

**NACHWEIS DER  
SPHINGOSINKINASE-ISOFORMEN 1 UND 2  
BEI ALLERGISCHEM ASTHMA  
AM BROWN-NORWAY-RATTENMODELL**

**NINA ISENBERG**



**INAUGURAL-DISSERTATION**

Zur Erlangung eines  
Dr.med.vet.

Beim Fachbereich Veterinärmedizin  
Der Justus-Liebig-Universität Gießen

---

*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und –Embryologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. M. Bergmann

und

dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. H.-J. Oehmke

# **Nachweis der Sphingosinkinase-Isoformen 1 und 2 bei allergischem Asthma am Brown-Norway-Rattenmodell**

## **Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr.med.vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Nina Isenberg**

Tierärztin aus Wuppertal

Gießen 2007

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer

Gutachter: Prof. Dr. M. Bergmann  
Prof. Dr. H.-J. Oehmke

Tag der Disputation: 05.11. 2007

# Inhaltsverzeichnis

<b>Einleitung</b>	<b>8</b>
<b>Literaturübersicht</b>	<b>13</b>
<b><i>Allergisches Asthma</i></b>	<b>13</b>
<b>Pathophysiologie</b>	<b>13</b>
<b>Zeitverlauf</b>	<b>15</b>
<b>Beteiligung und Bedeutung immunkompetenter Zellen</b>	<b>16</b>
<i>Eosinophile Granulozyten</i>	16
<i>Neutrophile Granulozyten</i>	17
<i>Makrophagen</i>	18
<b><i>Das Brown-Norway-Modell</i></b>	<b>20</b>
<b><i>Sphingosin-1-Phosphat</i></b>	<b>22</b>
<b>Herkunft und Vorkommen</b>	<b>22</b>
<b>Das Sphingolipidgleichgewicht</b>	<b>29</b>
<b>Signaltransduktionsmechanismen</b>	<b>31</b>
<i>Intrazelluläre Signaltransduktion</i>	31
<i>Extrazelluläre Signaltransduktion</i>	32
<i>S1P-Rezeptoren</i>	32
<i>Mechanismen der rezeptorvermittelten Signaltransduktion</i>	33
<b>Funktionen von S1P</b>	<b>34</b>
<i>Proliferation und Zellzyklusregulation</i>	35
<i>Regulation der Calciumkonzentration</i>	36
<i>Effekte auf glatte Muskelzellen</i>	37
<i>Migration und Chemotaxis</i>	37
<i>S1P im Immunsystem</i>	39
<i>Funktionen bei allergischem Asthma</i>	41
<b><i>Sphingosinkinase</i></b>	<b>43</b>
<b>Struktur und Isoformen</b>	<b>43</b>
<b>Vorkommen</b>	<b>45</b>

Reaktionsverlauf	46
Regulation der SPHK	46
<b>Material und Methoden</b>	<b>49</b>
<i>Tiere</i>	<b>49</b>
<i>Sensibilisierung und Allergenprovokation</i>	<b>49</b>
<i>Gewebegewinnung</i>	<b>50</b>
Bronchoalveoläre Lavage (BAL)	50
Gewinnung von Gewebe zur RNA- Isolation	50
Gewinnung von Gewebe für Immunhistochemie	51
<i>RNA-Isolation, reverse Transkription und</i>	
<i>Polymerasekettenreaktion</i>	<b>51</b>
RNA-Isolation	<b>51</b>
<i>RNA-Isolation aus Lungengewebe</i>	51
<i>RNA-Isolation aus BAL-Material</i>	52
DNase-Verdau und reverse Transkription	<b>52</b>
Polymerasekettenreaktion (PCR)	<b>53</b>
<i>Primerpaare gegen SPHK 1 der Ratte</i>	53
<i>Primerpaare gegen SPHK 2 der Ratte</i>	54
<i>Primerpaare gegen <math>\beta</math>-Actin der Ratte</i>	54
<i>Primerpaare gegen <math>\beta</math>2-Microglobulin der Ratte</i>	54
Auswertung der RT-PCR	<b>54</b>
Quantitative RT-PCR	<b>55</b>
<i>Immunhistochemie</i>	<b>55</b>
Herstellung von Gefrierschnitten	55
Durchführung der immunhistochemischen Doppelmarkierung	56
Fluoreszenzmikroskopie	58
Auswertung	58
Präabsorption	59
<b>Ergebnisse</b>	<b>60</b>
<i>Vorkommen von SPHK im Lungengewebe</i>	<b>60</b>
Immunhistochemie	<b>60</b>
<i>Lokalisation von SPHK im Lungengewebe</i>	60
<i>Vorkommen von SPHK1a in gp91phox-immunreaktiven mononukleären Zellen</i>	69

<i>Vergleich von Asthma- und Kontrollgruppe</i>	69
<i>Vergleich der 24 und 48 Stunden nach Allergenprovokation untersuchten Gewebe</i>	69
<i>Vorkommen von SPHK 1a in ED1-immunreaktiven mononukleären Zellen</i>	71
<i>Vergleich von Asthma- und Kontrollgruppe</i>	71
<i>Vergleich der 24 und 48 Stunden nach Allergenprovokation untersuchten Gewebe</i>	71
<b>RT-PCR</b>	<b>74</b>
<b>Quantitative RT-PCR</b>	<b>75</b>
<i>SPHK1</i>	75
<i>Vergleich von Asthma- und Kontrollgruppe</i>	75
<i>Vergleich der 24 und 48 Stunden nach Allergenprovokation untersuchten Gewebe</i>	75
<i>SPHK2</i>	75
<i>Vergleich von Asthma- und Kontrollgruppe</i>	75
<i>Vergleich der 24 und 48 Stunden nach Allergenprovokation untersuchten Gewebe</i>	76
<b><i>Vorkommen von SPHK1a in Bronchoalveolärer Lavage</i></b>	<b>78</b>
<b>Immunhistochemie</b>	<b>78</b>
<i>Vorkommen von SPHK1a in gp91phox-immunreaktiven mononukleären Zellen</i>	83
<i>Vergleich von Asthma- und Kontrollgruppe</i>	83
<i>Vergleich der 24 und 48 Stunden nach Allergenprovokation untersuchten Gewebe</i>	83
<i>Vorkommen von SPHK1a in ED1-immunreaktiven mononukleären Zellen</i>	85
<i>Vergleich von Asthma- und Kontrollgruppe</i>	85
<i>Vergleich der 24 und 48 Stunden nach Allergenprovokation untersuchten Gewebe</i>	85
<i>Vergleich zwischen BAL und Lungengewebe</i>	85
<b>Quantitative RT-PCR</b>	<b>87</b>
<i>SPHK1</i>	87
<i>Vergleich von Asthma- und Kontrollgruppe</i>	87
<i>Vergleich der nach 24 und 48 Stunden nach Allergenprovokation untersuchten Gewebe</i>	87
<i>SPHK2</i>	87
<i>Vergleich von Asthma- und Kontrollgruppe</i>	87

<i>Vergleich der 24 und 48 Stunden nach Allergenprovokation untersuchten Gewebe</i>	87
<b>Diskussion</b>	<b>89</b>
<b><i>Methodische Aspekte</i></b>	<b>89</b>
Einsatz von Brown-Norway Ratten	89
Nachweis von SPHK1a	90
Verwendung von BAL-Material	92
Einsatz und Auswertung der Doppelimmunhistochemie	93
<b><i>SPHK im Lungengewebe</i></b>	<b>94</b>
Intrazelluläre Lokalisation von SPHK1a	94
Glatte Muskelzellen	94
Mononukleäre Zellen	95
Vergleich von Asthma- und Kontrollgruppe	98
Zeitabhängigkeit der SPHK-Expression	102
<b><i>SPHK in Bronchoalveolärer Lavage</i></b>	<b>105</b>
Makrophagen und neutrophile Granulozyten	105
Vergleich von Asthma- und Kontrollgruppe	106
Zeitabhängigkeit der SPHK-Expression	108
<b><i>Vergleich ungespülter Lungen mit gespülten Lungen</i></b>	<b>109</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>110</b>
<b>Summary</b>	<b>113</b>
<b>Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen</b>	<b>115</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>118</b>
<b>Veröffentlichung</b>	<b>149</b>
<b>Erklärung</b>	<b>150</b>
<b>Danksagung</b>	<b>151</b>



## Einleitung

Allergisches Asthma ist eine obstruktive Erkrankung der tieferen Atemwege (Bochner et al. 1994), welche durch die Inhalation von Allergenen und darauf folgende Mastzellaktivierung hervorgerufen wird und durch eine Entzündung der peripheren Atemwege und bronchiale Hyperreagibilität gekennzeichnet ist (Busse & Lemanske 2001; Fireman 2003). Ein Kennzeichen obstruktiver Erkrankungen ist die Erhöhung des Atemwegswiderstandes (Busse & Lemanske 2001). Die Bedeutung entzündlicher Prozesse für die Entwicklung asthmatischer Erkrankungen wurde erst vor 15 Jahren durch verschiedene Untersuchungen belegt (Barnes 1989; Djukanovic et al. 1990; Bradley et al. 1991; Poston et al. 1992; Arm & Lee 1992). Es handelt sich bei allergischem Asthma um ein komplexes Krankheitsgeschehen, in das verschiedene Organsysteme, insbesondere der Respirationstrakt, das Immunsystem, aber auch das Kreislauf- und Nervensystem mit einbezogen sind (Barnes 1989; Bochner et al. 1994; Ferreira 2004). Der erhöhte Atemwegswiderstand ergibt sich aus den im Verlauf asthmatischer Erkrankungen auftretenden pathologischen Veränderungen im Bereich der tieferen Atemwege. Diese umfassen bei akutem Auftreten Spasmen der glatten Bronchialmuskulatur, Schwellung der Bronchialschleimhaut und Hypersekretion muköser Drüsen (Bochner et al. 1994; Jeffery 1998; Bousquet et al. 2000; Tillie-Leblond et al. 2005). Wird ein chronischer Zustand erreicht, treten größtenteils irreversible, strukturelle Veränderungen des Lungenparenchyms auf. Diese werden als „Remodeling“ bezeichnet (Elias et al. 1999; Busse & Lemanske 2001; Wenzel 2003; Fireman 2003) und führen zur dauerhaften Verringerung des Atemwegsdurchmessers (Bousquet et al. 2000), wobei das Ausmaß dieser Veränderungen variiert und in Zusammenhang mit der Schwere der Erkrankung steht (Elias et al. 1999; Busse et al. 2001). Die strukturellen Veränderungen im Verlauf des Remodeling sind vom ursprünglichen Auslöser des allergischen Asthmas unabhängig; sie sind vielmehr wahrscheinlich das Ergebnis einer sich selbst aufrechterhaltenden, chronischen Entzündung der betroffenen Strukturen (Fireman 2003). Die hierfür verantwortlichen Mechanismen sind jedoch noch größtenteils unklar (Elias et al. 1999; Busse & Lemanske 2001). Aufgrund zahlreicher Untersuchungen, die sich mit den charakteristischen pathologischen Veränderungen der tieferen Atemwege sowohl bei akutem als auch bei chronischem Asthma befassten (Bradley et al. 1991; Poston et al. 1992; Johansson et al. 1997; Zeibecoglou et al. 2000; Peters-Golden 2004; Dominguez Ortega et al. 2004), gilt es heute als gesichert, dass deren Schwere in direktem Zusammenhang mit der Intensität der vorliegenden Entzündungsreaktion, gemessen an der Anzahl infiltrierender Leukozyten steht (Barnes 1989; Arm & Lee 1992; Bochner et al. 1994; Busse et al. 2001). Hierbei sind sowohl das gesamte Schleimhaut-assoziierte Immunsystem des Respirationstraktes (Bousquet et al.

2000) als auch aus dem Blutkreislauf rekrutierte periphere Leukozyten beteiligt. (Bochner et al. 1994; Bousquet et al. 2000; Busse & Lemanske 2001; Fireman 2003). Das komplexe Zusammenspiel der unterschiedlichen Leukozytenpopulationen sowie der von diesen gebildeten Cytokine spielt für die Entstehung der pathologischen Veränderungen eine wichtige Rolle (Djukanovich 1990; Arm & Lee 1992; Kay & Corrigan 1992; Lukacs et al. 1995; Busse & Lemanske 2001; Cohn et al. 2004). Hinweise darauf ergab die Messung signifikant erhöhter Cytokinmengen in der durch bronchoalveoläre Lavage (BAL) gewonnenen Flüssigkeit (Bochner et al. 1994; Busse & Lemanske 2001) bzw. in Sputumproben (Zeibecoglou et al. 2000) asthmakranker Patienten. Die am Entzündungsprozess beteiligten Leukozyten verursachen durch Sekretion von Cytokinen und verschiedener weiterer Substanzen nicht nur die charakteristischen histologischen Veränderungen, sondern entfalten auch viele unterschiedliche auto-, para- und endokrine Effekte (Busse & Lemanske 2001). Hierzu ist eine Aktivierung der Leukozyten notwendig (Busse et al. 2001). Die Bedeutung der verschiedenen Leukozytenpopulationen sowie der von ihnen stammenden Mediatoren wird immer noch kontrovers diskutiert und Untersuchungen zur Differenzierung der Leukozytenpopulationen asthmakranker Patienten lieferten trotz zunehmender Erkenntnisse über die beteiligten Zellen und deren Interaktionen zum Teil widersprüchliche Daten (Bradley et al. 1992; Poston et al. 1992; Kay & Corrigan 1992; Bochner et al. 1994; Lukacs et al. 1995; Bousquet et al. 2000; Zeibecoglou et al. 2000; Sampson 2000; Busse & Lemanske 2001; Wenzel 2003; Peters-Golden 2004; Shi 2004; Dominguez Ortega et al. 2004; Ferreira 2004). Darüber hinaus wurden auch glatte Bronchialmuskulzellen als Ursprungsort proinflammatorischer Cytokine und Mediatoren genannt (Chung 2000). Entscheidend für die Aufrechterhaltung der Entzündung bzw. deren Eintritt in die chronische Phase ist jedoch das Gleichgewicht zwischen Überleben und Apoptose der beteiligten Zellen. Da die entzündlichen Prozesse und die damit zusammenhängenden Gewebsalterationen nur durch Apoptose der infiltrierenden aktivierten Leukozyten verringert bzw. eliminiert werden können (Ferreira 2004), wird angenommen, dass die persistierenden, sich selbst unterhaltenden Entzündungsprozesse, die für das chronische Asthma sowie das Remodeling verantwortlich sind, unter anderem durch Änderungen in der Apoptoseregulation bedingt sind (Bousquet et al. 2000). Diese ermöglichen eine verlängerte Lebensdauer der Leukozyten im Lungengewebe (Bochner et al. 1994). Darüber hinaus sind erhöhte Mitoseraten, Aktivierung und Migration der Leukozyten für die Persistenz und das Fortschreiten der inflammatorischen Prozesse essentiell (Ferreira 2004). Neben den bisher als auto- und parakrine Substanzen bekannten Interleukinen sowie den unter anderem als Entzündungsmediatoren bekannten Produkten des Prostaglandinstoffwechsels, ist ein weiterer Lipidmediator, das Sphingosin-1-Phosphat (S1P), Gegenstand intensiver Forschung (Cuvillier et al. 1996; Spiegel et al. 1998; Van

Brocklyn et al. 1998; Olivera et al. 1999; Lee et al. 1999; Spiegel et al. 2002; Johnson et al. 2002; Cuvillier 2002; Hla 2003; Spiegel & Milstien 2003a; Spiegel & Milstien 2003b; Watterson et al. 2003; Johnson et al. 2003; Le Stunff et al. 2004; Futerman & Hannun 2004; Peng et al. 2004). Es handelt sich hierbei um ein Produkt des zellulären Sphingolipidstoffwechsels, welches durch Phosphorylierung des Aminodialkoholes Sphingosin in einer durch das Enzym Sphingosinkinase (SPHK) katalysierten Reaktion (Hannun et al. 2001; Olivera & Spiegel 2001; Spiegel & Milstien 2003; Le Stunff et al. 2004) als Antwort auf unterschiedliche Reize, darunter Antigene, Cytokine und andere Mediatoren (Xia et al. 1999; Hannun et al. 2001; Olivera & Spiegel 2001; Hla 2003; Yamanaka et al. 2004), in vielen verschiedenen Zellen des Organismus generiert wird. Hierbei stehen S1P und das Sphingolipid Ceramid, welches einen metabolischen Vorläufer von S1P darstellt, über das Zwischenprodukt Sphingosin in einem dynamischen Gleichgewicht, dessen Verschiebung einer komplexen Regulation unterliegt (Olivera & Spiegel 2001; Maceyka et al. 2002).

Durch Untersuchungen insbesondere in den letzten zehn Jahren konnte nachgewiesen werden, dass S1P sowohl extrazellulär über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (S1P1-S1P5) (Hla 2001; Meyer zu Heringdorf et al. 2001) als auch über intrazellulär vermittelte Effekte (Van Brocklyn et al. 1998; Olivera et al. 2003) an der Regulation von Migration, Chemotaxis, Wachstum und Lebensdauer unterschiedlicher Zelltypen maßgeblich beteiligt ist (Wang et al. 1997; Spiegel & Milstien 2000; Idzko et al. 2002; Kaneider et al. 2002; Cinque et al. 2003; Hla 2003; Lee et al. 2004; Le Stunff et al. 2004; Roviezzo et al. 2004; Wu et al. 2004). Cuvillier et al. (1996) beobachteten als erste den anti-apoptischen Effekt einer Verschiebung des intrazellulären Gleichgewichtes zwischen Ceramid und S1P in Richtung von S1P. Darüber hinaus wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen die Beteiligung von S1P am Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration (Mattie et al. 1994; Choi et al. 1996; van Koppen et al. 2001; Young & Nahorski 2002), welcher unter anderem sowohl für die Kontraktion glatter Muskelzellen als auch für die Degranulation von Mastzellen essentiell ist, nachgewiesen. An Mastzellen wurde von Choi et al. (1996) sowie von Melendez et al. (1998) und Melendez & Khaw (2002) die Beteiligung von S1P an der durch den IgE-Rezeptor FcεRI vermittelten Calciummobilisierung beschrieben; zusätzlich wiesen Prieschl et al. (1999) den autokrinen, aktivierenden Effekt von S1P auf Mastzellen nach. Diese Erkenntnisse ließen eine Funktion von S1P als potentieller proinflammatorisch wirkender Mediator in der Pathogenese allergisch-entzündlicher Prozesse vermuten, was Ammit et al. (2001) dazu veranlasste, durch Messung des S1P-Gehaltes in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit asthmakranker sowie gesunder Personen nach Allergenprovokation die Beteiligung von S1P speziell an der Pathogenese des allergischen Asthmas zu untersuchen. Hierbei wurden signifikant erhöhte S1P-Werte in den Atemwegen der asthmakranken Personen gemessen.

Des Weiteren konnte dieselbe Arbeitsgruppe die S1P-Rezeptoren S1P1, -3, -5 und -6 auf glatten Bronchialmuskelzellen sowie in vitro den mitogenen Effekt von S1P auf diese Zellen nachweisen (Ammit et al. 2001). Trotz der vorliegenden Erkenntnisse über einen Einfluss von S1P auf die Regulation inflammatorischer Prozesse bzw. die Entstehung allergischen Asthmas wurden, mit Ausnahme der genannten Studien an Mastzellen, bisher keine Untersuchungen zu den an der S1P-Produktion bei asthmatischen Erkrankungen beteiligten Zelltypen durchgeführt. Die experimentell durchgeführte inhalative Allergenprovokation sensibilisierter Individuen stellt eine gute Möglichkeit dar, um pathophysiologische und –histologische Vorgänge im Verlauf einer asthmatischen Erkrankung zu untersuchen (Bochner et al. 1994; Bousquet et al. 2000). Ein adäquates Tiermodell stellt hierbei die Sensibilisierung mit nachfolgender Provokation von Brown-Norway (BN)-Ratten durch Ovalbumin (OVA) dar, da hier das humane akute, allergische Asthma in verschiedenen Punkten reproduziert wird (Bochner et al. 1994; Singh et al. 2002): Nach erfolgter Immunisierung werden hohe IgE-Spiegel erreicht und es liegt eine genetische Prädisposition zur Entwicklung einer TH2-betonten Immunantwort mit vorwiegend eosinophiler Infiltration sowie einem typischen Verlauf mit Ausbildung einer Früh- und Spätreaktion, wie sie bei dem größten Teil asthmatischer Menschen beobachtet wird, vor (Schneider et al. 1997; Bousquet et al. 2000; Sirois & Bissonette 2001; Hylkema et al. 2002; Peters-Golden 2004).

