and JH; Software: HG and JH; Validation, SS, GR, and WK; Formal Analysis: HG, JH, SS, and LS; Investigation: HG, ES, WM, SS, and LS; Resources: ES, WM, GR, and LS; Data Curation: HG, JH, SS, and LS; Writing—Original Draft Preparation, HG, ES, SS, and LS; Writing, Review and Editing; WM, JH, GR, and WK; Supervision, SS and LS; Project Administration, LS; Funding Acquisition, LS. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

## FUNDING

The research was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), research unit FOR-2558 "TraceAge" (Scho 849/6-2), and CRC/TR 296 "Local control of TH action" (LocoTact), to LS, and SFB-TR84 and KU1218/12-1 to WK. Additional support was received from the German Centre for Cardiovascular Research (DZHK) and German Foundation for Heart Research (F-09-19) to SS. ES was supported by the Berlin Institute of Health Biomedical Innovation Academy with a Fellowship of the BIH Charité Clinician Scientist Program.

## REFERENCES

- Kurakula K, Smolders V, Tura-Ceide O, Jukema JW, Quax PHA, Goumans MJ. Endothelial Dysfunction in Pulmonary Hypertension: Cause or Consequence? *Biomedicines* (2021) 9(1). doi: 10.3390/biomedicines9010057
- Sarah B, Ashrith G, Sandeep S. Evaluation, Diagnosis, and Classification of Pulmonary Hypertension. *Methodist Debakey Cardiovasc J* (2021) 17(2):86–91. doi: 10.14797/OCDF453
- Galiè N, Humbert M, Vachiery J-L, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension. The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS) Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Respir J* (2015) 46(4):903–75. doi: 10.1183/13993003.01032-2015
- Hoepfer MM, Bogaard HJ, Condliffe R, Frantz R, Khanna D, Kurzyna M, et al. Definitions and Diagnosis of Pulmonary Hypertension. *J Am Coll Cardiol* (2013) 62(25 Suppl):D42–50. doi: 10.1016/j.jacc.2013.10.032
- Hudson J, Farkas L. Epigenetic Regulation of Endothelial Dysfunction and Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension. *Int J Mol Sci* (2021) 22(22). doi: 10.3390/ijms222212098
- Li MX, Jiang DQ, Wang Y, Chen QZ, Ma YJ, Yu SS, et al. Signal Mechanisms of Vascular Remodeling in the Development of Pulmonary Arterial Hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* (2016) 67(2):182–90. doi: 10.1097/FJC.0000000000000328
- Li C, Liu P, Song R, Zhang Y, Lei S, Wu S. Immune Cells and Autoantibodies in Pulmonary Arterial Hypertension. *Acta Biochim Biophys Sin* (2017) 49(12):1047–57. doi: 10.1093/abbs/gmx095
- Günther J, Kill A, Becker MO, Heidecke H, Rademacher J, Siegert E, et al. Angiotensin Receptor Type 1 and Endothelin Receptor Type A on Immune Cells Mediate Migration and the Expression of IL-8 and CCL18 When Stimulated by Autoantibodies From Systemic Sclerosis Patients. *Arthritis Res Ther* (2014) 16(2):R65. doi: 10.1186/ar4503
- Chen J, Tang H, Sysol JR, Moreno-Vinasco L, Shioura KM, Chen T, et al. The Sphingosine Kinase 1/Sphingosine-1-Phosphate Pathway in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* (2014) 190(9):1032–43. doi: 10.1164/rccm.201401-0121OC
- Gairhe S, Joshi SR, Bastola MM, McLendon JM, Oka M, Fagan KA, et al. Sphingosine-1-Phosphate is Involved in the Occlusive Arteriopathy of Pulmonary Arterial Hypertension. *Pulmonary Circulation* (2016) 6(3):369–80. doi: 10.1086/687766
- Cartier A, Hla T. Sphingosine 1-Phosphate: Lipid Signaling in Pathology and Therapy. *Science* (2019) 366(6463). doi: 10.1126/science.aar5551
- Vu TM, Ishizu AN, Foo JC, Toh XR, Zhang F, Whee DM, et al. Mfsd2b is Essential for the Sphingosine-1-Phosphate Export in Erythrocytes and Platelets. *Nature* (2017) 550(7677):524–8. doi: 10.1038/nature24053
- Fukuhara S, Simmons S, Kawamura S, Inoue A, Orba Y, Tokudome T, et al. The Sphingosine-1-Phosphate Transporter Spns2 Expressed on Endothelial Cells Regulates Lymphocyte Trafficking in Mice. *J Clin Invest* (2012) 122(4):1416–26. doi: 10.1172/JCI60746