Das BN-Modell wurde in dieser Arbeit dazu genutzt, zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Allergenprovokation entnommenes Lungengewebe sowie BAL-Material auf die Expression des S1P generierenden Enzymes SPHK zu untersuchen. Die nachgewiesene Expression von SPHK bzw. SPHK-Isoformen erlaubt Rückschlüsse auf die Produktion von S1P. Als Kontrolle dienten sensibilisierte Tiere, die allergenfreie, 0,9%ige Natriumchlorid (NaCl)-Lösung per inhalationem anstelle der Allergenprovokation mit OVA verabreicht bekamen. Zum Vergleich der SPHK-mRNA-Expression der asthmatischen Tiere gegenüber der Kontrollgruppe wurden Gewebeproben beider Gruppen in der quantitativen Reverse-Transcription-PCR (qRT-PCR) eingesetzt, welche eine semiquantitative Bestimmung der SPHK-mRNA-Mengen ermöglichte. Da bisher von Ammit et al. 2001 lediglich humanes BAL-Material auf die vorhandene Menge an S1P nach Allergenprovokation untersucht wurde, sind die Zellen, welche S1P in asthmatischen Atemwegen generieren, bisher unbekannt. Zusätzlich ist ungeklärt, ob es im Verlauf allergischen Asthmas zum Einwandern SPHK1-exprimierender Zellen kommt. Um herauszufinden, welche Zellspezies in den peripheren Atemwegen asthmakranker sowie gesunder Tiere an der Produktion von S1P beteiligt sind und ob im Verlauf einer allergisch bedingten Atemwegsentzündung ein Anstieg in der S1P-Produktion oder eine Vermehrung S1P-produzierender Zellen vorliegt, wurden in dieser Untersuchung Gefrierschnitte von nach Allergenprovokation bzw. Inhalation von NaCl-

Lösung entnommenem Lungengewebe angefertigt und diese immunhistochemisch unter Einsatz eines Antiserums gegen SPHK-1a sowie Antiseren gegen zelltypspezifische Marker unterschiedlicher Leukozytenspezies untersucht (Doppelimmunfluoreszenz).

# Literaturübersicht

## *Allergisches Asthma*

### Pathophysiologie

Die Inhalation spezifischer Antigene löst bei sensibilisierten Individuen eine verstärkte entzündliche Reaktion der Atemwege aus, welche durch eine, für das allergische Asthma charakteristische Aktivierung von T-Helfer-Lymphozyten des Typ 2 (TH2-Zellen) verursacht wird (Ferreira 2004). Diese wandern unmittelbar nach ihrer Aktivierung in die betroffenen Lungenbezirke ein (Ferreira 2004) und sind in den Atemwegen allergischer Asthmatiker auch im Ruhezustand kontinuierlich aktiviert (Cohn et al. 2004). Sie spielen, bedingt durch die Sekretion der TH2-spezifischen Cytokine Interleukin (IL-) -4, -5, -6, -9 und -13 für die typischen pathophysiologischen Abläufe des allergischen Asthmas eine zentrale Rolle (Elias et al. 1999; Bousquet et al. 2000; Busse & Lemanske 2001; Cohn et al. 2004; Fireman 2003). Gleichzeitig findet durch die TH2-typischen Cytokine eine Inhibition der Cytokinproduktion durch TH1-Zellen statt, so dass bei allergischen Asthmatikern von einer Imbalance des TH1-/TH2-Gleichgewichtes mit Ausbildung einer verstärkten TH2-Antwort ausgegangen wird, welche unter anderem zu einem für allergisches Asthma charakteristischen histologischen Bild beiträgt (Busse et al. 2001; Sirois & Bissonnette 2001; Hylkema et al. 2002; Ferreira 2004; Peters-Golden 2004). Diese Befunde konnten Robinson et al. (1993) durch die Untersuchung des Cytokinmusters in BAL-Proben asthmatischer Patienten unterstützen. Inhalativ aufgenommene Antigene werden von dendritischen Zellen nach Phagozytose auf deren Oberfläche präsentiert, was nach Erstkontakt mit dem Antigen eine Proliferation und Differenzierung von CD4-positiven Lymphozyten hervorruft (Ferreira 2004), wobei in erster Linie antigenspezifische TH2-Zellen entstehen. Die dadurch vermehrt abgegebenen Cytokine vom TH2-Typ sowie weitere, kostimulatorisch wirksame Substanzen bewirken unter anderem bei den Immunglobulin (Ig-) -produzierenden B-Lymphozyten einen Wechsel der Immunglobulinklasse von IgM zu IgE (Busse & Lemanske 2001; Ferreira 2004; Fireman 2003). Immunglobuline vom Typ IgE binden mit ihrem F<sub>c</sub>-Ende an die auf der Oberfläche von Mastzellen exprimierten Fcε-Rezeptoren Fcε1 bzw.-II, was im Falle hoher IgE-Konzentrationen zu deren Absättigung führt. Kommt es zu erneuter Antigeninhalation, trifft das Antigen auf in der Bronchialschleimhaut lokalisierte, durch Bindung von allergenspezifischen IgE-Molekülen sensibilisierte Mastzellen, wobei benachbarte Fcε-Rezeptoren durch Bindung des Antigens kreuzvernetzt werden. Diese Kreuzvernetzung führt

zur Aktivierung der Mastzelle und löst eine Signalkaskade aus, die zur Freisetzung präformierter Mediatoren aus cytoplasmatischen Granula führt (Mastzelldegranulation) (Busse & Lemanske 2001; Fireman 2003), wobei die Freisetzung von Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-Ionen aus intrazellulären Speichern eine zentrale Rolle spielt. Dabei sind die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen noch nicht vollständig bekannt (Melendez & Khaw 2002), bzw. existieren neben dem bisher vermuteten Inositol-Trisphosphatweg weitere, S1P-abhängige Aktivierungswege (Choi et al. 1996; Mattie et al. 1994; Prieschl et al. 1999; Jolly et al. 2004).  $\text{Fc}\epsilon\text{l}$ -Rezeptoren wurden ebenfalls auf der Oberfläche anderer Zellen, darunter Lymphozyten, eosinophile Granulozyten, Makrophagen und Blutplättchen, entdeckt (Busse & Lemanske 2001). Es ist aber noch nicht geklärt, ob auch bei diesen Zellen eine direkte Aktivierung durch Allergenbindung erfolgt (Bousquet et al. 2000). Die von aktivierten Mastzellen sezernierten Mediatoren Histamin, verschiedene Leukotriene sowie weitere Cytokine sind als proinflammatorische Substanzen bekannt und verursachen durch ihre vasodilatatorische und permeabilitätssteigernde Wirkung die Schwellung und Ödematisierung der Bronchialschleimhaut sowie eine Exsudation von Plasma in die Lumina der Atemwege. Ein weiterer cytokinvermittelter Effekt ist die Kontraktilitätssteigerung glatter Bronchialmuskulaturzellen. Der daraus resultierende Bronchospasmus trägt zusätzlich zur Verringerung des Atemwegsdurchmessers bei. Da diese unmittelbar nach Antigeninhalation auftretenden, als allergische Sofortreaktion bezeichneten reversiblen Veränderungen in erster Linie durch die von Mastzellen stammenden Mediatoren hervorgerufen werden (Jeffery 1998), nehmen diese mit zunehmendem Abbau dieser Substanzen ab (Ferreira 2004). Gleichzeitig kommt es jedoch zur cytokinvermittelten Aktivierung und Einwanderung verschiedener anderer Leukozytenpopulationen aus dem peripheren Blut. Dieser Vorgang ist von der Ausbildung von Adhäsionsmolekülen am Gefäßendothel abhängig (Bousquet et al. 2000); ein ebenfalls cytokinabhängiger Effekt. Die rekrutierten Leukozyten tragen ihrerseits durch Sekretion weiterer Cytokine und aufgrund vielfältiger interzellulärer Wechselwirkungen zur Entwicklung der allergischen Spätreaktion bei, welche durch Aufrechterhaltung und gegebenenfalls Verstärkung der bronchialen Entzündung gekennzeichnet ist. Die Persistenz großer Leukozytenansammlungen und damit der entzündlichen Veränderungen sind das Ergebnis erhöhter Mitose- und Migrationsfähigkeit, verlängerter Lebensdauer und verminderter Apoptose der infiltrierenden Zellen. Schwere und Dauer der entzündlichen Prozesse hängen folglich in hohem Maße von der Regulation der genannten Faktoren durch die ins Gewebe abgegebenen Mediatorsubstanzen ab (Ferreira 2004). Aufgrund der am Ende der Sensibilisierungsphase stattfindenden Differenzierung CD4-positiver Lymphozyten zu antigenspezifischen T-Gedächtniszellen sowie der Aktivität antigenspezifischer, IgE-produzierender B-Zellen, welche sich in peripheren lymphatischen Organen oder im betroffenen Gewebe aufhalten, kommt es im Falle einer zweiten

Antigenexposition nach beschleunigter Phagozytose und Antigenpräsentation durch dendritische Zellen zu einer beschleunigten und verstärkten Immunantwort (Ferreira 2004). Unter dem Einfluss TH2-abhängiger Cytokine werden im Knochenmark ruhende eosinophile Granulozyten angelockt, welche durch die Abgabe toxischer Proteine zu einer Schädigung des respiratorischen Gewebes beitragen. Des Weiteren kommt es zur Aktivierung und Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, welche neben der Phagozytose sich bildender Antigen-Antikörperkomplexe durch Abgabe von weiteren Cytokinen die Entzündungsreaktion verstärken und verlängern (Ferreira 2004). Als Folge der zu massiven Gewebsalterationen führenden, anhaltenden Entzündungsprozesse kommt es in vielen Fällen zu irreversiblen, strukturellen Veränderungen der zentralen und peripheren Atemwege, welche durch Schädigungen des respiratorischen Epithels, einer subepithelialen Hyperplasie von Myofibroblasten, einer Kollagensynthese-abhängigen Verdickung der Lamina reticularis, einer Dyskrinie aufgrund von Hyperplasie der Becherzellen und mukösen Bronchialdrüsen, einer Hypertrophie und -plasie der glatten Bronchialmuskulatur und einer Infiltration der Bronchialschleimhaut mit Leukozyten gekennzeichnet sind (Jeffery 1998; Elias et al. 1999; Bousquet et al. 2000; Fireman 2003; Leung et al. 2004; Tillie-Leblond et al. 2005). In diesem Stadium ist ein chronischer Zustand der Krankheit erreicht, in dem sich die entzündlichen Prozesse auch in Abwesenheit des Allergens selbst aufrechterhalten und eine irreversible Verringerung des Atemwegsdurchmessers vorliegt (Jeffery 1998; Fireman 2003). Nicht jeder Fall chronischen Asthmas zeigt jedoch strukturelle, irreversible Veränderungen im Sinne des Remodeling. Dies macht deutlich, dass die hierzu führenden, komplexen Vorgänge noch nicht vollständig geklärt sind (Elias et al. 1999).

## **Zeitverlauf**

Im Verlauf einer allergisch bedingten Asthmaerkrankung kann auf die Frühreaktion eine Spätreaktion folgen (Ferreira 2004), wobei die Spätreaktion nicht jeden Erkrankten betrifft (Jeffery 1998; Bousquet et al. 2000) und aufgrund der oben genannten, für deren Auftreten und Verlauf verantwortlichen, zahlreichen Faktoren unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann. Die unmittelbar nach Antigeninhalation einsetzende Frühreaktion, bei der die Anwesenheit aktivierter Mastzellen und deren abgegebener Mediatoren im Vordergrund steht, führt zu einer transienten Verringerung des Atemwegsdurchmessers; dieser Zustand normalisiert sich nach ca. 1 Stunde. Die darauf folgende Spätreaktion, welche durch die Ansammlung eingewanderter, aktivierter Leukozyten unterschiedlicher Herkunft charakterisiert ist, tritt ca. 5-6 Stunden (Busse & Lemanske 2001; Ferreira 2004), nach Beobachtungen anderer Autoren, welche auf Untersuchungen von Lungengewebebeobachtungen asthmakranker Menschen basieren, 6-9 Stunden (Bousquet et al. 2000) nach



Antigeninhalation ein und klingt nach maximal 24 Stunden wieder ab. Tritt im Verlauf der Spätreaktion jedoch keine Verminderung der Anzahl infiltrierender Leukozyten durch Abnahme von Migration, Überlebensdauer und Vermehrung ein, sondern überwiegen die sich selbst aufrechterhaltenden inflammatorischen Prozesse, entwickelt sich die sogenannte verlängerte Spätreaktion, welche in den chronischen Zustand der Erkrankung führt (Bousquet et al. 2000).

## **Beteiligung und Bedeutung immunkompetenter Zellen**

Zahlreiche Untersuchungen zur Pathohistologie des allergischen Asthmas, die sich entweder mit der Analyse von Zellen aus BAL-Flüssigkeit (Lamblin et al. 1998), Sputum (Jatakanon et al. 1999; Zeibecoglou et al. 2000; Dominguez-Ortega et al. 2004 ) oder Biopsieproben (Bradley et al. 1991; Gundel et al. 1991; Poston et al. 1992) asthmakranker Individuen beschäftigten, lieferten bezüglich der Rolle der beteiligten Leukozytenpopulationen zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. Als gesichert gilt jedoch, dass aufgrund der direkten, antigenvermittelten Aktivierung ortsständiger Mastzellen diese die Haupteffektorzellen für die allergische Sofortreaktion, in deren Verlauf die mediatorabhängige Rekrutierung weiterer Leukozyten erfolgt, darstellen (Lamblin et al. 1998; Bousquet et al. 2000; Busse & Lemanske 2001; Ferreira 2004; Fireman 2003). Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen deuten darauf hin, dass akutes Asthma ein komplexes Zusammenspiel vieler verschiedener Leukozytenpopulationen darstellt (Boschetto et al. 1989; Kay & Corrigan 1992; Lukacs et al. 1995; Bousquet et al. 2000; Busse & Lemanske 2001). In immunhistochemischen Untersuchungen von Biopsieproben der Bronchialschleimhaut allergischer Asthmatiker wiesen Bradley et al. (1991) erhöhte Zahlen aktivierter eosinophiler Granulozyten sowie aktivierter T-Lymphozyten nach. Untersuchungen von Poston et al. (1992) kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Hier wurde zusätzlich eine erhöhte Anzahl von Makrophagen, die phänotypische Ähnlichkeiten mit Blutmonozyten zeigten, beobachtet.

## ***Eosinophile Granulozyten***

Eine Erhöhung der Anzahl eosinophiler Granulozyten wurde in zahlreichen weiteren Studien (Kay & Corrigan 1992; Lamblin et al. 1998), die zum Teil unterschiedlich schwere Fälle des allergischen Asthmas untersuchten (Jatakanon et al. 1999; Zeibecoglou et al. 2000), sowohl im Lungengewebe als auch in Sputumproben (Dominguez Ortega et al. 2004; Leung et al. 2004; Tillie-Leblond et al. 2005) bestätigt. Durch die Sekretion toxischer Proteine und von Lipidmediatoren und tragen sie zur Schädigung des Bronchialepithels und zur Entstehung

entzündlicher Veränderungen bei und sind als eine der Haupteffektorzellen des akuten Asthmas bekannt (Kay & Corrigan 1992; Sampson 2000; Shi 2004). Leukotaktisch wirkende TH2-Mediatoren bewirken den Übertritt eosinophiler Granulozyten aus dem Knochenmark ins Gefäßsystem. Deren Austritt aus dem peripheren Blut steht mit einer erhöhten Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 durch das Gefäßendothel im Zusammenhang (Hylkema et al. 2002).

## ***Neutrophile Granulozyten***

Zur Rolle von neutrophilen Granulozyten bei akutem allergischen Asthma liegen bisher weniger Erkenntnisse vor. Verschiedene Arbeitsgruppen wiesen einen Anstieg neutrophiler Granulozyten im Lungengewebe von Individuen mit schwerem Asthma, besonders bei plötzlichem Auftreten, nach (Gundel et al. 1991; Lamblin et al. 1998; Jatakanon et al. 1999; Wenzel et al. 1999; Linden 2001; Wenzel 2003; Leung et al. 2004). Dieser Anstieg wurde in Untersuchungen von Lamblin et al. (1998), Jatakanon et al. (1999) sowie Gundel et al. (1991) und Boschetto et al. (1989) besonders in der Akutphase schweren Asthmas beobachtet; darüber hinaus berichtet Sampson (2000) von einer Erhöhung der Neutrophilenzahlen sowohl bei Patienten mit akutem als auch mit chronischem Asthma. In diesem Zusammenhang wies er eine erhöhte Überlebenszeit dieser Zellspezies aufgrund einer Verminderung apoptotischer Prozesse nach. Hylkema et al. (2002) wiesen in Untersuchungen an zwei verschiedenen Ovalbumin-sensibilisierten Rattenstämmen eine Korrelation zwischen erhöhter Expression des Adhäsionsmoleküls E-Selectin am pulmonalen Gefäßendothel und Anstieg der Anzahl infiltrierender neutrophiler Granulozyten nach Antigenprovokation nach. Ebenfalls im Blut und im marginalen Gefäßpool sensibilisierter und allergenprovozierter Ratten konnten Schuster et al. (1999) eine Erhöhung der Anzahl neutrophiler Granulozyten nachweisen. Über die Auslöser des Neutrophileninflux herrscht jedoch noch Unklarheit (Tillie-Leblond et al. 2005). Übereinstimmend wird vermutet, dass neutrophile Granulozyten durch die Abgabe unterschiedlicher Mediatoren und toxischer Produkte zur Schädigung des respiratorischen Epithels, der bronchialen Hyperreagibilität und der Erhöhung der epithelialen und endothelialen Permeabilität beitragen (Kay & Corrigan 1992; Schneider et al. 1997; Tillie-Leblond et al. 2005) sowie eine Rolle beim Prozess des Remodeling spielen. Durch die Abgabe neutrophiler Elastase wird die Entstehung stark muköser Schleimpfropfen in den Atemwegslumina begünstigt (Tillie-Leblond et al. 2005). Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen konnte von den Arbeitsgruppen von Bradley et al. (1991) sowie Poston et al. (1992) im Gewebe asthmatischer Lungen kein Anstieg der Anzahl neutrophiler Granulozyten nachgewiesen werden.

## **Makrophagen**

Makrophagen repräsentieren physiologischerweise die Mehrheit phagozytierender Zellen im unteren Respirationstrakt (Sibille & Reynolds 1990; Sirois & Bissonette 2001). Sie sind sowohl an unspezifischen als auch an spezifischen Abwehrreaktionen beteiligt und kommen in den zentralen und peripheren Atemwegen im Interstitium und Lumen der Alveolen und Bronchien vor. Die im Lungeninterstitium lokalisierten Makrophagen nehmen 40% des Makrophagenpools im Gesamtorganismus ein (Laskin et al. 2001). Peters-Golden (2004) sieht den Alveolarmakrophagen als Haupteffektorzelle im Abwehrsystem der luftleitenden Atemwege an. Aufgrund ihrer hohen Phagozytosefähigkeit und der großen Anzahl sekretorischer Produkte, welche sowohl chemotaktische als auch wachstumsfördernde oder -hemmende Effekte auf andere Zellen ausüben können (Sibille & Reynolds 1990), wird den Makrophagen eine wichtige Rolle in der Pathogenese des allergischen Asthmas eingeräumt (Barnes 1989; Vignola et al. 1994; Viksman et al. 1997; Laskin et al. 2001). Eine rapide Aktivierung von Makrophagen ist besonders in der Frühphase der allergischen Reaktion zu beobachten (Bousquet et al. 2000). In funktionellen Untersuchungen an Alveolarmakrophagen konnten Menard und Bissonette (2000) nach Antigenexposition eine gesteigerte Produktion proinflammatorischer Mediatoren nachweisen. Verschiedene Arbeitsgruppen berichten von einem signifikanten Anstieg von Makrophagen in der Lunge im Falle akuten, schweren Asthmas (Poston et al. 1992; Bochner et al. 1994; Wenzel et al. 1999), wobei sich die eingewanderten Zellen in einem aktivierten Zustand befinden (Poston et al. 1992; Laskin et al. 2001), was von Viksman et al. (1997) durch den Vergleich der Expression verschiedener Oberflächenmarker von Makrophagen Asthmakranker mit denen einer gesunden Kontrollgruppe sowie im Vergleich mit peripheren Blutmonozyten bestätigt wurde. Die Aktivierung von Makrophagen im Verlauf allergischer Atemwegserkrankungen geht mit einer veränderten Genexpression einher (Vignola et al. 1994; Laskin et al. 2001). In Abhängigkeit von ihrer Lokalisation existieren in der Lunge morphologisch und funktionell heterogene Makrophagensubpopulationen (Sibille & Reynolds 1990; Poulter & Burke, 1996; Johansson et al. 1997; Zeibecoglou et al. 2000; Laskin et al. 2001). Während von Sibille & Reynolds (1990) alveoläre, interstitielle, intravaskuläre und im Atemwegslumen lokalisierte Subpopulationen genannt werden, unterscheiden andere Autoren lediglich alveoläre und interstitielle Makrophagen (Poulter & Burke 1996; Laskin et al. 2001). Johansson et al. (1997) folgerten aus morphologischen und funktionellen Untersuchungen an alveolären und interstitiellen Makrophagen, dass interstitielle Makrophagen eigene, immunkompetente Zellen darstellen und nicht als Vorläufer für Alveolarmakrophagen anzusehen sind. Die funktionellen Unterschiede der beiden Makrophagensubpopulationen wurden von Laskin et al. (2001) untersucht und ergeben sich aus deren unterschiedlicher Lokalisation:

Alveolarmakrophagen treten als erste immunkompetente Zellen mit inhalativ aufgenommenen Substanzen oder Mikroorganismen in Kontakt und sind daher in hohem Maße zur Phagozytose befähigt. Zusätzlich zeigen sie chemotaktische und sekretorische Aktivität. Morphologisch unterscheiden sie sich von den interstitiellen Makrophagen durch ihre Größe und das geringere Kern-/Cytoplasmaverhältnis. Interstitielle Makrophagen dagegen, welche den größeren Anteil der Gesamtmakrophagen in der Lunge ausmachen, zeigen wesentlich höhere sekretorische und somit immunregulatorische Leistungen und entfalten aufgrund ihres engeren Kontaktes zum umgebenden Gewebe eine stärkere Wirkung auf benachbarte Zellen. Des Weiteren berichten Johannsson et al. (1997) von einer signifikant höheren proliferativen Kapazität im Vergleich mit Alveolarmakrophagen, was auf die Bedeutung der interstitiellen Makrophagen bei der Regulation des Makrophagenpools der Lunge hinweist (Laskin et al. 2001). Beide Subpopulationen sind ihrerseits bezüglich Zellmorphologie und –funktion heterogen: Es kommen sowohl unter den Alveolar- als auch unter den interstitiell gelegenen Makrophagen eine Subpopulation reiferer Zellen von geringerer Dichte sowie eine Subpopulation weniger reifer Zellen höherer Dichte vor, wobei letztere eine höhere Aktivität in Bezug auf Cytokin- und Enzymsekretion, Phagozytose, Chemotaxis, Expression von Oberflächenmarkern und weitere zellspezifische Leistungen zeigen. Poulter und Burke (1996) gehen davon aus, dass die genannten funktionell verschiedenen Subpopulationen in einem physiologischen Mengenverhältnis zueinander vorkommen, woraus sich ein spezifisches Cytokinmuster ergibt, welches unter anderem die Aktivität von T-Lymphozyten beeinflusst. Untersuchungen derselben Arbeitsgruppe an Biopsie- und BAL-Proben von Patienten mit allergischen Lungenerkrankungen zeigten ein vom physiologischen Zustand abweichendes Verhältnis der beiden Makrophagenpopulationen. In der hieraus resultierenden möglichen Verschiebung des Cytokinmusters sehen die genannten Autoren eine der Hauptursachen für die Pathogenese allergischer Lungenerkrankungen. Zusätzlich zu der häufig genannten proinflammatorischen Aktivität von Makrophagen gehen unterschiedliche Arbeitsgruppen davon aus, dass die verschiedenen Makrophagenpopulationen ebenfalls die Fähigkeit zur Reduktion inflammatorischer Prozesse besitzen und dadurch in der Lage sind, vor einer übersteigerten Immunantwort und den damit verbundenen schädigenden Einflüssen zu schützen (Zeibecoglou et al. 2000; Careau & Bissonette 2004; Peters-Golden 2004). Als Ursache hierfür wird eine Verschiebung des Th1-/Th2-Cytokinmusters durch den Einfluss von Alveolarmakrophagen vermutet (Peters-Golden 2004). Der Alveolarmakrophage scheint also durch seine ambivalenten Fähigkeiten, entzündliche Prozesse in der Lunge zu beeinflussen, regulatorische Funktionen ausüben zu können (Zeibecoglou et al. 2000). Ob die einzelne Zelle pro- oder antiinflammatorische Wirkung entfaltet, hängt von der individuellen Situation ab (Zeibecoglou et al. 2000; Peters-Golden 2004). Hierbei scheint es unter anderem von

Bedeutung zu sein, ob der Alveolarmakrophage apoptotische Zellen in Form von sog. „apoptotic bodies“ phagozytiert, wodurch antiinflammatorische Wirkungen ausgelöst werden, oder er opsonierte Partikel aufnimmt, was proinflammatorische Auswirkungen hat (Peters-Golden 2004). Des Weiteren konnten Careau und Bissonnette (2004) durch Übertragung von Alveolarmakrophagen Ovalbumin (OVA)-sensibilisierter Individuen innerhalb verschiedener Rattenstämme und anschließender Provokation mit Methacholin Hinweise auf eine genetisch determinierte Neigung zur Entwicklung eines pro- oder antiinflammatorischen Milieus erbringen. Ob die durch Alveolarmakrophagen erzielten Wirkungen nur durch lösliche Mediatoren vermittelt werden oder ob hierbei zusätzlich Zell-zu-Zell-Interaktionen beteiligt sind, ist, ebenso wie die Natur der beteiligten Mediatoren, bisher ungeklärt (Peters-Golden 2004).

## ***Das Brown-Norway-Modell***

Der im Brown-Norway-Modell eingesetzte Rattenstamm wurde bereits in zahlreichen Untersuchungen zu den Pathomechanismen des allergischen Asthmas eingesetzt. Die besondere Eignung des BN-Stammes als Modell zur Untersuchung des allergischen Asthmas erklärt sich dadurch, dass sensibilisierte BN-Ratten nach Antigenprovokation besonders deutlich ausgeprägte charakteristische Symptome des allergischen Asthmas zeigen. In vergleichenden Studien an BN-, Sprague-Dawley- (SD) und Lewis- (L) Ratten konnten Singh et al. (2002) bei BN-Ratten eine signifikant stärkere Erhöhung des Atemwegswiderstandes, der Gesamtzellzahl in gewonnener bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BAL) sowie stärker ausgeprägte pathohistologische Veränderungen der Atemwege nach Sensibilisierung und Provokation mit Hausstaubmilben (HDM)-Antigen nachweisen. Ähnliche Beobachtungen machten Careau et al. (2002) sowie Schneider et al. (1997) nach Verwendung von OVA- Antigen. Diese Eigenschaften des BN-Stammes sind Untersuchungen von Hylkema et al. (2002) zufolge zum Teil durch genetische Prädisposition zu einer verstärkten Th2-Antwort bedingt. Des Weiteren gehen die genannten Autoren von zusätzlichen, nicht-genetischen Faktoren, die zur Ausbildung einer allergischen Reaktion beitragen, aus. Die bei sensibilisierten BN-Ratten auftretenden Reaktionen sind in verschiedenen Punkten mit denen eines unter atopischem Asthma leidenden Menschen vergleichbar (Careau et al. 2002; Peters-Golden 2004): Nach Allergenexposition werden höhere, antigenspezifische IgE-Spiegel erreicht, es liegt eine Verschiebung des Th1-/Th2-Gleichgewichtes zugunsten einer verstärkten Th2-Antwort vor und es kommt bei den meisten Tieren zu einem charakteristischen Verlauf mit Ausbildung einer Früh- und Spätreaktion (Renzi et al. 1993; Sirois & Bissonnette 2001; Hylkema et al. 2002; Singh et al. 2002).

Sirois & Bissonnette (2001) verglichen die nach Allergenexposition vermehrt in der BAL-Flüssigkeit vorhandenen Makrophagen von BN-Ratten mit denen von allergieresistenten SD-Ratten bezüglich ihres Cytokinprofils und wiesen eine erhöhte Produktion bestimmter, für die Th2-betonte Immunantwort typischer Cytokine beim BN-Stamm nach, was auf die Bedeutung funktioneller Unterschiede der beteiligten Makrophagen für die Ausbildung einer allergischen Reaktion hinweist.

Andere Untersuchungen befassten sich mit zum Teil unterschiedlichen Ergebnissen mit den zellulären Reaktionen der tieferen Atemwege zuvor sensibilisierter BN-Ratten nach Allergenexposition. Übereinstimmend wurde eine signifikante Erhöhung der Gesamtleukozytenzahl sowie ein starker Influx eosinophiler Granulozyten beobachtet (Yu et al. 1995; Matsubara et al. 1997; Schneider et al. 1997; Schuster et al. 2000; Hylkema et al. 2002; Singh et al. 2002), welchen Hylkema et al. (2002) hauptsächlich auf die Produktion Th2-spezifischer Cytokine zurückführten. Schneider et al. (1997) untersuchten Anzahl und Zeitverlauf des Influx eosinophiler und neutrophiler Granulozyten im Lungenparenchym sowie in BAL-Proben und beobachteten einen Anstieg der Anzahl eosinophiler Granulozyten zwischen Tag 2 und 3, welcher mindestens über 6 Tage persistierte. Der bereits 3 Std. nach Antigenexposition in Lungenparenchym und BAL beobachtete Influx neutrophiler Granulozyten erreichte dagegen schon nach 24 Std. einen Höhepunkt und fiel nach 48 Std. rapide ab. Diese initiale Neutrophilie wurde von allen übrigen Arbeitsgruppen, welche OVA als Antigen einsetzten, ebenfalls beobachtet (Elwood et al. 1992; Renzi et al. 1993; Yu et al. 1995; Schuster et al. 2000; Careau et al. 2002; Hylkema et al. 2002); ein Effekt, welcher bei Verwendung von Sephadex (Matsubara et al. 1997; Birrell et al. 2002) und HDM-Antigen (Singh et al. 2002) nicht eintrat. Elwood et al. (1992) zeigten eine positive Korrelation zwischen Neutrophilenzahl und Atemwegshyperreagibilität. Weniger Übereinstimmungen ergaben sich bezüglich der Anzahl von Makrophagen in Lungengewebe und BAL. Schneider et al. (1997) bzw. Careau et al. (2002) berichten von einem, innerhalb von 48 bzw. 24 Std. nach Antigenprovokation einsetzenden Anstieg der Makrophagenzahl; eine Abnahme fand bei Schneider et al. (1997) erst nach einer stationären Phase von ca. 13 Tagen statt. Mononukleäre Zellen traten hier vor allem in Form von perivaskulären und peribronchialen Aggregaten auf. Bei Sirois & Bissonnette (2001) sowie Schuster et al. (2000) überstieg die Anzahl von Alveolarmakrophagen in der BAL-Flüssigkeit die anderer Leukozyten. Im Gegensatz hierzu konnten Hylkema et al. (2002) nach Verwendung von OVA keine Erhöhung der Makrophagenzahl feststellen. Yu et al. (1995) sowie Careau et al. (2002) sahen aufgrund ihrer Versuchsergebnisse an BN-Ratten die Vermutung bestätigt, dass Makrophagen im Verlauf akuten, allergischen Asthmas eine wichtige Quelle pro- und antiinflammatorischer Cytokine darstellen. In den genannten Untersuchungen zum Vergleich der Reaktionsbereitschaft unterschiedlicher Rattenstämme in Bezug auf Antigenkontakt

konnte eindeutig die besonders starke Bereitschaft des BN-Stammes zur Entwicklung allergischen Asthmas sowohl auf histologischer Ebene als auch durch Messung des Atemwegswiderstandes nachgewiesen werden. Sowohl bei unbehandelten als auch bei sensibilisierten Tieren wurden im Vergleich mit anderen Rattenstämmen signifikant höhere Leukozytenzahlen ermittelt (Singh et al. 2002). Schwierigkeiten traten beim BN-Stamm in Bezug auf die Bewertung der Versuchsergebnisse auf. So berichten Singh et al. (2002) bezüglich der Ausprägung allergischer Reaktionen von starken individuellen Schwankungen innerhalb einer Gruppe von BN-Ratten. Des Weiteren liegt, wie aus den Leukozytenzahlen der Kontrolltiere unterschiedlicher Stämme deutlich wird, auch bei unbehandelten Tieren eine hohe Bereitschaft zur Entwicklung entzündlicher Veränderungen im Lungengewebe vor.

## ***Sphingosin-1-Phosphat***

### **Herkunft und Vorkommen**

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) ist ein Produkt des zellulären Sphingolipidstoffwechsels. Als Sphingolipide wird eine der drei in eukaryonten Zellmembranen vorkommenden Lipidklassen bezeichnet, deren strukturelles Rückgrat Ceramid, eine Esterverbindung des Alkohols Sphingosin mit Palmitinsäure darstellt. Durch die Substituierung von Ceramid durch eine Vielzahl unterschiedlicher Substanzen entsteht die ca. 300-400 chemische Verbindungen umfassende Klasse der Sphingolipide (Hannun et al. 2001). Im Gegensatz zur Gruppe der Glycerolipide, welche als Substrate für den seit langem bekannten und gut erforschten Prostaglandinstoffwechsel dienen, wurde die Eigenschaft der Sphingolipide, über ihre Funktion als Strukturkomponenten der Zellmembran hinaus als bioaktive Moleküle zahlreiche Funktionen in Signaltransduktionsmechanismen wahrzunehmen, erst in den letzten 15 Jahren erkannt und untersucht. Die Bezeichnung „Sphingolipide“ erhielt die komplexe Gruppe von Lipiden im Jahr 1884 durch ihren Entdecker J.L.W. Thudichum, welcher diese erstmals aus Hirngewebsextrakten isolierte und damit in Anlehnung an die Figur der Sphinx aus der griechischen Mythologie den aufgrund der strukturellen Vielfalt und vieler offener Fragen als mysteriös empfundenen Charakter dieser Substanzklasse ausdrückte (Spiegel & Milstien 2003b; Futerman & Hannun 2004). Das Vorkommen der einzelnen Metaboliten des Sphingolipidstoffwechsels in einer Zelle ist an das Vorhandensein sowohl ihrer Vorläufer als auch der an den einzelnen Auf- und Abbaureaktionen beteiligten Enzyme gebunden, wobei in allen eukaryonten Zellen, deren Zellmembran Sphingomyelin enthält, Enzyme und somit auch Metaboliten des Sphingolipidstoffwechsels nachzuweisen sind (Hla 2003). Der in den

letzten Jahren gelungene Nachweis beteiligter Enzyme in verschiedenen Zellen (Karakashian et al. 2004; Marchesini et al. 2004) sowie deren Isolierung und Klonierung (Kohama et al. 1998; Olivera et al. 1998) trug dazu bei, die Erkenntnisse über die subzelluläre Lokalisation und Regulation des Sphingolipidstoffwechsels zu erweitern (Futerman & Hannun 2004). Sphingolipide bzw. S1P (Spiegel & Milstien 2003a) konnten nicht nur in Säugerzellen, sondern auch in Pflanzen und Zellen niederer Eukaryonten, wie Hefen, Schleimpilzen, Nematoden und Fliegen nachgewiesen werden (Spiegel & Milstien 2002). Durch Experimente an Hefezellen der Gattung *Saccharomyces cerevisiae* (Jenkins et al. 1997; Gottlieb et al. 1999; Alvarez-Vasquez et al. 2004) bzw. Pflanzenzellen (Coursol et al. 2003) konnte die Bedeutung der Sphingolipide für Funktion und Überleben der Zelle nachgewiesen und somit Hinweise darauf erbracht werden, dass Stoffwechsel- und Signaltransduktionsmechanismen der Sphingolipide evolutionär erhalten sind (Olivera & Spiegel 2001). Dies bestätigen auch Untersuchungen von Melendez et al. (2000), welche mithilfe der Sequenzanalyse des Enzymes Sphingosinkinase 1 (SPHK1) des Menschen und dessen Vergleich mit den entsprechenden Sequenzen, der in Maus-, Bakterien-, Hefe- und pflanzlichen Zellen vorkommenden Enzyme homologe Sequenzen nachwies. Aufgrund ihrer Eigenschaft als Strukturkomponenten von Zellmembranen kann davon ausgegangen werden, dass Sphingolipide ubiquitär im Organismus zu finden sind (Olivera & Spiegel 2001). Das Vorkommen von S1P sowie zahlreicher weiterer Metaboliten ist jedoch im Ruhezustand der Zelle durch konstant niedrige Konzentrationen, welche auf spezifische Reize hin mit dynamischen Schwankungen reagieren (Olivera et al. 1999; Pitson et al. 2000; Hla 2003; Le Stunff et al. 2004), gekennzeichnet und unterliegt entsprechend der Funktion dieser Moleküle in vielen unterschiedlichen Signaltransduktionsprozessen einer differenzierten Regulation, welche vom Zelltyp und deren Funktionszustand, der Anwesenheit aktivierender oder hemmender Faktoren sowie zahlreicher weiterer Umstände, die bisher nur zu einem geringen Teil aufgeklärt werden konnten, ab (Spiegel & Milstien 2003b; Futerman & Hannun 2004). Die Konzentration der jeweiligen Metaboliten kann hierbei auf unterschiedlichen Ebenen, wie durch Kontrolle der Enzymexpression, posttranslationale Modifikation oder allosterische Mechanismen, reguliert werden. Diese Mechanismen sind zum Teil zelltypspezifisch ausgeprägt (Futerman & Hannun 2004). S1P sowie S1P-spezifische Rezeptoren sind demnach in vielen unterschiedlichen Geweben zu finden (Hla 2003), wobei Untersuchungen zu Vorkommen und Funktion bisher für Schwann'sche Gliazellen (Chun 1999), Osteozyten (Lyons & Karin 2001), Oozyten (Paris et al. 2002), Mastzellen (Prieschl et al. 1999; Jolly et al. 2004; Urtz et al. 2004), Makrophagen (Melendez & Ibrahim 2004; Wu et al. 2004), neutrophile Granulozyten (Chuang et al. 2000; Niwa et al. 2000; MacKinnon et al. 2002) sowie Gefäßendothelzellen (Xia et al. 1999; Matsushita et al. 2004) vorliegen. Vergleichsweise hohe S1P-Spiegel wurden zudem



wiederholt in immunkompetenten Zellen, wie dendritischen Zellen, Mastzellen, Makrophagen, Monozyten sowie in Blutplättchen nachgewiesen (Ancellin et al. 2002; Hla 2003; Spiegel & Milstien 2003b; Goetzl et al. 2004; Lee et al. 2004). Die damit einhergehenden hohen S1P-Konzentrationen in Blutplasma und Lymphflüssigkeit (Hannun et al. 2001) weisen auf die Möglichkeit der Sekretion von S1P in den Extrazellulärraum hin, was durch Yatomi et al. (2001) bestätigt werden konnte. Der Mechanismus der Sekretion von S1P ist bisher unbekannt. Des Weiteren scheint die Fähigkeit zur Sekretion von S1P zelltypabhängig zu sein, da sie bei Zellspesies wie Endothelzellen und Fibroblasten nicht beobachtet werden konnte (Olivera et al. 1999). Die zelluläre Lokalisation von S1P und der daran beteiligten Stoffwechselwege wird zum Teil kontrovers diskutiert und ist bis heute Gegenstand intensiver Forschung. Innerhalb von Zellmembranen sind Sphingolipide, insbesondere Sphingomyelin (SM), eine Verbindung aus Ceramid und Phosphorylcholin, besonders in der äusseren Schicht vertreten (Ancellin et al. 2002; Hla 2003), wobei sich SM zum Teil in bestimmten Mikrodomänen (Caveolae) anreichern kann. Ein weiteres Reservoir für SM stellen die sogenannten „Lipid rafts“ dar. Hierbei handelt es sich ebenfalls um spezielle Mikrodomänen, welche durch Anreicherungen von Sphingolipiden und Cholesterol gekennzeichnet sind und aufgrund der Affinität von Cholesterol zu bestimmten Sphingolipiden entstehen (Munro 2003). Die Synthese der Lipid rafts findet im Golgiapparat statt. Mehrere kleine Mikrodomänen neigen zur Fusion. Dies führt zur Bildung größerer „Inseln“, welche als Plattformen für Signaltransduktionsprozesse dienen (Kolesnick 2002). Es wird davon ausgegangen, dass ca. 70% des gesamten zellulären SM in Lipid rafts lokalisiert ist (s. Abb.1).

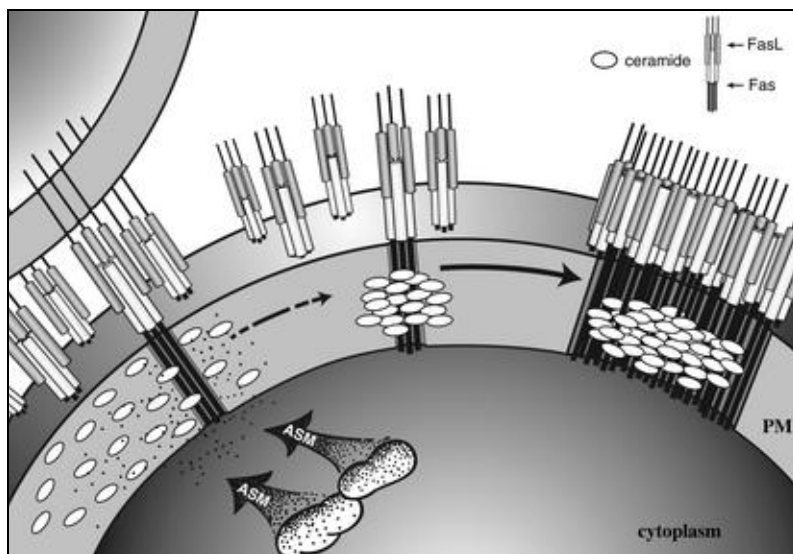


Abb. 1: Akkumulation von Sphingolipiden in "lipid rafts" der Zellmembran (Kolesnick 2002): Die Aktivierung saurer Sphingomyelinasen (ASM) führt in der Plasmamembran (PM) zur Hydrolyse von Sphingomyelin zu Ceramid (links), durch Zusammenlagerung von Ceramid-Molekülen (Mitte) entstehen ceramidhaltige „lipid rafts“ (rechts).