- Simmons S, Sasaki N, Umemoto E, Uchida Y, Fukuhara S, Kitazawa Y, et al. High-Endothelial Cell-Derived S1P Regulates Dendritic Cell Localization and Vascular Integrity in the Lymph Node. *Elife* (2019) 8. doi: 10.7554/eLife.41239
- Takabe K, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S. "Inside-Out" Signaling of Sphingosine-1-Phosphate: Therapeutic Targets. *Pharmacol Rev* (2008) 60(2):181–95. doi: 10.1124/pr.107.07113
- Blaho VA, Chun J. 'Crystal' Clear? Lysophospholipid Receptor Structure Insights and Controversies. *Trends Pharmacol Sci* (2018) 39(11):953–66. doi: 10.1016/j.tips.2018.08.006
- Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, et al. Lymphocyte Egress From Thymus and Peripheral Lymphoid Organs is Dependent on S1P Receptor 1. *Nature* (2004) 427(6972):355–60. doi: 10.1038/nature02284
- Birker-Robaczewska M, Studer R, Haenig B, Menyhart K, Hofmann S, Nayler O. bFGF Induces S1P1 Receptor Expression and Functionality in Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. *J Cell Biochem* (2008) 105(4):1139–45. doi: 10.1002/jcb.21918
- Cantalupo A, Gargiulo A, Dautaj E, Liu C, Zhang Y, Hla T, et al. S1PR1 (Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1) Signaling Regulates Blood Flow and Pressure. *Hypertens (Dallas Tex 1979)* (2017) 70(2):426–34. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09088
- Ota H, Beutz MA, Ito M, Abe K, Oka M, McMurtry IF. S1P(4) Receptor Mediates S1P-Induced Vasoconstriction in Normotensive and Hypertensive Rat Lungs. *Pulmonary Circulation* (2011) 1(3):399–404. doi: 10.4103/2045-8932.87309
- Tableling C, Yu H, Wang L, Ranke H, Goldenberg NM, Zabini D, et al. CFTR and Sphingolipids Mediate Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2015) 112(13):E1614–23. doi: 10.1073/pnas.1421190112
- Grimmer B, Kuebler WM. The Endothelium in Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction. *J Appl Physiol* (1985) (2017) 123(6):1635–46. doi: 10.1152/japplphysiol.00120.2017
- Yang L, Han Z, Tian L, Mai P, Zhang Y, Wang L, et al. Sphingosine 1-Phosphate Receptor 2 and 3 Mediate Bone Marrow-Derived Monocyte/Macrophage Motility in Cholestatic Liver Injury in Mice. *Sci Rep* (2015) 5:13423. doi: 10.1038/srep13423
- Burg N, Salmon JE, Hla T. Sphingosine 1-Phosphate Receptor-Targeted Therapeutics in Rheumatic Diseases. *Nat Rev Rheumatol* (2022) 18(6):335–51. doi: 10.1038/s41584-022-00784-6
- Tian J, Huang T, Chang S, Wang Y, Fan W, Ji H, et al. Role of Sphingosine-1-Phosphate Mediated Signalling in Systemic Lupus Erythematosus. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* (2021) 156:106584. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2021.106584
- Pérez-Jeldres T, Alvarez-Lobos M, Rivera-Nieves J. Targeting Sphingosine-1-Phosphate Signaling in Immune-Mediated Diseases: Beyond Multiple Sclerosis. *Drugs* (2021) 81(9):985–1002. doi: 10.1007/s40265-021-01528-8
- Chaisson NF, Hassoun PM. Systemic Sclerosis-Associated Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest* (2013) 144(4):1346–56. doi: 10.1378/chest.12-2396
- Cabral-Marques O, Marques A, Gill LM, De Vito R, Rademacher J, Gunther J, et al. GPCR-Specific Autoantibody Signatures are Associated With Physiological and Pathological Immune Homeostasis. *Nat Commun* (2018) 9(1):5224. doi: 10.1038/s41467-018-07598-9
- Hamaguchi Y. [Autoantibodies and Their Clinical Characteristics in Systemic Sclerosis]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* (2013) 36(3):139–47. doi: 10.2177/jsci.36.139
- Becker MO, Kill A, Kutsche M, Guenther J, Rose A, Tableling C, et al. Vascular Receptor Autoantibodies in Pulmonary Arterial Hypertension Associated