Da das S1P generierende Enzym SPHK1 zum größten Teil im Cytosol vorliegt (s. Abb. 2), kann es mithilfe eines Proteinkinase C-vermittelten Transportmechanismus zur inneren Schicht der Plasmamembran transloziert werden (Johnson et al. 2002; Pitson et al. 2003), wo unter anderem das Substrat Sphingosin (SP) durch schrittweisen Abbau der Membransphingolipide entsteht (Spiegel & Milstien 2003b). Der Transportmechanismus von SPHK kann, wie Untersuchungen von Rosenfeldt et al. (2001) zeigten, durch platelet-derived-growth-factor (PDGF) aktiviert werden. Obwohl S1P, wie Olivera et al. (1999) durch Markierung von S1P mit  $^{32}\text{P}_i$  zeigten, in erster Linie intrazellulär generiert wird, wurde in Untersuchungen von Ancellin et al. (2002) ein Export von ca. 5% SPHK1 in den Extrazellulärraum beobachtet, wodurch ebenfalls eine extrazelluläre Synthese von S1P möglich ist. Da im Extrazellulärraum ausreichend ATP als Phosphatquelle zur Verfügung steht, stellt das Vorkommen von SP hier den limitierenden Faktor dar. Die hierfür verantwortlichen Enzyme des Sphingolipidabbaus können von der Zelle aktiv sezerniert werden (Ancellin et al. 2002). Die intrazelluläre Reaktion von SP zu S1P läuft, da SPHK weder hydrophobe Transmembrandomänen noch Bindungsstellen für Membranphospholipide enthält, im Cytosol ab (Olivera & Spiegel 2001), in dem es aufgrund seiner polaren Eigenschaften in gelöster Form vorliegt (Hla 2003). Es wird angenommen, dass sich S1P zwischen unterschiedlichen intrazellulären Kompartimenten hin- und herbewegen kann (Olivera et al. 1999). Trotzdem kann es nicht selbstständig durch die Zellmembran diffundieren, was die Existenz eines Sekretionsmechanismus erfordert. Yatomi et al. (2001) gelang es, eine Sekretion von S1P durch Blutplättchen, Monozyten und Mastzellen nachzuweisen. Diese Fähigkeit scheint allerdings auf bestimmte Zellspezies beschränkt zu sein (Olivera et al. 1999). Ebenfalls weisen die Untersuchungen von Boujaoude et al. (2001), die den Transport von S1P durch das „cystic fibrosis transmembrane regulator“ (CFTR) Protein an transfizierten murinen C127 Epithelzellen untersuchten, auf eine selektive Aufnahme von S1P aus dem Extrazellulärraum hin. Bei diesem Protein handelt es sich um ein Protein aus der Familie der evolutionär erhaltenen ABC-Transporterfamilie, welche am Transmembrantransport von Lipiden beteiligt ist. Nach Abbau der komplexen Sphingolipide aus der Plasmamembran wird SP in Endo- oder Lysosomen ins Cytosol abgegeben, wo es zu S1P phosphoryliert werden kann; während die Substituierungsschritte zur Resynthese komplexerer Sphingolipide im Golgiapparat erfolgen (Gillard et al. 1998; Spiegel & Milstien 2003b; Futerman & Hannun 2004; Le Stunff et al. 2004b) (s. Abb. 2). Durch den Nachweis einer SPHK-Aktivität sowohl in der Kernhülle als auch im Nucleoplasma lieferten Kleuser et al. (2001) Beweise für die Produktion von S1P im Zellkern. Weitere Hinweise darauf gab der Nachweis eines Sphingomyelinzyklus im Zellkern durch Watanabe et al. (2004).

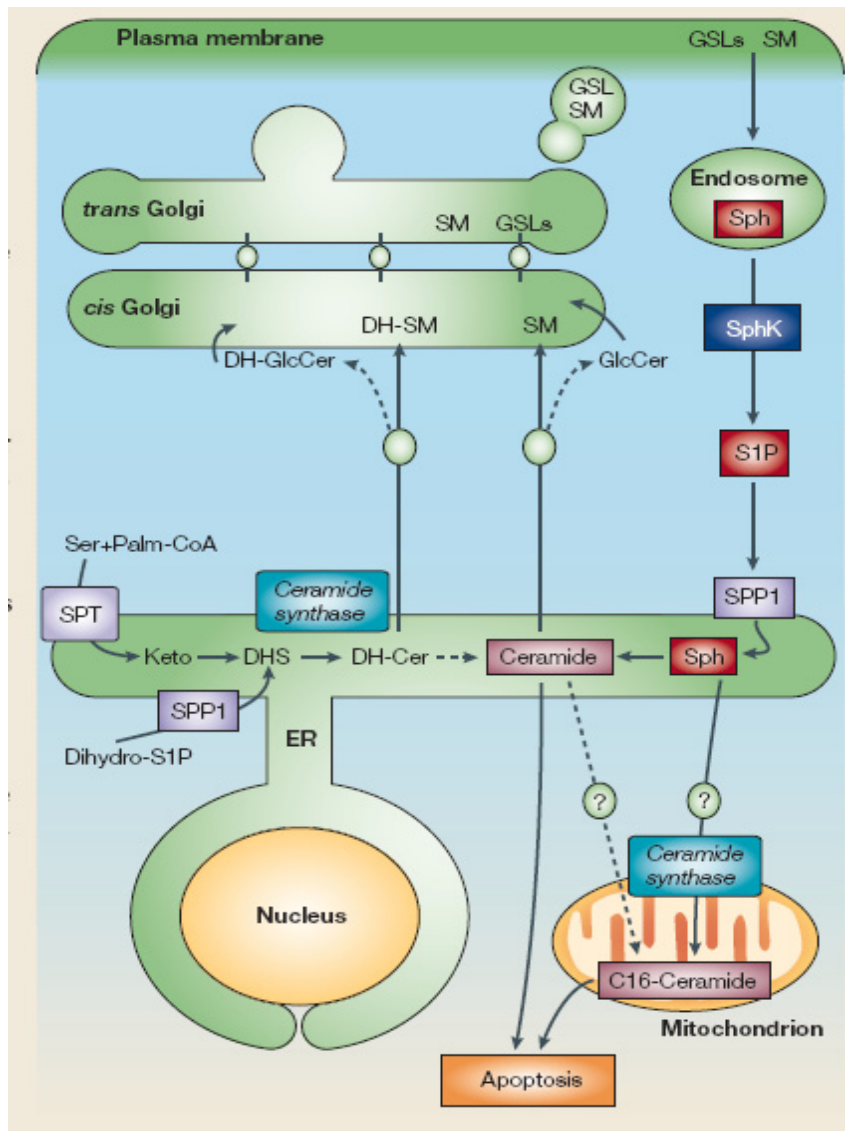


Abb. 2: Intrazelluläre Lokalisation des Sphingolipidstoffwechsels (Spiegel & Milstien 2003b): Nach Abbau der in der Zellmembran vorkommenden komplexen Sphingolipide (GSLs; SM) zu Sphingosin (Sph) wird dieses nach Aufnahme in Endosomen ins Cytosol transportiert, wo das Sphingosin-1-Phosphat (S1P) generierende Enzym Sphingosinkinase (SphK) lokalisiert ist. Der Abbau von S1P findet nach Dephosphorylierung durch das Enzym S1P-Phosphatase (SPP1) im endoplasmatischen Retikulum (ER) statt; das hierbei entstehende Ceramid dient sowohl als second messenger bei der Induktion von Apoptoseprozessen als auch zur Resynthese von Membransphingolipiden im Golgiapparat.

## Struktur und Synthese

Wie auch im Falle anderer Signalmoleküle unterliegt die zelluläre S1P-Konzentration einer engen Regulation (Spiegel & Milstien 2003b). Obwohl die am Stoffwechsel der Sphingolipide beteiligten Auf- und Abbauege seit vielen Jahren bekannt sind, konnten die wichtigsten beteiligten Enzyme erst in den letzten 15 Jahren isoliert bzw. geklont werden. Ein Kennzeichen des Sphingolipidmetabolismus ist die enge Verknüpfung der unterschiedlichen Stoffwechselwege untereinander, wobei das Produkt einer enzymatischen Reaktion als Substrat für eine weitere dienen kann (Hannun et al. 2001) und die meisten Reaktionen umkehrbar sind. S1P entsteht aus der Anlagerung einer Phosphatgruppe an die C<sub>1</sub>-Hydroxylgruppe des ungesättigten Aminodialkoholes Sphingosin, welcher aus 18 C-Atomen mit einer Doppelbindung zwischen C<sub>4</sub> und C<sub>5</sub> sowie einer Aminogruppe an C<sub>2</sub> und je einer Hydroxylgruppe an C<sub>1</sub> und C<sub>3</sub> aufgebaut ist. Durch Bildung einer Amidbindung mit einer Fettsäure entsteht Ceramid, welches als strukturelle Grundlage aller in Zellmembranen vorkommenden Sphingolipide dient (Hannun & Obeid 2002). Diese leiten sich durch Veresterung der endständigen Hydroxylgruppe von Sphingosin mit einer Vielzahl unterschiedlicher Moleküle ab (Futerman & Hannun 2004). So entsteht das häufig vorkommende Sphingolipid Sphingomyelin durch Veresterung von Ceramid mit Phosphorylcholin.

Bekannt sind zwei unterschiedliche Stoffwechselwege zur Entstehung der beteiligten Metaboliten (s. Abb. 3): Der katabole Stoffwechselweg sowie die *De-Novo*-Synthese (Olivera & Spiegel 2001). Der katabole Stoffwechselweg ist durch die schrittweise Hydrolyse von Membransphingolipiden bis zur Bildung von Ceramid gekennzeichnet. Das entstandene Ceramid kann seinerseits durch die Aktivität verschiedener Enzyme in seine Bausteine zerlegt werden. Zur Entstehung von SP wird zunächst die gebundene Fettsäure durch das Enzym Ceramidase entfernt. Da SP in Säugerzellen nur auf diesem Weg entsteht, wird es als ein rein kataboles Produkt aufgefasst (Hannun et al. 2001). Das so entstandene SP wird in Endosomen aufgenommen dient ebenfalls als Hauptsubstrat zur Resynthese von Membransphingolipiden, weshalb dieser Stoffwechselweg auch als „endocytotischer Recyclingweg“ bezeichnet wird (Gillard et al. 1998). Die Entstehung von SP auf diesem Weg ist ein Teil der ständig ablaufenden, physiologischen Auf- und Abbauprozesse der Plasmamembran, welche sich im Falle einer phagozytischen Zelle in einer Stunde komplett erneuert (Gillard et al. 1998). Den entscheidenden Schritt zur Generierung von S1P stellt die Phosphorylierung von SP, katalysiert durch das Enzym SPHK, dar. Hohe SP-Spiegel wirken sich toxisch auf Zellen aus; durch die Phosphorylierung zu S1P oder alternativ durch die Rückreaktion zur Bildung von Ceramid werden diese auf einem niedrigen Niveau gehalten (Hannun et al. 2001; Hla 2003). Die *De-Novo*-Synthese von Sphingolipiden beginnt mit der Synthese des Vorläufermoleküles Ceramid auf der cytosolischen Seite des

endoplasmatischen Reticulum (ER) durch Kondensation der Aminosäure Serin mit Palmitoyl-CoA und nachfolgender Reduktion zu Dihydrosphingosin (Sphinganin), welches durch Ankopplung einer Fettsäure Dihydroceramid, die gesättigte Form von Ceramid, bildet (Gillard et al. 1998). Durch Aktivität einer Desaturase, welche die Bildung einer trans 4,5-Doppelbindung katalysiert, entsteht Ceramid (Spiegel & Milstien 2003b). Eine direkte Umwandlung von Dihydrosphingosin zu SP findet nicht statt. Weitere Reaktionen zur Synthese komplexerer Sphingolipide finden nach Aufnahme von Ceramid in den Golgiapparat statt (Gillard et al. 1998). Zum Abbau von S1P dienen zwei unterschiedliche Wege (s. Abb. 3): Die Gegenreaktion zur Phosphorylierung von SP wird durch das Enzym S1P-Phosphatase (S1PP) katalysiert. Es bewirkt durch die reversible Dephosphorylierung von S1P einen Abfall sowohl der intra- als auch extrazellulären S1P-Spiegel (Johnson et al. 2003). Das hierbei entstehende SP kann zur Synthese von Ceramid dienen (Le Stunff et al. 2002). Alternativ kann S1P durch das Enzym S1P-Lyase irreversibel in die Produkte Hexadecenal, ein Fettaldehyd, und Ethanolamin-Phosphat, welche dann dem Glycerolipidstoffwechsel zur Verfügung stehen, aufgespalten werden (Zhou & Saba 1998; Hannun et al. 2001). Die Existenz der genannten S1P-abbauenden Enzyme in den meisten Zelltypen ist die Ursache für die im Normalzustand vorliegenden niedrigen intrazellulären S1P-Konzentrationen. Im Gegensatz dazu kommt es in Blutplättchen, welchen das Enzym S1P-Lyase fehlt, zur intrazellulären Akkumulation von S1P (Fukuda et al. 2003).

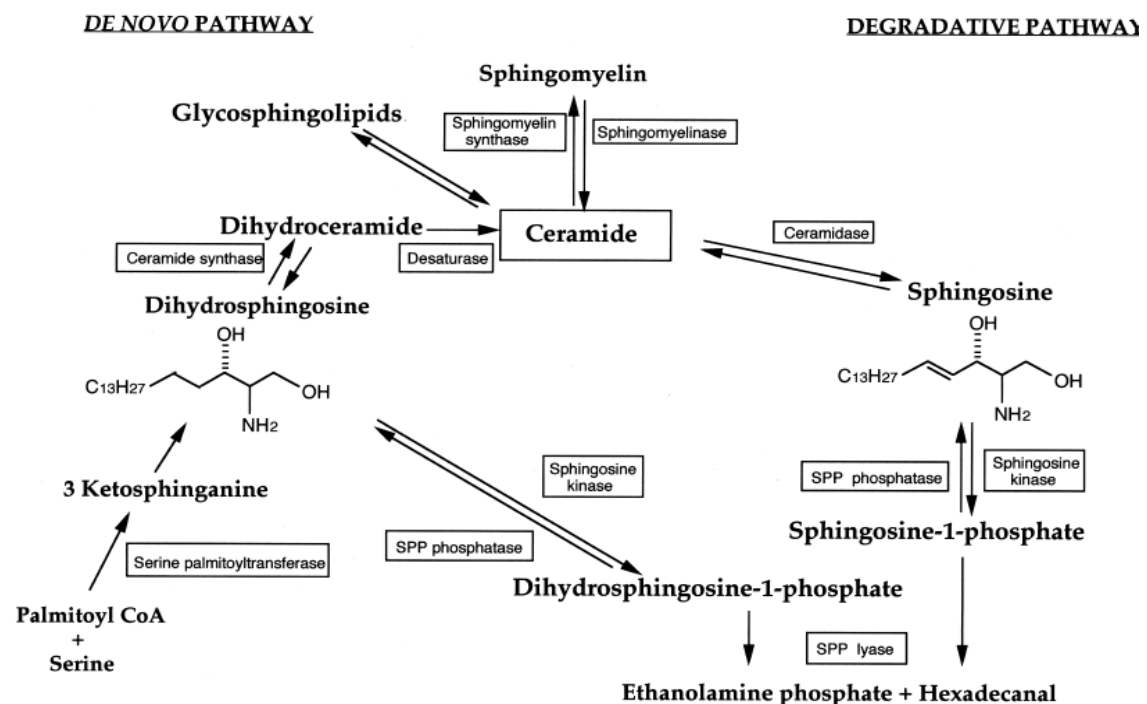


Abb. 3: Auf- und Abbauwege von S1P (Olivera & Spiegel 2001)

## Das Sphingolipidgleichgewicht

S1P und Ceramid stellen die beiden am intensivsten erforschten bioaktiven Sphingolipide dar. Des Weiteren üben sie in vielen unterschiedlichen Systemen gegenteilige Effekte aus (Futerman & Hannun 2004). Da beide Substanzen im Rahmen einer Gleichgewichtsreaktion ineinander überführbar sind (s. Abb. 4), wird angenommen, dass die jeweils erzielte Wirkung auf die betreffende Zelle nicht von deren absoluten Konzentrationen, sondern von ihrem Verhältnis zueinander abhängt (Cuvillier et al. 1996; Maceyka et al. 2002). Die Relevanz dieses Gleichgewichtes sowie seine Bedeutung für die Regulation des Zellschicksals wurde an verschiedenen Zellspezies bewiesen. Cuvillier et al. (1996) konnten als erste die Hemmung Ceramid-induzierter Apoptose durch S1P nachweisen und wiesen auf die Bedeutung des Verhältnisses der beiden Metaboliten zueinander hin. Andere Arbeitsgruppen konnten diese Annahme durch Untersuchungen an unterschiedlichen Zellspezies bestätigen: Die Verschiebung des Ceramid/S1P-Gleichgewichtes unter Erhöhung der Ceramidkonzentration führte in PC12-Zellen zur Steigerung der Apoptoserate (Edsall et al. 1998). Eine verstärkte Proliferation sowie eine Beschleunigung des Zellzyklus erreichten Olivera et al. (1999) in NIH 3T3 Fibroblasten und HEK293 Zellen durch Überexpression von SPHK mit nachfolgender Verschiebung des Ceramid/ S1P-Verhältnisses zugunsten von S1P. Ebenfalls S1P-antagonistische Effekte wurden von SP beobachtet (Cuvillier 2002). Die Bedeutung des Verhältnisses von SP und S1P wiesen Prieschl et al. (1999) für die Aktivierung von Mastzellen sowie Fatatis & Miller (1999) und Choi et al. (1996) für die Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration nach. Ähnliche Beobachtungen von Morita et al. (2000) zeigten unter anderem, dass sowohl durch Inhibition der Ceramidsynthese durch Gendepletion als auch durch Zufuhr von S1P die Apoptose von Oozyten verhindert werden konnte. Pyne et al. (1996) berichten von antagonistischen Effekten durch SP und Ceramid versus S1P auf die PDGF-induzierte Mitoserate glatter Atemwegsmuskelzellen. Wie Experimente an Hefezellen zeigten, ist die Regulation des Sphingolipidgleichgewichtes im Zusammenhang mit der Reaktion der Zelle auf Stressoren evolutionär erhalten (Jenkins et al. 1997; Jenkins & Hannun 2001; Kolesnick 2002). Eine zentrale Erkenntnis der verschiedenen Studien ist, dass das Enzym SPHK die Funktion eines kritischen Regulators des Sphingolipidgleichgewichtes einnimmt, da es nicht nur eine Erhöhung der S1P-Konzentration sondern gleichfalls eine Erniedrigung der SP- und Ceramidkonzentration verursacht (Maceyka et al. 2002; Spiegel & Milstien 2003b).

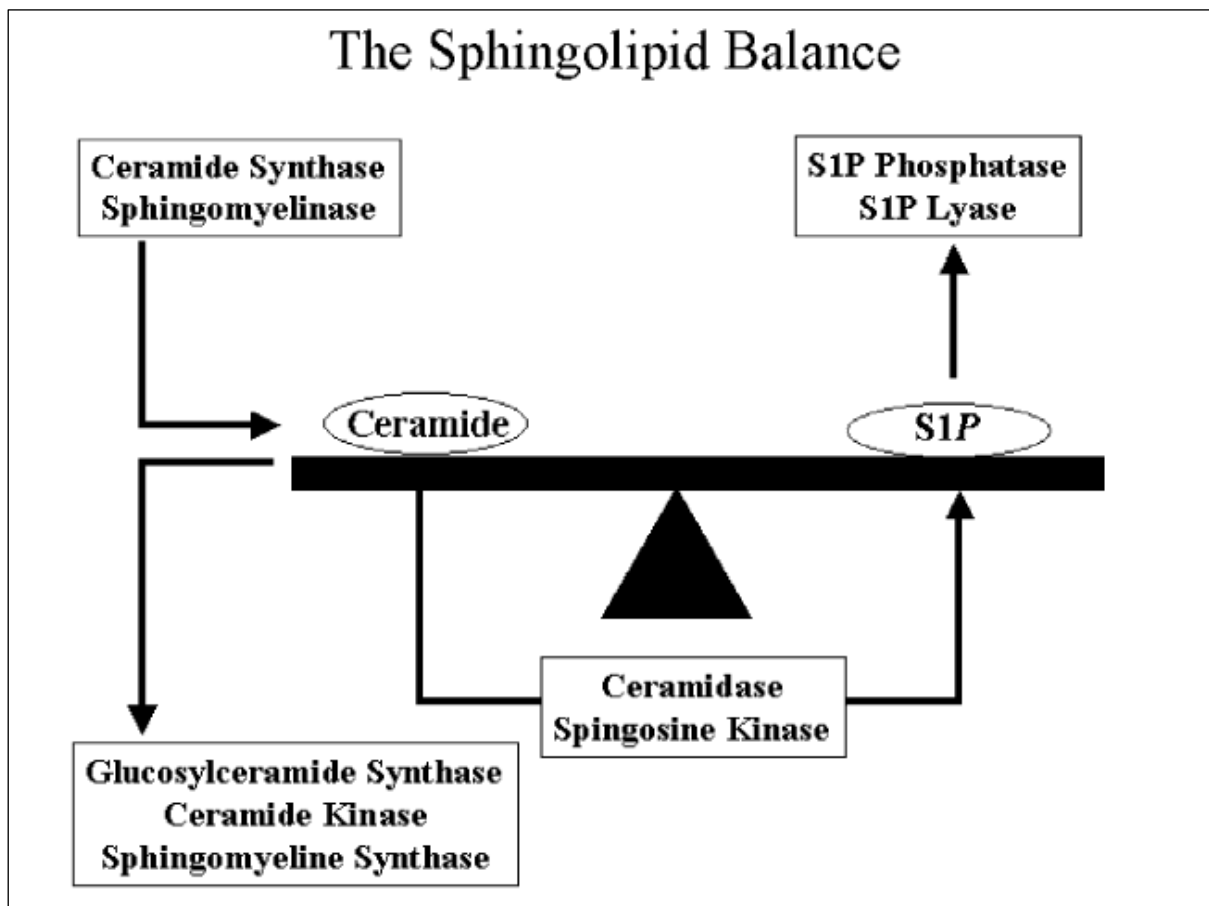


Abb. 4: Das Sphingolipidgleichgewicht (Kester & Kolesnick 2003). Die Konzentrationen von Ceramid und S1P stehen in einem dynamischen Gleichgewicht und können durch die Aktivität verschiedener Enzyme des Sphingolipidstoffwechsels variieren, was zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen Ceramid und S1P führt.

## **Signaltransduktionsmechanismen**

S1P nimmt aufgrund seiner Eigenschaft, seine vielfältigen Effekte mithilfe unterschiedlicher Signaltransduktionsmechanismen zu vermitteln, eine besondere Rolle unter den Mediatorsubstanzen ein. Es ist bekannt, dass die wichtigsten und am besten untersuchten Effekte über eine Familie G-Protein-gekoppelter Rezeptoren vermittelt werden (Spiegel & Milstien 2003a). Untersuchungen der letzten Jahre lieferten zudem Beweise für die Rolle von S1P als „second messenger“ (Olivera & Spiegel 1993; Cuvillier et al. 1996; Meyer zu Heringdorf et al. 1998; van Brocklyn et al. 1998) sowie für seine intrazellulär vermittelten Wirkungen (Olivera et al. 2003a). Obwohl die Synthese von S1P im Intrazellulärraum stattfindet, kann nach dem Transport in den Extrazellulärraum eine Bindung an Rezeptoren stattfinden, so dass intrazellulär synthetisiertes S1P auto- und parakrine Effekte ausüben kann (Hobson et al. 2001; Rosenfeldt et al. 2001).

### ***Intrazelluläre Signaltransduktion***

Überexpression von SPHK in NIH 3T3 Fibroblasten (Olivera et al. 1999) sowie in MCF-7 Mammakarzinomzellen (Nava et al. 2002) mit nachfolgender Erhöhung der intrazellulären S1P-Konzentration löste unterschiedliche Effekte auf Mitoseraten und Zellwachstum aus, was Hinweise auf die Existenz ausschließlich intrazellulär lokalisierter Signaltransduktionswege gab. Um die Möglichkeit auto- bzw. parakrin vermittelter Wirkungen an den beobachteten Effekten auszuschließen, konnte durch die spezifische Blockade von inhibitorischen G-Proteinen unter Verwendung von Pertussis-Toxin extra- von intrazellulär vermittelten Effekten unterschieden und die intrazelluläre Vermittlung der untersuchten Effekte nachgewiesen werden (Goodemote et al. 1995; van Brocklyn et al. 1998; An et al. 2000; Meyer zu Heringdorf et al. 2001; Olivera et al. 2003). Des Weiteren löste S1P in Hefezellen, welche keine S1P-Rezeptoren besitzen, vergleichbare Effekte aus (Mandala et al. 1998; Jenkins & Hannun 2001). Der Mechanismus der intrazellulären Signaltransduktion ist bisher ungeklärt (Spiegel & Milstien 2002).



## **Extrazelluläre Signaltransduktion**

### **S1P-Rezeptoren**

Der Prototyp der Rezeptoren, an welchen S1P mit hoher Spezifität bindet (Ozaki et al. 2003) wird aufgrund seiner Zugehörigkeit zur sogenannten „endothelial differentiation gene“- (EDG-) Familie, deren frühe Expression ursprünglich in großen Mengen in Endothelzellen humaner Nabelvenen beobachtet wurde (Hla & Maciag 1990), als EDG1-Rezeptor bezeichnet. Dieser wurde von Lee et al. (1998) auf der Suche nach natürlichen Liganden für EDG1 als Rezeptor für S1P identifiziert. Das EDG1-Protein besitzt die sieben hydrophoben Transmembrandomänen der Familie G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (Racké et al. 2000; s. Abb. 5). Innerhalb weniger Jahre wurden vier weitere, hochspezifische S1P-Rezeptoren mit ca. 50% identischer Aminosäuresequenz entdeckt (Okazaki et al. 1993; MacLennan et al. 1994; Graeler et al. 1998; Lee et al. 1998, An et al. 2000) (s. Abb. 5). Die mit dem EDG1-Rezeptor eng verwandten Rezeptoren EDG5, -3, -6 und -8 wurden in der Reihenfolge ihrer Publikation in S1PR1-S1PR5 umbenannt (Chun et al. 2002).

S1PR sind in der Plasmamembran lokalisiert; Liu et al. (1999) zeigten jedoch an Experimenten mit HEK-293-Zellen einen durch Bindung von S1P induzierten Transport eines S1P-Rezeptors von der Plasmamembran zu perinukleären Vesikeln. Untersuchungen bezüglich der S1PR-Expression liegen sowohl für Human- als auch für Nagergewebe vor. Sowohl S1PR1 als auch S1PR3 sind ubiquitär vorhanden, während S1PR2 in Hirn-, Herz-, Lungen-, Magen-, Darm- und Nebennierengewebe (Zhou & Murthy 2003), S1PR4 in lymphoidem Gewebe sowie humanen glatten Atemwegsmuskelzellen (Lockmann et al. 2004) und S1PR5 im Gegensatz zur Verteilung in humanem Gewebe bei Ratten lediglich in der weißen Substanz und der Milz nachgewiesen werden konnte (Niedernberg et al. 2002). Alle bekannten Rezeptoren sind an unterschiedliche heterotrimere G-Proteine gekoppelt. G-Proteine sind aus einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit aufgebaut, wobei S1PR sich durch das Vorkommen unterschiedlicher Unterfamilien der  $G_{\alpha}$ -Untereinheit unterscheiden (s. Abb. 5) und auf diese Weise unterschiedliche zelluläre Signalwege (Hla 2003; Radeff-Huang et al. 2004) aktivieren. Die Selektivität der S1PR-Subtypen für spezifische G-Proteinuntereinheiten wird vermutet, konnte aber bisher nur unvollständig aufgeklärt werden (Radeff-Huang et al. 2004). Während die bei S1PR1, -2 und -3 vorkommenden  $G_{\alpha}$ -Untereinheiten bekannt sind, liegen bisher keine Erkenntnisse zur Kopplung der unterschiedlichen  $G_{\alpha}$ -Untereinheiten an S1PR4 und -5 vor.

## Mechanismen der rezeptorvermittelten Signaltransduktion

Die G-Protein-vermittelten Signalwege spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zellproliferation und Apoptose. S1PR können an die  $G_i$ -,  $G_{12/13}$ -, oder  $G_q$ - Familie der  $G_\alpha$ - Untereinheit gekoppelt sein (Rosenfeldt et al. 2001; s. Abb. 5). Der Aktivierung der  $G_i$  – Untereinheit, welche mit S1P1-, -2 und -3 assoziiert ist (s. Abb. 5), folgt die Blockade des Enzymes Adenylatcyclase und daraus eine Erniedrigung zellulärer cAMP-Spiegel sowie die Inhibition des Enzymes Proteinkinase A (PKA), was zur Steigerung von Zellwachstum und -proliferation führt (Goodemote et al. 1995). Die bisher nur bei S1P3-Rezeptoren nachgewiesene  $G_q$ -Untereinheit (s. Abb. 5) aktiviert direkt das Enzym Phospholipase C (PLC), welches die Umwandlung von Phosphatidylinositol zu Diacylglycerol (DAG) und Inositol-Triphosphat ( $IP_3$ ) katalysiert. DAG aktiviert das Enzym Proteinkinase C (PKC), dessen Isoformen in unterschiedlichen Zellkompartimenten an der Vermittlung zahlreicher unterschiedlicher Effekte wie der Regulation der Zellproliferation, beteiligt ist.  $IP_3$  bindet an Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums, was über die Mobilisierung des hier gespeicherten Calciums zur Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration führt (Zhang et al. 1991; Meyer zu Heringdorf et al. 1998; Radeff-Huang et al. 2004). Die Effekte der Aktivierung der bei S1P2 und -3 nachgewiesenen  $G_{12/13}$ -Untereinheit (s. Abb. 5), welche zu Änderungen in Zellform, Genexpression und Zellwachstum führt, beruhen hauptsächlich auf der nachfolgenden Aktivierung verschiedener Proteine der G-Protein-Unterfamilie Rho, von welcher bisher mindestens 18 bekannte Proteine, darunter die Proteine RhoA, Rac, welche in die Vermittlung von Zellmigration und Chemotaxis einbezogen sind (Hobson et al. 2001) und Ras existieren (Rosenfeldt et al. 2001; Zhou & Murthy 2003; Radeff-Huang et al. 2004). Die Aktivierung von RhoA und Ras wurde auch durch Bindung von S1P an  $G_i$ - und  $G_q$ -gekoppelte Rezeptoren beobachtet (Zhou & Murthy 2003). Darauf folgen die RhoA-abhängige Aktivierung der Enzyme mitogen-activated protein kinase (MAP Kinase), sowie die Ras-abhängige Aktivierung der extracellular-regulated kinase (ERK) (Coroneos et al. 1996; Racké et al. 2000). Aktivierung von MAPK ermöglicht deren Translokation zum Zellkern, wo sie eine Beschleunigung von Gentranskription und Zellzykluszeit bewirkt. ERK ist ebenfalls an der Steigerung der Proliferationsrate unterschiedlicher Zelltypen beteiligt (Spiegel et al. 1998; Radeff-Huang et al. 2004).

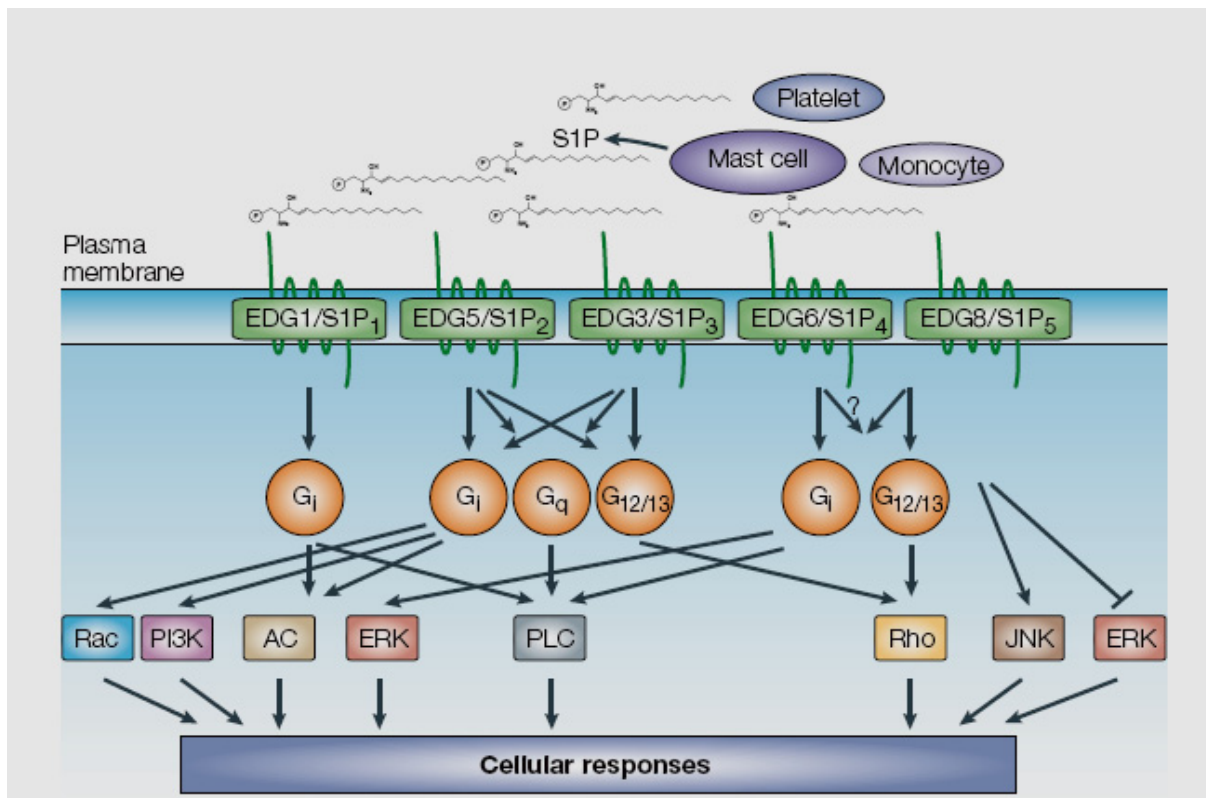


Abb. 5: Signaltransduktionswege an unterschiedlichen S1P-Rezeptoren (Spiegel & Milstien 2003b). Verschiedene Zelltypen sind zur Sekretion von S1P in der Lage. Dieses bindet an unterschiedliche S1P-Rezeptoren (EDG1, -5, -3, -6, -8), welche durch Kopplung an verschiedene G-Proteine die mit diesen verknüpften Signalkaskaden zur Auslösung spezifischer zellulärer Reaktionen aktivieren.

## Funktionen von S1P

Entgegen der ursprünglichen Vorstellung, dass Sphingolipide nur eine Rolle als Strukturkomponenten von Zellmembranen spielen, konnte zunächst in Untersuchungen an *Drosophila* (Adachi-Yamada et al. 1999) und Hefezellen (Pinto et al. 1992; Jenkins & Hannun 2001) deren Bedeutung für das Überleben der Zelle nachgewiesen und darauf folgend auch an Säugerzellen bestätigt werden (Olivera & Spiegel 1993; Cuvillier et al. 1996; Perez et al. 1997; Olivera et al. 1999; Yamashita et al. 1999). Zusätzlich wurden viele weitere, zum Teil zelltypabhängige S1P-vermittelte intra- und extrazelluläre Effekte auf zelluläre Prozesse beobachtet. Ursache hierfür ist sowohl das ubiquitäre Vorkommen von Sphingolipiden in Zellmembranen als auch die differenzierte Expression der verschiedenen S1P-Rezeptorsubtypen und deren Kopplung an unterschiedliche G-Proteine in den unterschiedlichen Geweben (Spiegel et al. 2001). Hierbei sind die durch S1P ausgelösten spezifischen zellulären Reaktionen unter anderem von der Art der durch die jeweilige Zelle exprimierten Rezeptorsubtypen bestimmt.

## ***Proliferation und Zellzyklusregulation***

S1P vermittelt sowohl über extra- als auch intrazelluläre Signalwege die Aktivierung proliferativer Prozesse. Erste Beweise für die Bedeutung von S1P bei der Regulation des Zellwachstums wurden in Untersuchungen von Spiegel et al. (1998) erbracht. Eine proliferative Wirkung auf glatte Muskelzellen der Atemwege und der Gefäße sowie auf Rattenfibroblasten konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen nachgewiesen werden (Gomez-Munoz et al. 1995; Pyne et al. 1996; Pacheco et al. 2003). Übereinstimmend damit konnte durch Zugabe von Serum oder einzelner Wachstumsfaktoren wie platelet-derived-growth factor (PDGF) die Expression des Enzymes SPHK und damit eine Erhöhung der S1P-Konzentration erzielt werden, was auf eine Wachstumsfaktor-abhängige Regulation von S1P schließen lässt (Olivera & Spiegel 1993; Mazurek et al. 1994; Spiegel & Milstien 1995; Cuvillier et al. 1996; Kleuser et al. 2001). Andere Arbeitsgruppen untersuchten die intrazellulären Wirkungen von S1P auf den Zellzyklus. Durch Mikroinjektion von S1P konnten van Brocklyn et al. (1998) in Swiss 3T3-Fibroblasten eine Erhöhung der Mitoserate und Perez et al. (1997) in Mausoozyten eine Verhinderung der Doxorubicin-induzierten Apoptose erzielen. In Übereinstimmung mit diesen Untersuchungen beobachteten Olivera et al. (2003) nach Erhöhung der intrazellulären S1P-Konzentration durch Überexpression von SPHK in NIH 3T3 Fibroblasten die Erhöhung des Anteiles in der S-Phase des Zellzyklus befindlicher Zellen, eine Beschleunigung des Überganges von der G<sub>1</sub>- in die S-Phase des Zellzyklus sowie eine Reduktion der zellulären Verdoppelungszeit. Entscheidend bei der Vermittlung der genannten Wirkungen ist dabei das intrazelluläre Gleichgewicht von S1P und Ceramid, welches als Vermittler von Apoptoseprozessen den funktionellen Antagonisten von S1P darstellt (Cuvillier et al. 1996; Xia et al. 1999). Während Ceramid über die Aktivierung des Enzymes stress-activated protein kinase (SAPK) Apoptoseprozesse induziert, wurde von Wu et al. (1995) und Edsall et al. (2001) eine S1P-vermittelte Hemmung von SAPK bei gleichzeitiger Aktivierung von ERK-1 und -2 beobachtet. Nava et al. (2002) wiesen die Aktivierung von ERK-1 und -2 durch SPHK und deren proliferativen Einfluss auf MCF-7 Brustkrebszellen bei Mäusen nach. Die Beeinflussung des Sphingolipidgleichgewichtes und die resultierenden Auswirkungen auf die Lebensdauer der Zelle ist von unterschiedlichen Faktoren abhängig. Fatatis & Miller (1999) konnten beispielsweise anhand ihrer Untersuchungen an CEIN3- und HEK-293-Zellen zur PDGF-induzierten zellulären Calciummobilisierung nachweisen, dass der PDGF-abhängige Effekt auf das Gleichgewicht von S1P und Ceramid von der Phase des Zellzyklus, in welcher sich die betreffende Zelle zum Zeitpunkt der PDGF-Einwirkung befindet, abhängt.

## ***Regulation der Calciumkonzentration***

S1P ist sowohl in pflanzlichen als auch in Hefe- und Säugerzellen an der Homöostase der zellulären Calciumkonzentration beteiligt (Spiegel & Milstien 2003b). Dies weist auf eine weitere, evolutionär erhaltene Funktion von S1P hin. In Säugerzellen existieren unterschiedliche Signalwege, durch welche eine S1P-abhängige Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration vermittelt wird. Deren Mechanismen sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Untersuchungen von Mattie et al. (1994) bewiesen die Existenz einer  $\text{IP}_3$ -unabhängigen Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durch S1P, welche zudem unabhängig von der extrazellulär verfügbarem  $\text{Ca}^{2+}$  war, was auf die Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern schließen ließ. Darauf folgend wiesen Ghosh et al. (1994) an Saponin-permeabilisierten Zellen der glatten Muskelzelllinie DDT1MF-2 die Mobilisierung von 75% des in Speichern des endoplasmatischen Reticulum (ER) vorhandenen  $\text{Ca}^{2+}$  durch S1P ebenfalls auf  $\text{IP}_3$ -unabhängigem Weg, nach. Das S1P wurde durch eine in der ER-Membran lokalisierte SPHK generiert. Die Existenz einer  $\text{IP}_3$ -unabhängigen Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$  durch S1P wird durch weitere Beobachtungen verschiedener Arbeitsgruppen unterstützt. Verschiedene externe Stimuli, wie die Kreuzvernetzung von  $\text{Fc}\epsilon$ -Rezeptoren auf der Oberfläche von Mastzellen (Choi et al. 1996) sowie von  $\text{Fc}\gamma$ -Rezeptoren neutrophiler Granulozyten (Chuang et al. 2000) und die Stimulation von PDGF-Rezeptoren in unterschiedlichen Zelllinien (Olivera & Spiegel 1993; Bornfeldt et al. 1995), welche als Stimulatoren der SPHK-Aktivität bekannt sind, regulieren ebenfalls die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase auf Phospholipase C (PLC)-unabhängigem Weg (Melendez & Khaw 2002). Durch Blockade der SPHK-Aktivität durch spezifische Inhibitoren konnte zudem eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration verhindert werden (Spiegel & Milstien 2003b). Der Signaltransduktionsweg der S1P-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung aus dem ER ist bisher noch unbekannt (Young & Nahorski 2002; Spiegel & Milstien 2003b). Mathes et al. (1998) untersuchten den Einfluss von SP und seiner Agonisten N,N-Dimethylsphingosin, DL-threo-Dihydrosphingosin und N-Acetylsphingosin auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-abhängigen, durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aktivierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx (store-operated calcium-release-activated calcium current (ICRAC)), welcher zur Auffüllung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher dient und wiesen eine Blockade von ICRAC durch alle eingesetzten Substanzen nach, woraus Spiegel & Milstien (2003b) folgerten, dass die Umwandlung von SP zu S1P über eine Aufhebung der SP-abhängigen ICRAC-Blockade einen weiteren Mechanismus zur Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration darstellt. Zusätzlich wiesen Meyer zu Heringdorf et al. (1998) in HEK-293-Zellen die Funktion von S1P als second messenger in der Acetylcholin-Rezeptor-vermittelten, PLC-unabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung nach. Okijama et al. (1997) konnten zudem die Rolle spezifischer S1P-Rezeptoren in der PLC- und

damit IP<sub>3</sub>-gekoppelten Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung in HL-60 und Schilddrüsenzellen nachweisen. Denselben Effekt beobachteten Lyons & Karin (2001) bei MC3T3-E1-Osteoblasten nach exogener Zufuhr von S1P. Untersuchungen von Aas et al. (2001) an polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) ergaben, dass der zu deren Aktivierung benötigte Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration durch Bindung von S1P an GPCR nach Aktivierung von SPHK durch Fibronectin vermittelt wird. Diese unterschiedlichen Beobachtungen zeigen, dass S1P, möglicherweise in Abhängigkeit vom Zelltyp, als Bestandteil verschiedener Signalwege zur Regulation der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Homöostase beiträgt.