- With Systemic Sclerosis. *Am J Respir Crit Care Med* (2014) 190(7):808–17. doi: 10.1164/rccm.201403-0442OC
31. Fisher MR, Mathai SC, Champion HC, Girgis RE, Housten-Harris T, Hummers L, et al. Clinical Differences Between Idiopathic and Scleroderma-Related Pulmonary Hypertension. *Arthritis Rheumatol* (2006) 54(9):3043–50. doi: 10.1002/art.22069
  32. Hoepfer MM, Ghofrani HA, Grünig E, Klose H, Olschewski H, Rosenkranz S. Pulmonary Hypertension. *Dtsch Arztebl Int* (2017) 114(5):73–84. doi: 10.3238/arztebl.2016.0073
  33. Kano M, Kobayashi T, Date M, Tennichi M, Hamaguchi Y, Strasser DS, et al. Attenuation of Murine Sclerodermatous Models by the Selective S1P(1) Receptor Modulator Cenerimod. *Sci Rep* (2019) 9(1):658. doi: 10.1038/s41598-018-37074-9
  34. Eleftheriadou AM, Mehl S, Renko K, Kasim RH, Schaefer JA, Minich WB, et al. Revisiting Autoimmunity to Sodium-Iodide Symporter and Pendrin in Thyroid Disease. *Eur J Endocrinol* (2020) 183(6):571–80. doi: 10.1530/EJE-20-0566
  35. Schwiebert C, Kuhnen P, Becker NP, Welsink T, Keller T, Minich WB, et al. Antagonistic Autoantibodies to Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor Associate With Poor Physical Strength. *Int J Mol Sci* (2020) 21(2). doi: 10.3390/ijms21020463
  36. Porst T, Johannes J, Gluschke H, Kohler R, Mehl S, Kuhnen P, et al. Natural Autoimmunity to the Thyroid Hormone Monocarboxylate Transporters MCT8 and MCT10. *Biomedicines* (2021) 9(5). doi: 10.3390/biomedicines9050496
  37. Sattler LM, Schniewind HA, Minich WB, Haudum CW, Niklowitz P, Munzker J, et al. Natural Autoantibodies to the Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor in Polycystic Ovarian Syndrome. *PLoS One* (2021) 16(4): e0249639. doi: 10.1371/journal.pone.0249639
  38. Schniewind HA, Sattler LM, Haudum CW, Munzker J, Minich WB, Obermayer-Pietsch B, et al. Autoimmunity to the Follicle-Stimulating Hormone Receptor (FSHR) and Luteinizing Hormone Receptor (LHR) in Polycystic Ovarian Syndrome. *Int J Mol Sci* (2021) 22(24). doi: 10.3390/ijms222413667
  39. Waeber C, Blondeau N, Salomone S. Vascular Sphingosine-1-Phosphate S1P1 and S1P3 Receptors. *Drug News Perspect* (2004) 17(6):365–82. doi: 10.1358/dnp.2004.17.6.829028
  40. Ludwig RJ, Vanhoorelbeke K, Leyboldt F, Kaya Z, Bieber K, McLachlan SM, et al. Mechanisms of Autoantibody-Induced Pathology. *Front Immunol* (2017) 8. doi: 10.3389/fimmu.2017.00603
  41. Cabral-Marques O, Riemekasten G. Functional Autoantibodies Targeting G Protein-Coupled Receptors in Rheumatic Diseases. *Nat Rev Rheumatol* (2017) 13(11):648–56. doi: 10.1038/nrrheum.2017.134
  42. Liao JJ, Huang MC, Fast K, Gundling K, Yadav M, Van Brocklyn JR, et al. Immunosuppressive Human Anti-Lymphocyte Autoantibodies Specific for the Type 1 Sphingosine 1-Phosphate Receptor. *FASEB J* (2009) 23(6):1786–96. doi: 10.1096/fj.08-124891
  43. Wang J, Goren I, Yang B, Lin S, Li J, Elias M, et al. Review Article: The Sphingosine 1 Phosphate/Sphingosine 1 Phosphate Receptor Axis - a Unique Therapeutic Target in Inflammatory Bowel Disease. *Aliment Pharmacol Ther* (2022) 55(3):277–91. doi: 10.1111/apt.16741
  44. Ju MS, Jung ST. Antigen Design for Successful Isolation of Highly Challenging Therapeutic Anti-GPCR Antibodies. *Int J Mol Sci* (2020) 21(21). doi: 10.3390/ijms21218240
  45. Corin K, Baaske P, Ravel DB, Song J, Brown E, Wang X, et al. A Robust and Rapid Method of Producing Soluble, Stable, and Functional G-Protein Coupled Receptors. *PLoS One* (2011) 6(10):e23036. doi: 10.1371/journal.pone.0023036