### ***Effekte auf glatte Muskelzellen***

Alle bekannten S1P-Rezeptoren mit Ausnahme von S1P<sub>5</sub> werden von glatten Muskelzellen exprimiert (Rosenfeldt et al. 2003). In glatten Muskelzellen unterschiedlicher Organe trägt S1P zur Vermittlung verschiedener Funktionen bei (Zhou & Murthy 2003; Watterson et al. 2005). Die Differenzierung glatter Muskelzellen wird über eine RhoA-abhängige Aktivierung des Serumfaktors SRF vermittelt, welches durch S1P über einen ERK-abhängigen Signalweg aktiviert wird. Dies wiesen Lockmann et al. (2004) an glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte durch Nachweis der S1P-vermittelten, RhoA-abhängigen Expressionssteigerung spezifischer, für Differenzierung und Proliferation glatter Muskelzellen essentieller Promotoren nach. Zudem wurde durch S1P die Transkription weiterer Wachstumsfaktoren glatter Muskelzellen aktiviert, so dass S1P in diesen Zelltypen zur Differenzierung und Proliferation der Zellen beiträgt. Rosenfeldt et al. (2003) untersuchten den Effekt von S1P auf humane glatte Atemwegsmuskelzellen (HASMC) und zeigten, dass eine durch S1P ausgelöste Kontraktilitätssteigerung sowohl auf einer Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration mit nachfolgender Aktivierung des Enzymes Myosinleichtkettenkinase (MLC) als auch der Bildung kontraktiler Fasern beruht. Dieser Effekt trat bereits bei wesentlich niedrigeren Konzentrationen von S1P ein, als für Stimulation von DNA-Synthese und Proliferation notwendig sind. Zusätzlich berichten Ammit et al. (2001) von einer S1P-abhängigen Erhöhung der Produktion proinflammatorischer Cytokine in HASMC.

### ***Migration und Chemotaxis***

S1P spielt eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Motilität und gerichteter Bewegung vieler unterschiedlicher Zelltypen (Spiegel et al. 2002), welche durch Expression von Adhäsionsmolekülen, Ausbildung kontraktiler Fasern und Pseudopodien sowie chemotaktische Prozesse reguliert wird (Lee et al. 1999). Alle bisher vorliegenden Studien

deuten dabei auf die Beteiligung von S1P-Rezeptoren bei der Vermittlung dieser Effekte hin, wobei auch intrazellulär synthetisiertes S1P nach dessen Sekretion auf autokrinem Weg an der Rezeptor-vermittelten Regulation dieser Prozesse beteiligt ist (Le Stunff et al. 2004a). Erste Hinweise auf die Bedeutung von S1P für zelluläre Migrationsprozesse ergaben Untersuchungen von Liu et al. (2001) an S1PR-Knockout-Mäuseembryonen, bei welchen eine Störung der Migrationsprozesse von glatten Gefäßmuskelzellen und Perizyten die Blutgefäßreifung verhinderte. Ausgehend von diesen Erkenntnissen brachten Hobson et al. (2001) und Rosenfeldt et al. (2001) die S1P-abhängigen Migrationsprozesse mit der Aktivierung von SPHK durch PDGF in Verbindung und wiesen zudem die Kreuzkommunikation zwischen S1P1- und PDGF-Rezeptoren nach. Bindung von PDGF an seinen Tyrosinkinase-gekoppelten Rezeptor transaktiviert S1P Rezeptoren durch Stimulation von SPHK und daraus folgender S1P-Produktion. Der daraus resultierende, temporäre und lokale S1P-Anstieg aktiviert einen Signalweg, welcher zur Ausbildung von Pseudopodien und gerichteter Vorwärtsbewegung führt. Diese reziproke Transaktivierung ist für die PDGF-gerichtete Chemotaxis notwendig und weist auf die Bedeutung von extrazellulärem S1P hin. Im Gegensatz dazu berichten Kawa et al. (1997) von der S1P-abhängigen Inhibition der Bildung von Aktinfilamenten in neutrophilen Granulozyten, was auf die Rolle von S1P als negativer Regulator der Neutrophilenmigration schließen lässt. Olivera et al. (2003) beobachteten an transfizierten NIH 3T3-Fibroblasten einen Anstieg der Ausbildung kontraktile Fasern nach Überexpression von SPHK. Unterschiedliche Effekte von S1P auf die Motilität von Leukozyten führen Lee et al. (2002) auf die Verwendung verschiedener Leukozyten- und Endothelzellpopulationen zurück. Wang et al. (1999) wiesen nach, dass der von S1P auf Migrationsprozesse unterschiedlicher Leukozytenspezies ausgeübte Effekt von der vorliegenden S1P-Konzentration abhängig ist. Le Stunff et al. (2004a) machten die Unterschiede im Expressionsmuster von S1P-Rezeptoren der verschiedenen Zelltypen für die komplexen und zum Teil gegensätzlichen Auswirkungen von S1P auf die Zellmotilität verantwortlich. Dieselbe Arbeitsgruppe wies die Beteiligung von S1P an der rezeptorvermittelten, Epidermal-growth-factor-(EGF)-assoziierten Chemotaxis von HEK-293 Zellen nach, indem sie diesen Effekt durch Abbau von S1P durch das Enzym S1P-Phosphatase stark vermindern konnten. Die Auswanderung von Leukozyten aus Blutgefäßen erfordert die Aktivierung von Endothelzellen sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen auf deren Oberfläche. Xia et al. (1999) beobachteten eine starke Expressionserhöhung der Adhäsionsmoleküle E-Selectin und V-CAM-1 an Endothelzellen humaner Nabelvenen (HUVEC) nach TNF- $\alpha$ -abhängiger Aktivierung von SPHK. Ähnliche Untersuchungen von Lee et al. (2004) an HUVEC bewiesen die S1P-Rezeptor-vermittelte Expressionssteigerung des Adhäsionsmoleküles ICAM-1 nach S1P-Exposition, woraus eine verstärkte Adhäsion mononukleärer Zellen resultierte. Daraus zogen Lee et al. (2004) den

Schluss, dass im Rahmen entzündlicher Prozesse die Sekretion von S1P durch aktivierte Blutplättchen zur Vermittlung der Leukozytenemigration aus dem Gefäßsystem beiträgt. Zudem stimulierte S1P die Sekretion von  $IL-1\beta$  und  $TNF-\alpha$  durch Makrophagen (Lee et al. (2002), welche aufgrund ihrer Funktion als Regulatoren der Interaktion zwischen Endothelzellen und mononukleären Phagozyten zu deren Migration aus dem Gefäßsystem beitragen. Melendez & Ibrahim (2004) konnten in humanen Makrophagen durch Blockade der SPHK-Expression deren Anaphylatoxin-induzierte chemotaktische Aktivität hemmen. Die dosisabhängige Hochregulation von S1P-Rezeptoren eosinophiler Granulozyten durch S1P in vitro sowie eine starke chemotaktische Wirkung von S1P auf eosinophile Granulozyten in vivo wiesen Roviezzo et al. (2004) nach. S1P verstärkte die Expression des CCR3-Rezeptors und des Cytokins RANTES (regulated on activation, normal T-cell-expressed and secreted), welche an der Vermittlung der meisten Funktionen eosinophiler Granulozyten beteiligt sind. Der Mechanismus der S1P-vermittelten Modulation der Gefäßpermeabilität wurde zuletzt von McVerry & Garcia (2005) untersucht. S1P führte hier zu einer rezeptorvermittelten Reorganisation des endothelialen Cytoskeletts, an deren Signaltransduktion Proteine der Rho-Familie beteiligt waren. Der genaue Mechanismus ist bisher unbekannt.

## ***S1P im Immunsystem***

Die intrazelluläre Balance zwischen SP und S1P spielt bei der Regulation funktioneller Prozesse in immunkompetenten Zellen eine wichtige Rolle; dies besonders im Verlauf inflammatorischer Prozesse (Baumruker und Prieschl 2002). S1P wird heute als einer der Hauptlipidmediatoren des Immunsystems angesehen und übt eine Vielzahl immunregulatorischer Funktionen aus, welche sowohl Mobilisierung, Migration, Mitose- und Rekrutierungsprozesse als auch spezifische Funktionen einzelner Immunzellspezies betreffen. Alle immunregulatorischen Lipidmediatoren werden hauptsächlich von Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Mastzellen, Makrophagen und Granulozyten produziert und wirken sowohl auf T- und B-Lymphozyten als auch auf Phagozyten und Endothelzellen (Cinque et al. 2003; Graeler et al. 2003; Goetzl & Rosen 2004). Es findet durch bestimmte Zellen wie mononukleäre Phagozyten, Blutplättchen und Mastzellen eine Sekretion von S1P statt; zusätzlich ist S1P auch in Immunzellen intrazellulär als Second-messenger-Molekül aktiv und findet sich als Stoffwechselprodukt in besonders hohen Konzentrationen im Bereich der „lipid rafts“ von Immunzellmembranen, welche als Ausgangspunkt zahlreicher Signalkaskaden angesehen werden (Baumruker & Prieschl 2002; Urtz et al. 2004). Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre beschäftigten sich mit dem Vorkommen und den Funktionen von S1P und dessen Rezeptoren in den verschiedenen Zellen des



Immunsystems. Jeder Zelltyp ist durch spezifische Expressionsmuster der S1P-Rezeptorsubtypen zur Vermittlung der rezeptorvermittelten Prozesse wie Migration und Chemotaxis gekennzeichnet (Graeler et al. 1998; Hornuss et al. 2001; Lee et al. 2002; Roviezzo et al. 2004), zusätzlich konnte in den meisten Immunzellspezies auch die intrazelluläre Synthese von S1P nachgewiesen werden (Wu et al. 2004). Diese ist wesentlicher Bestandteil verschiedener Immunantworten, welche über die Aktivierung von Immunglobulinrezeptoren vermittelt werden. Die im Verlauf allergischer Reaktionen vom Typ I stattfindende Mastzellaktivierung wird durch die Kreuzvernetzung der  $FC_{\epsilon}RI$ -Rezeptoren auf deren Oberfläche initiiert. Verschiedenen Arbeitsgruppen gelang der Nachweis, dass der zur Degranulation von Mastzellen erforderliche, intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Anstieg an die Aktivierung von SPHK gekoppelt ist (Beaven & Baumgartner 1996; Choi et al. 1996; Kinet 1999; Prieschl et al. 1999; Jolly et al. 2004; Urtz et al. 2004). Derselbe S1P-abhängige Signaltransduktionsmechanismus führt in Makrophagen nach Kreuzvernetzung der IgG-Rezeptoren  $FC_{\gamma}RI$  zur Aktivierung phagozytotischer Prozesse (Melendez et al. 1998). Weitere Erkenntnisse bezüglich der Funktion von S1P in Makrophagen gewannen Melendez & Ibrahim (2004), indem sie durch Depletion des SPHK-Gens in humanen Makrophagen deren Degranulation, Cytokinproduktion und chemotaktische Aktivität verhindern konnten. Auf die Existenz rezeptorvermittelter S1P-Funktionen in Makrophagen weist der Nachweis von S1P-Rezeptoren auf humanen und Rattenalveolarmakrophagen hin (Hornuss et al. 2001; Lee et al. 2002). Verschiedene Cytokine, wie  $TNF-\alpha$  (Xia et al. 1998; Niwa et al. 2000; Pettus et al. 2003), PDGF (Bornfeldt et al. 1995; Coroneos et al. 1995) und  $IL-1\beta$  (Nikolova-Karakashian et al. 1997; Lee et al. 2002), welche als Mediatoren im Verlauf entzündlicher Prozesse das Zusammenspiel der unterschiedlichen Immunzellen regulieren, entfalten ihre Wirkung mittels S1P-vermittelter Signalwege. Die Expression des S1P4-Rezeptors in Lymphozyten sowie in Lungengewebe wurde erstmals von Graeler et al. (1998) sowohl in Maus- als auch in humanem Gewebe identifiziert; Goetzl & Rosen (2004) berichten von der rezeptorvermittelten Regulation der Entwicklung, Zirkulation und Chemotaxis von T- und B-Lymphozyten durch S1P. Die Expression von S1P-Rezeptoren durch dendritische Zellen unterschiedlicher Reifungsstadien wiesen Idzko et al. (2002) nach. S1P vermittelte in reifen dendritischen Zellen die verstärkte Sekretion von IL-10 bei gleichzeitiger Blockade der IL-12- und  $TNF-\alpha$ -Sekretion. Unreife dendritische Zellen reagierten auf die Zugabe von S1P mit einer rapiden Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration, einer verstärkten Polymerisation von Aktinfilamenten sowie der Erhöhung der chemotaktischen Aktivität. Erst kürzlich konnten Erkenntnisse zur Funktion von S1P in Zellen der granulozytären Reihe gewonnen werden. Bindung des Anaphylatoxins C5a, welches in immunkompetenten Zellen die Sekretion proinflammatorischer Cytokine im Rahmen verschiedener immunologisch-entzündlicher Erkrankungen auslöst, führte in neutrophilen Granulozyten zur Aktivierung von

SPHK. Die damit einhergehende Steigerung der intrazellulären S1P-Konzentration verstärkte die Anaphylatoxin-abhängige Cytokinsekretion signifikant, was auf die Bedeutung des SPHK-Signalweges für die Vermittlung physiologischer Funktionen neutrophiler Granulozyten im Verlauf immunvermittelter entzündlicher Erkrankungen hinweist (Ibrahim et al. 2004). Roviezzo et al. (2004) wiesen die Expression verschiedener S1P-Rezeptoren durch eosinophile Granulozyten nach und zeigten sowohl anhand von in-vitro- als auch in-vivo- Untersuchungen die dosisabhängige Steigerung der S1P-Rezeptorexpression nach S1P-Exposition sowie die Auslösung chemotaktischer Aktivität in Richtung von S1P. Weitere Erkenntnisse zur immunologischen Bedeutung von S1P konnten durch Einsatz des SP-analogen Immunmodulators FTY720 gewonnen werden. Zwei unabhängige Studien zeigten, dass FTY720 nach Phosphorylierung durch SPHK (Billich et al. 2003; Paugh et al. 2003) als S1P-Agonist an den bekannten S1P-Rezeptoren mit höherer Affinität als S1P binden und über diese die reversible Rezirkulation von Lymphozyten in sekundäre lymphatische Organe vermitteln konnte (Brinkmann et al. 2002; Mandala et al. 2002). Dies führte zur Lymphopenie im peripheren Blut und in der Lymphflüssigkeit des Ductus Thoracicus. Im Gegensatz dazu beobachteten Sawicka et al. (2003) im Rahmen ihrer Untersuchungen an OVA-sensibilisierten Mäusen S1P-antagonistische Effekte durch FTY720 in Form einer kompetitiven Hemmung der durch S1P-ausgelösten chemotaktischen Aktivität sowie einer Reduktion der Th1- und Th2-vermittelten neutrophilen und eosinophilen Infiltration der Atemwege.

### ***Funktionen bei allergischem Asthma***

Erste Hinweise auf die Beteiligung von S1P an der Pathogenese allergischer Reaktionen vom Typ 1 (Atopie) gab die Entdeckung der Fc $\epsilon$ RI-vermittelten Aktivierung von SPHK in Mastzellen nach Bindung von Antigen und der darauf folgenden Freisetzung von Histamin, Leukotrienen und weiterer Cytokine (Beaven & Baumgartner 1996; Choi et al. 1996; Kinet 1999; Prieschl et al. 1999), was auf die Bedeutung der Lage des Sphingolipidgleichgewichtes in Mastzellen bei der allergischen, IgE-abhängigen Sofortreaktion hinweist. Choi et al. (1996) konnten nachweisen, dass S1P in Mastzellen die zu deren Degranulation erforderliche Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration verursachte. Des Weiteren wiesen Prieschl et al. (1999) eine Beteiligung des ERK-Signaltransduktionsweges an der S1P-vermittelten Cytokinausschüttung nach. Die Entdeckung, dass die Degranulation von Mastzellen nicht nur durch die intrazelluläre S1P-Synthese, sondern auch durch exogen zugeführtes S1P ausgelöst werden konnte und diese ebenfalls zur Expression von S1P-Rezeptoren in der Lage sind, bewies die Existenz auto- und parakriner Mechanismen bei der S1P-vermittelten Mastzellaktivierung (Jolly et al. 2001).

Untersuchungen von Ammit et al. (2001) erbrachten erstmals Beweise für die Bedeutung von S1P für die Entwicklung entzündlicher Erkrankungen der Atemwege und insbesondere des allergischen Asthmas: Messungen der S1P-Konzentration in der BAL Asthmakranker und gesunder Kontrollpersonen nach segmentaler Allergenprovokation ergaben eine signifikante Erhöhung der S1P-Spiegel in der Gruppe der Asthmakranken, während diese bei den Kontrollpersonen nach Allergenprovokation unverändert blieben. Die Erhöhung von S1P war zudem zum Schweregrad der damit einhergehenden entzündlichen Veränderungen, gemessen an Proteingehalt und Anzahl in der BAL vorkommender Entzündungszellen, proportional. Die Herkunft des in der BAL-Flüssigkeit gemessenen, extrazellulären S1P blieb unklar, wobei eine Sekretion von S1P durch aktivierte Mastzellen als potentielle Quelle hierfür diskutiert wurde. In Übereinstimmung mit dieser Vermutung wiesen Jolly et al. (2001) einen Anstieg sowohl der intra- als auch der extrazellulären S1P-Konzentration nach SPHK-Aktivierung durch Kreuzvernetzung von  $Fc\epsilon$ -Rezeptoren an der mastzellähnlichen Zelllinie RBL-(rat basophilic leucemia) 2H3 nach. Da in der glatten Atemwegsmuskulatur vier unterschiedliche S1P-Rezeptoren exprimiert werden, untersuchte dieselbe Arbeitsgruppe den Effekt von S1P auf kultivierte glatte Bronchialmuskelzellen (ASMC), um Erkenntnisse zur Beteiligung von S1P sowohl an entzündlichen Prozessen als auch am darauf folgenden Remodeling der Atemwege im chronischen Stadium allergischen Asthmas zu gewinnen. S1P vermittelte hier sowohl die Kontraktion von ASMC durch Steigerung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration als auch deren endothelial-growth-factor (EGF)- und Thrombin-abhängige Proliferationssteigerung durch Erhöhung der DNA-Synthese. Zusätzlich induzierte S1P die Sekretion des proinflammatorisch wirksamen Mediators IL-6 sowie eine Steigerung der TNF- $\alpha$ -abhängigen IL-6-Sekretion. Die Korrelation zwischen der Sekretion von S1P und dem Auftreten entzündlicher Veränderungen in asthmatischen Atemwegen sowie die Berücksichtigung der Kenntnisse über die mitogenen, migrationsfördernden und antiapoptotischen Wirkungen von S1P veranlasste Jolly et al. (2001) zu der Vermutung, dass S1P eine wichtige Rolle in der Vermittlung sowohl akuter als auch chronischer entzündlicher Veränderungen allergischen Asthmas spielt. Neben der Wirkung von S1P auf Mastzellen und ASMC geben die Erkenntnisse unterschiedlicher Arbeitsgruppen über die S1P-vermittelten Effekte auf verschiedene weitere in den Atemwegen vorkommenden Zellen, wie die S1P-abhängige Aktivierung von Monozyten (Cuvillier et al. 1996; van Brocklyn et al. 1998) und Endothelzellen (English et al. 2000; Garcia et al. 2001) weitere Hinweise auf die Verstärkung entzündlicher Vorgänge durch S1P. Cummings et al. (2002) wiesen die Expression von S1P-Rezeptoren durch Zellen des Bronchialepithels und die über die Rezeptorbindung von S1P vermittelte Sekretion des auf neutrophile Granulozyten stark chemotaktisch wirkenden Cytokins IL-8 nach. Untersuchungen von Ryan et al. (2003) belegten erstmals die Existenz eines intraalveolär gelegenen Sphingomyelinstoffwechsels. Durch Verschiebung des

intraalveolären Pools an Hydrolyseprodukten des Sphingomyelinstoffwechsels trägt S1P hier zur Veränderung der biophysikalischen Eigenschaften der Surfactantflüssigkeit bei (Bhattacharya 2004). Die Untersuchungen bezüglich des Einflusses des Sphingolipidgleichgewichtes auf die Aktivität unterschiedlicher Lymphozytenpopulationen deuten ebenfalls auf die Verstärkung allergischer Reaktionen durch S1P hin. Allergisches Asthma ist durch die verstärkte Aktivierung der Th2-Subpopulation gekennzeichnet. Das mit S1P im Gleichgewicht stehende SP blockierte in Untersuchungen von Tokura et al. (1996) die Proliferation von Th2-Lymphozyten, während die Th1-Population selektiv in ihrer Proliferation gefördert wurde. Funktionelle Untersuchungen von Idzko et al. (2002) an dendritischen Zellen, welche für die Präsentation phagozytierter Antigene und die Regulation der T-Zell Antwort notwendig sind, ergaben eine veränderte Cytokinfreisetzung S1P-behandelter dendritischer Zellen, welche mit einem Wechsel von einer Th1- zur Th2-Antwort verbunden war, woraus sie auf die Funktion von S1P als Regulator der durch dendritische Zellen gesteuerten T-Zell-Antwort schlossen.