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Gluschke, Siegert, Minich, Hackler, Riemekasten, Kuebler, Simmons and Schomburg. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## **Lebenslauf**

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





## Komplette Publikationsliste

**Publikation 1:** [H. Gluschke, E. Siegert, W. B. Minich, J. Hackler, G. Riemekasten, W. M. Kuebler, et al.], [**Autoimmunity to Sphingosine-1-Phosphate-Receptors in Systemic Sclerosis and Pulmonary Arterial Hypertension**], [Frontiers Immunology], [2022]

**Publikation 2:** [T. Porst, J. Johannes, H. Gluschke, R. Köhler, S. Mehl, P. Kühnen, et al.], [**Natural Autoimmunity to the Thyroid Hormone Monocarboxylate Transporters MCT8 and MCT10**], [Biomedicines], [2021]

**Publikation 3:** [Q. Sun, J. Hackler, J. Hilger, H. Gluschke, A. Muric, S. Simmons, et al.], [**Selenium and Copper as Biomarkers for Pulmonary Arterial Hypertension in Systemic Sclerosis**], [Nutrients], [2020]

## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Lutz Schomburg für die wissenschaftliche Inspiration, die stets konstruktive Kritik und wissenschaftliche Förderung bedanken. Mein Dank gilt Waldemar Minich, welcher mich mit Geduld in die Methodiken der Laborarbeit eingeführt hat. Dem wunderbaren Kollegium des Instituts für experimentelle Endokrinologie danke ich für die konstruktive Atmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft in allen Belangen. Im Speziellen möchte ich mich bei Qian Sun, Gabriele Boehm und Julian Hackler für die Hilfe bei der experimentellen Arbeit, den Auswertungen als auch Interpretationen der Ergebnisse danken.