## ***Sphingosinkinase***

### **Struktur und Isoformen**

Erkenntnisse über die Struktur von SPHK liegen bisher aufgrund der Identifizierung und Charakterisierung zweier sequenzhomologer Isoformen, SPHK1 und SPHK2, vor (Kohama et al. 1998; Liu et al. 2000). Beide Isoformen besitzen fünf konservierte Domänen (SC1-SC5; s. Abb 6), außerhalb derer sie eine große Sequenzvariabilität aufweisen (Liu et al. 2002). Das SPHK2-Molekül ist mit einem Molekulargewicht von 65 kDa wesentlich größer als SPHK1, dessen Molekulargewicht 49 kDa beträgt (Kohama et al. 1998; Liu et al. 2000) und vier Transmembrandomänen besitzt (TM1-4; s. Abb. 6), die der SPHK1-Isoform fehlen. Die Isoformen zeigen deutliche Unterschiede bezüglich ihrer Gewebeverteilung, Expression im Verlauf von Gewebeentwicklung und –Differenzierung sowie bezüglich der Aktivierung durch unterschiedliche Agonisten (Liu et al. 2000). Die erste Untersuchung, in der SPHK-1-Knockoutmäuse verwendet wurden (Allende et al. 2004), ergab lediglich eine Reduktion, jedoch keine vollständige Elimination der S1P-Produktion, was Allende et al. auf die Aktivität von SPHK2, welche ebenfalls im Organismus weit verbreitet ist, zurückführten. Immundepletionsstudien von Fukuda et al. (2003), welche beide SPHK-Isoformen betrafen, deuten zudem auf die Existenz weiterer SPHK-Isoformen in Milz, Dünndarm und Lunge hin. Auch die Untersuchungen derselben Arbeitsgruppe zur Verteilung und Aktivität der SPHK-Isoformen in Mausgeweben führten zu dem Schluss, dass 40% der ermittelten Gesamt-

SPHK auf andere SPHK-Isoformen als SPHK1 und -2 mit unterschiedlicher quantitativer Verteilung in den verschiedenen Geweben zurückzuführen ist. SPHK1 stellte die am häufigsten vorkommende Isoform in den untersuchte Geweben dar. Zudem zeigte SPHK2 eine ca. 100-fach geringere Aktivität als SPHK1. SPHK1 kam im verwendeten Mausgewebe in zwei unterschiedlichen Splicevarianten, SPHK1a und -b vor. Auch Billich et al. (2003) konnten verschiedene Splicevarianten von SPHK1 und -2 identifizieren, welche durch die Existenz zusätzlicher Aminosäuresequenzen am amino-terminalen Ende der Moleküle gekennzeichnet sind. Diese zeigten keinerlei Auswirkungen auf die Substratspezifität, sind aber möglicherweise für die Gewebeverteilung und die Regulation der Aktivität des Enzyms verantwortlich. Aufgrund der Unterschiede beider Isoformen bezüglich kinetischer Eigenschaften, Gewebeverteilung, Expressionsmuster während der Entwicklung und Differenzierung sowie der Existenz unterschiedlicher zusätzlicher Sequenzen neben den konservierten Domänen SC1-SC5 wird vermutet, dass die Enzyme in verschiedenen Geweben unterschiedliche Funktionen erfüllen (Le Stunff et al. 2004b). Pitson et al. (2002) erkannten innerhalb der SC1-SC3-Domänen beider Isoformen den hohen Grad an Homologie zur ATP-bindenden Domäne des Enzyms Diacylglycerolkinase (DAGK), was darauf hinweist, dass DAGK einen Teil der katalytischen Domäne von SPHK darstellt. Der Vergleich mit SPHK-Sequenzen pflanzlicher Herkunft sowie aus der Hefespezies *saccharomyces cerevisiae* zeigte die Existenz einiger, evolutionär alter und erhaltener Abschnitte (SC1-SC5; s. Abb. 6), von denen einer die Sequenz GDGxxxExxNG (s. Abb. 6), die als potentieller Teil der ATP-Bindungsstelle angesehen wird, enthält (Kohama et al. 1998). Pitson et al. (2003) belegten am SPHK1-Molekül die Existenz einer Region mit hoher Ähnlichkeit zur extracellular-regulated kinase (ERK) -1 und -2-Bindungsregion anderer ERK1 und -2-Substrate .

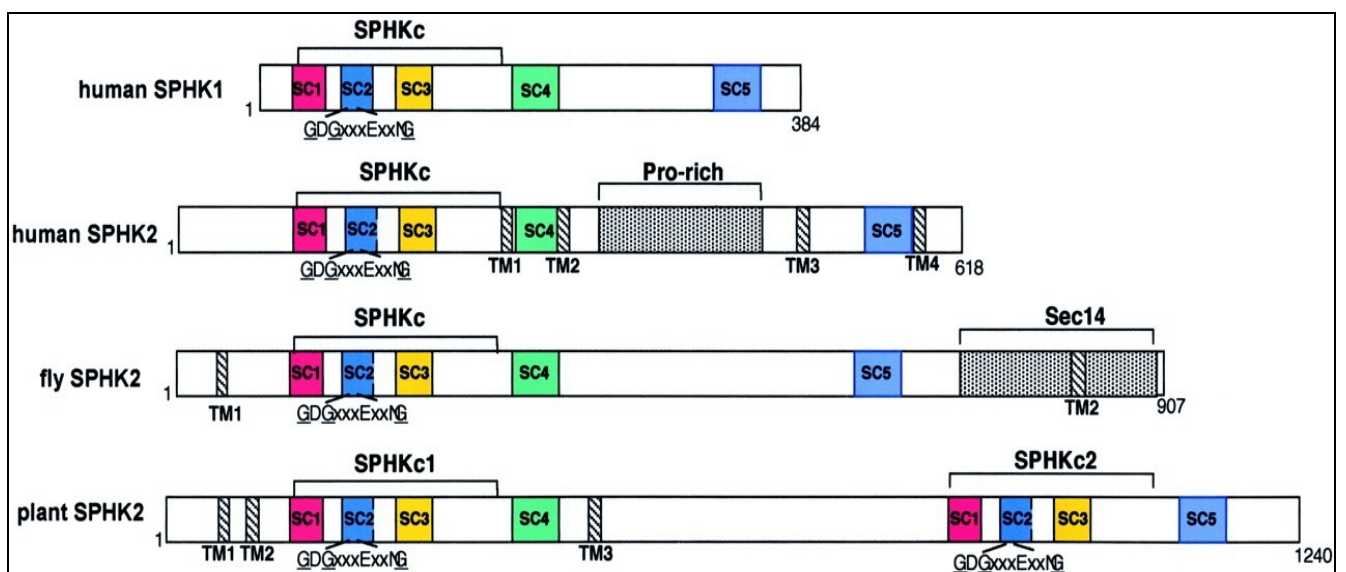


Abb. 6: Strukturelle Organisation der SPHK-Familie (Spiegel & Milstien 2002)

## Vorkommen

Als Bestandteil des ubiquitär vorkommenden Sphingolipidstoffwechsels ist das Enzym SPHK im Organismus von Säugern ebenfalls weit verbreitet. Fukuda et al. (2003) untersuchten die Gewebeverteilung von SPHK an Mäusegewebe und konnten in allen Geweben SPHK-Aktivität detektieren, wobei große quantitative Unterschiede zwischen den verschiedenen Geweben existierten. Die höchste SPHK-Aktivität wurde in der Lunge, gefolgt von Thymus, Dünndarm, Milz und Niere, gemessen. Erst in den letzten Jahren konnten nähere Erkenntnisse über Identität, Eigenschaften und Regulationsmechanismen gewonnen werden, wobei bisher zwei Isoformen des Enzyms identifiziert werden konnten. Die erste Klonierung der SPHK-Isoform SPHK1 gelang Kohama et al. (1998) unter Verwendung von Nierengewebe der Ratte. Die meisten Zellen exprimieren sowohl SPHK1 als auch -2 (Liu et al. 2000), wobei die verschiedenen Gewebe die beiden Isoformen in unterschiedlichem Umfang exprimieren. Am stärksten liegt SPHK1 in Lunge, Leber und Milz vor (Le Stunff et al. 2004b), während sich die Isoform SPHK2, deren Klonierung durch Liu et al. (2000) gelang, hauptsächlich in Leber und Herz findet. SPHK1 findet sich in der Zelle aufgrund ihrer fehlenden Lipidlöslichkeit und der Abwesenheit erkennbarer Transmembrandomänen (Olivera & Spiegel 2001) hauptsächlich im Cytosol (Igarashi et al. 2002; Olivera et al. 1999); wobei geringe Mengen im Bereich von Membranen lokalisiert sind (Fukuda et al. 2003). Hierbei ist noch nicht klar, ob das Enzym Bestandteil der membranumgrenzten Organellen oder lediglich lose an die Membranen gebunden ist (Spiegel & Milstien 2003b), da ein geringer Anteil auch in Plasmamembran und Zellkern identifiziert wurde<sup>2</sup>. In Untersuchungen zur Stimulation von SPHK durch unterschiedliche Agonisten in HEK293-Zellen kamen Pitson et al. (2003) zu dem Schluss, dass die intrazelluläre SPHK1 in unterschiedliche Proteinkomplexe oder subzelluläre Kompartimente gebundener Form in unterschiedlichen zellulären Lokalisationen vorliegt, welche die Aktivierbarkeit determinieren. Kleuser et al. (2001) wiesen zudem an Swiss 3T3-Zellen nach, dass ein Teil der zellulären SPHK1 im Zellkern lokalisiert ist. Diese Entdeckung wird durch die Identifikation zweier funktioneller Kernexportsequenzen am SPHK1-Molekül durch Inagaki et al. (2003) unterstützt, welche auf die Existenz eines aktiven Transportes von SPHK1 aus dem Zellkern hinweisen. Ancellin et al. (2002) wiesen in Untersuchungen an Endothelzellen humaner Nabelvenen (HUVEC) SPHK-Aktivität auf der Zelloberfläche und sowie die Existenz eines spezifischen, aktiven, vom ER und Golgiapparat unabhängigen Exportmechanismus nach, der eine extrazelluläre Aktivität von SPHK ermöglicht. Zwischen der zellulären Verteilung der beiden bekannten SPHK-Isoformen bestehen deutliche Unterschiede: Trotz der Existenz von vier potentiellen Transmembrandomänen im SPHK2-Molekül konnte dieses von Liu et al. (2000) im Cytosol transfizierter Zellen der embryonalen Nierenzelllinie HEK293 nachgewiesen werden. Dem

gegenüber zeigten Igarashi et al. (2002) unter Verwendung unterschiedlicher Zelllinien erstmals, dass es sich bei SPHK2 aufgrund der am amino-terminalen Ende des SPHK2-Moleküls lokalisierten „nuclear localization sequence“ (NLS) um ein hauptsächlich im Zellkern vorkommendes Protein handelt.

## **Reaktionsverlauf**

Durch Verknüpfung von Sphingosin mit einer Phosphatgruppe an seiner C1-ständigen Hydroxylgruppe wird durch die katalytische Aktivität von SPHK das Produkt S1P generiert. Sowohl Sphingosin als auch dessen reduzierte Form Dihydrosphingosin dienen als Substrate. Hierbei unterscheiden sich die verschiedenen Isoformen von SPHK in ihrer Substratspezifität. Während SPHK1 die höchste Affinität zu D-erythro-Sphingosin zeigt, phosphoryliert SPHK2 dessen gesättigte Form, D-erythro-Dihydrosphingosin, mit höherer Affinität. Andere Lipide werden durch die beiden Enzyme nicht phosphoryliert (Hannun et al. 2001). Die Reaktion unterliegt in Bezug auf ihr räumliches und zeitliches Vorkommen einer engen Regulation (Le Stunff et al. 2004b).

## **Regulation der SPHK**

In jeder SPHK-exprimierenden Zelle bewegt sich die SPHK-Aktivität auf einem geringen Basalniveau (Pitson et al. 2000). In diesem Zustand liegt ein geringer Teil der zellulären SPHK in phosphorylierter Form vor. Nach Interaktion mit verschiedenen Agonisten tritt ein rapider, signifikanter Anstieg der SPHK-Aktivität zu ein, welcher durch die Phosphorylierung von SPHK1 an der Ser225-Position gekennzeichnet und vermutlich mit einer Konformationsänderung des Moleküls verbunden ist (Pitson et al. 2003). Der Agonist-induzierte Anstieg der SPHK-Aktivität über das Basalniveau hinaus ist für die Aktivierung unterschiedlicher Signalkaskaden durch SPHK notwendig (Pitson et al. 2003). Eine Vielzahl verschiedener Agonisten konnte in den letzten Jahren identifiziert werden, wobei der größte Anteil unter ihnen als Wachstumsfaktoren und anti-apoptotisch wirkende Mediatoren bekannt ist (Spiegel & Milstien 2002). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten die Aktivierung von SPHK durch PDGF (Cuvillier et al. 1996; Pyne et al. 1996; Fatatis & Miller 1999; Kleuser et al. 2001), sowie weitere, gewebespezifische Wachstumsfaktoren wie epidermal growth factor (EGF) (Meyer zu Heringdorf et al. 1999), vascular endothelial growth factor (VEGF) (Shu et al. 2002) und nerve growth factor (NGF) (Edsall et al. 1997) nachweisen. Auch bestimmte cytokinvermittelte Effekte auf unterschiedliche Zellspezies sind von der Regulation des Sphingolipidgleichgewichtes abhängig. Die Rolle des Cytokins TNF- $\alpha$  als wichtiger Aktivator

von SPHK wurde in Untersuchungen von Xia et al. (1998) bestätigt. Die Arbeitsgruppe wies die Beteiligung von S1P in der TNF- $\alpha$ -abhängigen Endothelzellaktivierung im Rahmen entzündlicher Prozesse nach. Zusätzlich gelang es ihnen, am SPHK-Molekül eine TNF- $\alpha$ -bindende Region zu identifizieren, welche eine Interaktion zwischen SPHK und dem TNF- $\alpha$ -Rezeptor ermöglichte (Xia et al. 2002). Dieser, zur Erhöhung der SPHK-Aktivität führende Vorgang ist zur Vermittlung des antiapoptotischen Effektes durch TNF- $\alpha$  notwendig. MacKinnon et al. (2002) beobachteten einen TNF- $\alpha$ -vermittelten Anstieg der SPHK-Aktivität in neutrophilen Granulozyten. Die Synthese von S1P führte hier zu einer konzentrationsabhängigen Verstärkung der Superoxidproduktion (Niwa et al. 2000). Auch TGF- $\beta$  führte in Experimenten von Yamanaka et al. (2004) an dermalen Fibroblasten zur signifikanten Erhöhung der SPHK-Aktivität. IF- $\gamma$  löste in neutrophilen Granulozyten eine S1P-vermittelte Erhöhung der intrazellulären Ca-Konzentration aus (Aas et al. 2001). Einen weiteren Mechanismus zur Aktivierung von SPHK stellt die Bindung unterschiedlicher Liganden an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auf der Zelloberfläche dar (Meyer zu Heringdorf et al. 1998; Alemany et al. 1999). Die SPHK-abhängige Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration durch Bindung von Acetylcholin (ACh) an muskarinische Rezeptoren wiesen van Koppen et al. (2001) nach. Eine Erhöhung der SPHK-Aktivität durch das eigene Endprodukt S1P, welche über die Bindung an S1P-Rezeptoren vermittelt wird und zu einem starken Anstieg der intrazellulären S1P-Konzentration führte, wurde durch Meyer zu Heringdorf et al. (2001) in Untersuchungen an HEK293-Zellen entdeckt. Im Rahmen immunologischer Prozesse stellt die SPHK-Aktivierung durch die Bindung von Immunglobulinen ebenfalls einen bedeutenden Regulationsmechanismus dar. So führt die Kreuzvernetzung der Immunglobulinrezeptoren Fc $\gamma$ RI in Monozyten und Fc $\gamma$ RIII (Melendez et al. 1998; Melendez & Khaw 2002) zur Aktivierung von Tyrosinkinase und der Phospholipase D (PLD) mit nachfolgender SPHK-Aktivierung. In die hier ablaufende Signalkaskade ist der Phospholipase D-Aktivierungsweg einbezogen. Derselbe Mechanismus führt in Mastzellen nach Kreuzvernetzung von Fc $\epsilon$ -Rezeptoren durch Bindung von IgE-Molekülen zur Aktivierung von SPHK (Beaven & Baumgartner 1996; Choi et al. 1996; Kinet 1999; Prieschl et al. 1999). Aufgrund der Lokalisation des Substrates SP in der Plasmamembran ist zur Synthese von S1P durch SPHK neben deren Enzymaktivierung deren Translokation zur Plasmamembran erforderlich. Dieser Vorgang wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Rosenfeldt et al. (2001) wiesen die PDGF-abhängige Translokation von SPHK zur Plasmamembran im Rahmen PDGF-induzierter, S1P-abhängiger Migrationsprozesse kultivierter Endothelzellen nach. Kleuser et al. (2001) beobachteten zudem die Translokation von SPHK aus dem Cytosol zum Cytoplasma des Zellkerns infolge länger andauernder PDGF-Exposition. Die gleichzeitige Phosphorylierung und Translokation von SPHK wurde durch die Aktivierung von Proteinkinase C (PKC) hervorgerufen, welche wiederum das



Zielmolekül unterschiedlicher SPHK-aktivierender Faktoren wie Phorbol ester (Johnson et al. 2002), und vascular endothelial growth factor (VEGF) (Shu et al. 2002) darstellt. Johnson et al. (2002) zeigten an HEK293-Zellen, dass die Translokation von SPHK nicht nur zur Erhöhung der intra- sondern auch der extrazellulären S1P- Konzentration führt. Da der PKC-Aktivierung die Aktivierung des Enzymes Phospholipase C (PLC) vorangeht, wird vermutet, dass PKC ein Bindeglied zwischen der Aktivität von SPHK und vielen unterschiedlichen PLC-aktivierenden Substanzen darstellt, welche auf dem PKC-Weg die Produktion von S1P beeinflussen (Le Stunff et al. 2004b). Der Mechanismus der PKC-abhängigen SPHK-Aktivierung ist bisher noch unklar. Pitson et al. (2003) konnten anhand ihrer Untersuchungen an HEK293-Zellen die Phosphorylierung von SPHK1 durch die verwandten Enzyme ERK1 und -2 nachweisen. Hierbei handelt es sich um Enzyme, welche an verschiedenen Signaltransduktionswegen zur Vermittlung zellulärer Proliferationsprozesse beteiligt sind. Untersuchungen von Young et al. (2003) zufolge übt die Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration durch die Bildung eines Ca-Calmodulin-Komplexes, welcher die Translokation von SPHK zur Zellmembran induziert, ebenfalls einen aktivierenden Einfluss auf SPHK aus. Weitere Mechanismen der Regulation der SPHK-Aktivität basieren auf Protein-Protein Interaktionen zwischen SPHK und verschiedenen zellulären Proteinen. Untersuchungen an Hefezellen führten Hayashi et al. (2002) durch. Ihnen gelang die Identifikation des SPHK-bindenden Proteins RPK 118. Die Bindung des SPHK-Moleküles an dieses Protein führte zur Translokation von SPHK zu frühen Endosomen, an denen die Synthese von S1P stattfand. Ein weiteres, mit SPHK1 interagierendes Protein, SPHK1-interacting protein (SKIP), welches inhibitorische Effekte auf SPHK ausübte, entdeckten Lacana et al. (2002).

## **Material und Methoden**

### ***Tiere***

Für die durchgeführten Untersuchungen wurden adulte männliche Brown-Norway-Ratten mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 200-300 g aus der Zucht der Firma Charles River verwendet. Sensibilisierung, Allergenprovokation und Organentnahme wurden am Institut für Funktionelle und Angewandte Anatomie der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt. Von jedem Tier wurde Gewebe zur Durchführung von Immunhistochemie und PCR entnommen. Zusätzlich wurde von einem Teil der Tiere BAL-Material gewonnen.

### ***Sensibilisierung und Allergenprovokation***

Die Haltung der Tiere erfolgte unter spezifisch-pathogenfreien Bedingungen mit ad-libitum-Zugang zu Futter und Wasser. Allen Tieren wurde zur Sensibilisierung je 1 mg Ovalbumin (OVA; Fa. Sigma, Deisenhofen) mit 200 mg Al(OH)<sub>3</sub> (Sigma) als Adjuvans in 1,0 ml 0,9 % Kochsalz(NaCl)-Lösung (Braun, Melsungen) subkutan sowie als zweites Adjuvans eine konzentrierte Lösung aus  $5 \times 10^9$  hitzeinaktivierter Bakterien der Spezies *Bordetella pertussis* (Chiron Behring, Marburg) in 0,4 ml 0,9 % NaCl intraperitoneal injiziert. Beide Sensibilisierungsschritte wurden 7 Tage nach der ersten Sensibilisierung wiederholt. 7 Tage nach der zweiten Sensibilisierung erfolgte die Allergenprovokation. Dazu wurde den Tieren der Asthmagruppe unter Isofluran-Narkose von ca. 1 Minute Dauer eine Lösung aus 0,5 % OVA in 0,9 % NaCl in einem Gesamtvolumen von 250 µl intratracheal verabreicht. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten OVA-freie 0,9 % NaCl-Lösung. Zur Organentnahme wurde eine Tiergruppe 24 Stunden; eine weitere 48 Stunden nach der Allergenprovokation mit Isofluran narkotisiert und nach Eröffnung der Bauchhöhle mittels Durchtrennung der Aorta abdominalis getötet.

## **Gewebegewinnung**

### **Bronchoalveoläre Lavage (BAL)**

Nach Eröffnung des Thorax wurde bei einem Teil der Tiere eine BAL des rechten Lungenflügels durchgeführt. Nach Verschluss des linken Stammbronchus mit einer Klemme wurden durch eine Kanüle fünfmal 3 ml kalte sterile 0,9 % NaCl-Lösung über die Trachea in den rechten Lungenflügel instilliert und durch Abziehen zurückgewonnen. Die so gewonnene Lavageflüssigkeit wurde gesammelt und zentrifugiert (400x g; 10 min); das Pellet in 1 ml Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS; 28,75 ml Lösung A (0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O) , 96,20 ml Lösung B (0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O) mit Zusatz von 1 % bovinem Serumalbumin (BSA; Merck, Darmstadt) und 0,1 % Natriumazid (NaN<sub>3</sub>, Sigma), gelöst. Zur Bestimmung der Leukozytenzahl wurden 10 µl der Lösung mit 90 µl Tuerk'scher Lösung (Merck) versetzt und eine Neubauer-Zählkammer mit 1 µl der Lösung gefüllt. Durch Zentrifugation weiterer 1000 µl der Lösung wurden die gewonnenen Zellen mithilfe einer Cytospin Zentrifuge (Shandon, Pittsburgh, USA) auf jeweils einen Objektträger aufgetragen. Die übrige Lavageflüssigkeit wurde zentrifugiert, der Überstand abgezogen und das entstandene Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -80° C gelagert.

### **Gewinnung von Gewebe zur RNA- Isolation**

Von jedem Tier wurde nach Eröffnung des Thorax und *in-situ*-Füllung der Lunge mit Tissue-TeK (Sakura, Zoeterwoude, Holland, s.u.) ein Teil eines Lungenlappens abgetrennt und in sterilen Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80° C gelagert. Bei den Tieren, von denen Lavageflüssigkeit gewonnen wurde, wurden sowohl von der rechten, gespülten als auch von der linken, ungespülten Lungenhälfte Gewebestücke zur RNA-Isolation konserviert. Die bei der BAL gewonnenen Zellpellets wurden in je 200 µl PBS+346,5 µl Lysispuffer (Qiagen, Hilden) mit Zusatz von 3,5 µl β-Mercaptoethanol gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -80° C gelagert.

## **Gewinnung von Gewebe für Immunhistochemie**

Für die Anfertigung von Kryostatschnitten wurde am eröffneten Thorax in situ eine Venenverweilkanüle (2,2 mm Durchmesser; Braun, Melsungen) in die zuvor freigelegte und eingeschnittene Trachea eingeführt, über welche die Lunge durch ca. 5 ml mit 0,9% NaCl verdünntem Tissue-Tek (Verhältnis 1:4), gebläht wurde. Die geblähte Lunge wurde entnommen, in vergleichbar große Würfel zerteilt, in sterilen Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Gewebestücke wurden dann bei Bedarf auf ein mit einem Tropfen Tissue-Tek vorbereitetes Stück Filterpapier gesetzt, mit Tissue-Tek überschichtet und in flüssigem Isopentan schockgefroren.

## ***RNA-Isolation, reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion***

Die Präsenz von SPHK1 und SPHK2 wurde zunächst anhand von qualitativer PCR überprüft, bevor mit denselben Proben deren relative Expressionsmengen mithilfe quantitativer Real-Time –PCR (qRT-PCR) bestimmt wurden.

### **RNA-Isolation**

#### ***RNA-Isolation aus Lungengewebe***

Die Gesamt-RNA des Lungengewebes wurde mithilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert. 30  $\mu\text{g}$  Gewebe wurde unter Zugabe von 600  $\mu\text{l}$  Lysispuffer-/  $\beta$ -Mercaptoethanolgemisch (10  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol/ml Gesamtvolumen) in einer Kugelmühle (Retsch, Haan) homogenisiert (300 U/min, 2 min); gleichzeitig wurden durch den Lysispuffer die Zellmembranen zerstört und im Gewebe vorhandene RNAsen inaktiviert sowie an die RNA gebundene Proteine denaturiert. Nach Zentrifugation (14.000 rpm, 1 min,  $25^{\circ}\text{C}$ ) wurde der gewonnenen RNA-Lösung ca. 600  $\mu\text{l}$  70% Ethanol zugegeben, maximal 700  $\mu\text{l}$  der Lösung auf die Silikatmembran einer RNEasy-Säule pipettiert und zentrifugiert (10.000 rpm, 1 min,  $25^{\circ}\text{C}$ ). Die an die Silikatmembran gebundene RNA wurde in 700  $\mu\text{l}$  Waschpuffer gereinigt, wiederholt zentrifugiert (10.000 rpm, 1 min,  $25^{\circ}\text{C}$ ), und nach Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  eines weiteren Waschpuffers und zwei Zentrifugationsschritten (10.000

rpm, 2 min, 25° C; 14.000 rpm, 1 min, 25° C) in je 50 µl RNase-freiem Wasser (Fresenius) gelöst. Sämtliche Schritte wurden unter Kühlung auf Eis vorgenommen. Die Menge der resuspendierten RNA wurde mittels eines Spektralphotometers (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg) bestimmt und diese bis zur Weiterverarbeitung bei –80° C gelagert.

### ***RNA-Isolation aus BAL-Material***

Die RNA-Isolation des in Lysispuffer-/ β-Mercaptoethanolgemisch konservierten BAL-Materials wurde mithilfe des Qia-Shredder-Systemes (Qiagen) durchgeführt, wobei die vorliegende Suspension durch Zentrifugation (14.000 rpm, 2 min, 25° C) auf Qia-Shredder-Säulen von Zelltrümmern befreit wurde, bevor die verschiedenen Waschschriffe analog der RNA-Isolation aus Lungengewebe durchgeführt wurden.

### **DNase-Verdau und reverse Transkription**

Zur Herstellung von cDNA wurden 1 µg der gewonnenen RNA eingesetzt. Dazu wurde das benötigte Volumen mithilfe der photometrisch bestimmten RNA-Konzentration jeder Probe rechnerisch ermittelt und, falls erforderlich, mit RNase-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 8 µl verdünnt. Zur Zerstörung eventuell noch vorhandener genomischer DNA wurde ein DNase-Verdau mittels DNase I durchgeführt. Die eingesetzte RNA wurde hierzu mit 1U DNase I (1 U/µl, Invitrogen,) und 1 µl 10x DNase I Reaction Buffer (Invitrogen) 15 min bei 25° C inkubiert und anschließend das Enzym durch Zugabe von 1 µl EDTA (25 mM, pH 8,0, Invitrogen) und Erhitzung für 10 min auf 65° C inaktiviert. Zur Übersetzung der mRNA in cDNA wurden zunächst 1 µl Oligo-dTs (500 µg/µl, MWG Biotech, Ebersberg) und 1 µl dNTP-Mix (10 mM jedes dNTP, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) zugefügt und der Ansatz für 10 min bei 65° C inkubiert. Nach Zugabe von 4 µl 5x First Strand Buffer (Invitrogen), 2 µl Dithiothreitol (100 mM, Invitrogen) und 1 µl Wasser wurde der Ansatz für 2 min auf 42°C erhitzt ; darauf folgte die Zugabe von 1 µl Superscript II Reverse Transkriptase (200 U/µl, Invitrogen) mit folgender Inkubation von 50 min, danach wurde das Enzym durch 15minütige Erhitzung auf 70° C inaktiviert. Die erhaltene cDNA wurde bis zur Weiterverwendung bei –80° C gelagert.

## Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation der gesuchten DNA-Abschnitte wurden jeweils 0,6 µl des Forward- und Reverseprimers gegen das SPHK1a-Gen sowie gegen das β-Actin-Gen (je 200 pmol/µl, Synthese: MWG Biotech, Ebersberg, s.u.) zum Nachweis einer erfolgreichen RNA-Isolation und cDNA-Synthese verwendet. Anstelle von β-Actin wurde in der weiter unten beschriebenen quantitativen Real-Time-PCR β-Microglobulin als „house keeping gene“ eingesetzt. Zur Amplifikation der SPHK-1-cDNA wurden 2 µl, zur Amplifikation der β-Actin-cDNA 1 µl der synthetisierten cDNA eingesetzt. Zusätzlich wurden jeweils 0,6 µl dNTPs (100 mM je dNTP, Amersham Pharmacia Biotech), 2,5 µl Magnesiumchlorid (25 mM, Applied Biosystems, Weiterstadt), 2,5 µl 10x PCR Buffer II (Applied Biosystems), 0,1 µl AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) und RNase-freies Wasser bis zu einem Endvolumen von 25 µl pro Ansatz zugefügt. Zusätzlich diente eine ohne cDNA-Zusatz angesetzte Probe als Negativkontrolle. Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler (Eppendorf, Hamburg) nach folgendem Protokoll: Zum Schmelzen der vorliegenden DNA-Doppelstränge und Aktivierung des Enzymes AmpliTaq Gold wurde der Reaktionsansatz für 10 min auf 95° C erhitzt, daraufhin wurde folgender Zyklus 40 mal durchlaufen: Erhitzung auf 94° C für 45 s zum Schmelzen doppelsträngiger DNA, 45 s bei für die Primerpaare spezifischer Anlagerungstemperatur (58° C) und 45 s bei 73° C zur Synthese neuer DNA-Fragmente. Nach Durchlaufen der 40 Zyklen wurde die Temperatur für 7 min auf 73° C gehalten, um noch nicht vollständig synthetisierte DNA-Fragmente fertigzustellen. Die Produkte wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4° C gelagert. Die verwendeten Primer wurden mithilfe eines Computerprogrammes (Zugang unter [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) basierend auf den, in der Gen Bank veröffentlichten SPHK1 und -2 -bzw. β-actin- und β-Microglobulin-Sequenzen der Ratte konzipiert und mittels des BLAST-Programmes überprüft.

### **Primerpaare gegen SPHK 1 der Ratte**

(107	bp;	Accession	No.	NM_133386)			
<b>fwd:</b>	5'-TGA	CGT	GGA	CTT	GGA	GAG	TG-3'
<b>rev:</b>	5'-CCA GTT GGC CTT GGT AAA TG -3'						

### **Primerpaare gegen SPHK 2 der Ratte**

(121 bp; Accession No. NM\_001012066)  
**fwd:** 5'-AGA CCC ATT GCT GCC TTC AT-3'  
**rev:** 5'-TTC TGG AGC ATT GTG GAT GG-3'

### **Primerpaare gegen $\beta$ -Actin der Ratte**

(232 bp; Accession No. NM\_031144.2)  
**fwd:** 5'-ATG GTG GGT ATG GGT CAG AA-3'  
**rev:** 5'-GGC TCA TCT TTT CAC GGT TG-3'

### **Primerpaare gegen $\beta$ 2-Microglobulin der Ratte**

(191 bp; Accession No. NM\_012512)  
**fwd:** 5'-TGT CTC AGT TCC ACC CAC CT-3'  
**rev:** 5'-GGG CTC CTT CAG AGT GAC G-3'

Mit Ausnahme des Primers gegen  $\beta$ 2-Microglobulin liegen alle verwendeten Primer in der codierenden Sequenz des Produktes.

## **Auswertung der RT-PCR**

Die Produkte der PCR wurden nach Zugabe von 5  $\mu$ l des Farbstoffes Orange G (Sigma Aldrich, Taufkirchen) zu 25  $\mu$ l PCR-Produkt auf ein 2%iges Agarosegel (2 g Agarose (Genaxis Biotechnology, Saint-Cloud Cedex, Frankreich) gelöst in 100 ml TAE-Puffer (einfach konzentriert, für 50fache Konzentration: 252 g TrisPuffer, 57,1 ml Eisessig und 100 ml 0,5 M EDTA, 0,6  $\mu$ l Ethidiumbromid) aufgetragen und nach Anlegen einer Spannung von 120 V bei 80 A (Stromquelle: Powersupply PPS, MWG-Biotech) in einer Elektrophoresekammer (Horizon 11.14, Gibco BRL, Karlsruhe) aufgetrennt. Die Beurteilung der PCR-Produktgröße erfolgte durch den Vergleich der entstandenen Banden mit ebenfalls aufgetragenen standardisierten Markern einer Größe von 100 Basenpaaren (bp) (100 bp DNA-Ladder, Gibco BRL). Aufgrund der Markierung der Banden mit Ethidiumbromid konnten diese durch Beleuchtung mit einem UV-Schirm (Transilluminator TI 1, Biometra, Göttingen)

visualisiert werden und wurden zu Dokumentationszwecken mit einer Sofortbildkamera (Polaroid, St. Albans-Hertfordshire, UK) fotografiert.

## **Quantitative RT-PCR**

Zur Quantifizierung der SPHK-mRNA-Expression wurde zusätzlich eine Real-Time-PCR in einem I-Cycler (Biorad, München) durchgeführt. Dazu wurde jeweils ein dreifacher Ansatz jeder Probe aus 8,5 µl DNA, welche zuvor im Verhältnis 1:5 mit RNase-freiem Wasser verdünnt wurde, 1,5 µl der o.g. Primer, 12,5 µl MasterMix CyBr-Green (Qiagen) und 20 µl 1:4000 mit RNase freiem Wasser verdünnten Fluorescein (ABGene, Surrey, UK) hergestellt. Zur Amplifikation der DNA-Abschnitte wurde folgendes Protokoll verwendet: Nach 15minütiger Enzymaktivierung und Denaturierung der DNA-Doppelstränge bei 95°C wurde ein Amplifikationszyklus, bestehend aus einem Denaturierungsschritt von 30 sec bei 95°C, einem Primer-Anlagerungsschritt von 30 sec bei 58°C und einem DNA-Strang-Verlängerungsschritt von 30 sec bei 72°C, 60 mal durchlaufen. Zuletzt folgte zur Ermittlung der Schmelzkurve für die Überprüfung der Produkte eine hundertfache Steigerung der Temperatur, ausgehend von 50°C. Die Anzahl der Zyklen, die für die jeweilige Probe benötigt wurde, um eine zur Auslösung eines Fluoreszenzsignales ausreichende DNA-Menge zu amplifizieren, ergab den spezifischen CT-Wert. Aus den CT-Werten von SPHK und des Referenzgens  $\beta$ 2-Microglobulin jedes Ansatzes wurde der CT-Wert errechnet. Durch Vergleich der  $\Delta$ CT-Werte der unterschiedlichen Proben konnte auf die relative Menge enthaltener cDNA geschlossen werden. Zusätzlich wurde für beide SPHK-Isoformen deren relative Expression durch Anwendung der Formel  $2^{-(\Delta CT)}$  ermittelt.

## ***Immunhistochemie***

### **Herstellung von Gefrierschnitten**

Von dem in Tissue-Tek eingebetteten und tiefgefrorenen Gewebe wurden mithilfe eines Kryostaten (Kryostat CM 1900, Leica, Bensheim) Schnitte von 10 µm Dicke angefertigt und auf Objektträger SuperFrost Plus (Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgezogen und 5 Minuten luftgetrocknet. Nach 20 minütiger Fixation in -20°C kaltem Aceton (Merck, Darmstadt) wurden die Schnitte eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet.



## Durchführung der immunhistochemischen Doppelmarkierung

Zur Blockung unspezifischer Bindungen wurde normales Schweineserum (NSS, Schlachthof Marburg) 1:1 verdünnt in 0,005 M Phosphatpuffer pH 7,4 mit 4,48 g/l NaCl (PBS+S) bzw. Blocklösung (0,1 % Bovines Serum Albumin (BSA), 10 % NSS, 0,5 % Tween 20) aufgetragen und für eine Stunde inkubiert. Darauf folgte nach Absaugen der Lösung die mindestens 12-stündige Inkubation mit den Primäantikörpern (s.u.) bei Raumtemperatur bzw. 4°C. Die für die Doppelimmunfluoreszenz benötigten Primäantikörper wurden gemeinsam in PBS+S auf die benötigte Konzentration (s.u.) verdünnt. Um eine Austrocknung der Schnitte bzw. Aufkonzentration der aufgetragenen Lösungen zu vermeiden, wurden die Objektträger während der Inkubation in einer feuchten Kammer gelagert. Es folgten zwei 10minütige Waschschrte mit PBS; darauf die 1stündige Inkubation mit den Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundäantikörpern (s.u.) bei Raumtemperatur. Nach zwei weiteren Waschvorgängen wurden die Schnitte 10 min bei Raumtemperatur unter Lichtabschluß in 4% Paraformaldehyd (PFA) in 0,1 M Phosphatpuffer nachfixiert und nach zwei weiteren Waschvorgängen mit gepuffertem Glycerol (Carbonatpuffer aus jeweils gleichen Teilen von Lösung A (0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) und Lösung B (0,5 M NaHCO<sub>3</sub>), pH 8,6, Mischung des Glycerols (Merck) mit Carbonatpuffer im Verhältnis 2:1) eingedeckelt. Die Lagerung erfolgte im Dunkeln bei -20°C.

<b>Antigen</b>	<b>Wirtsspezies</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Quelle</b>
Sphingosinkinase-1a	Kaninchen, polyklonal	1:800	Kohama et al., 1998
Cytochrom b 558 (gp91phox) (NADPH- Oxidase)	Maus, monoklonal	1:1000	J.Burrit, Montana
CD 68 (ED1)	Maus, monoklonal	1:400	Serotec, Frankfurt

Tab. 1: Verwendete Primärseren

<b>Antigen</b>	<b>Wirtsspezies</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Quelle</b>
Kaninchen-IgG	Esel	Cy-3	1:2000	Dianova, Hamburg
Maus-IgG	Esel	FITC	1:400	Dianova

Tab. 2: Verwendete Sekundärseren

Der zur Detektion von SPHK-1a verwendete Antikörper erkennt die 16 C-terminalen Aminosäuren (APSGRDSRRGPPPEEP) der murinen SPHK-1a-Sequenz.

## Fluoreszenzmikroskopie

Die Betrachtung und Auswertung der Gewebeschnitte erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Jena). Als Fluoreszenzfilter wurden für FITC ein Erregerfilter mit einer Bandbreite von 470-490 nm und ein Sperrfilter mit einer Bandbreite von 515-550 nm; für Cy3 ein Erregerfilter mit einer Bandbreite von 525-560 nm und ein Sperrfilter mit einer Bandbreite von 570-650 nm eingesetzt.

## Auswertung

Pro Tier wurden drei Schnitte angefertigt; diese wurden auf die Qualität der immunhistochemischen Markierung und die Lokalisation immunreaktiver Zellen untersucht und der qualitativ beste Schnitt jedes Tieres zur Beurteilung herangezogen. Die Gewebeschnitte sowie die BAL-Cytospins wurden bei 40facher Vergrößerung zunächst komplett durchmustert, um die Dichte und die Verteilung immunreaktiver Zellen beurteilen zu können. Von jedem Präparat wurde ein repräsentativer Bezirk ausgewählt, mithilfe des Programmes AxioVision (Zeiss) auf einem Computerbildschirm abgebildet und fotografiert. Dabei wurde darauf geachtet, immer möglichst ähnliche Bezirke mit derselben Belichtungszeit aufzunehmen. Es wurden derselbe Ausschnitt eines Präparates jeweils sowohl mit dem FITC- als auch mit dem Cy3-Filter abgebildet und die entstandenen Aufnahmen auf dem Bildschirm nebeneinander positioniert. Durch Auszählen der in einem Aufnahmegebiet sichtbaren gp91phox/ED-1- sowie der SPHK1a-immunreaktiven Zellen wurde deren absolute Anzahl bestimmt. Zusätzlich wurde durch den Vergleich der nebeneinander abgebildeten FITC- und Cy3-Abbildungen die Anzahl der Zellen, welche eine Kolokalisation beider Antigene zeigten, bestimmt. Von jedem Präparat wurden jeweils drei repräsentative Bezirke nach diesem Verfahren ausgewertet und aus den erhaltenen Zellzahlen der Mittelwert errechnet. Aus den erhaltenen Werten wurde der prozentuale Anteil der Kolokalisation zeigenden Zellen an der Gesamtzahl im betreffenden Aufnahmegebiet ermittelter gp91phox- bzw. ED1-immunreaktiver Zellen errechnet und auch hier der Mittelwert bestimmt. Zur statistischen Auswertung der erhaltenen Daten diente das Statistikprogramm SPSS 9.0 (SPSS.Inc., Illinois.USA). Differenzen zwischen den einzelnen Vergleichsgruppen wurden bei  $p \leq 0,05$  als signifikant eingestuft.

## **Präabsorption**

Um die Spezifität der Bindung des verwendeten SPHK-1a-Antiserums zu testen, wurde dieses mit SPHK-1a-Antigen für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert (20 µg Peptid/50 µl endverdünntes Serum). Darauf folgte die Verwendung des abgesättigten Serums in der oben beschriebenen Weise in der Immunfluoreszenz. Als Positivkontrolle wurde parallel hierzu Primärserum ohne Antigen eingesetzt. Markierungen, die nur bei Verwendung des reinen Primärserums sichtbar waren, wurden als spezifisch angesehen. Die zur Bestimmung der Spezifität des verwendeten Antikörpers gegen SPHK1a vorgenommene Präabsorption mit SPHK1a-Primärserum wurde nach deren Durchführung fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet, wobei die Immunreaktivität der zur Präabsorption eingesetzten Lungengewebeschnitte mit der in den ohne Vorinkubation des SPHK1a-Antikörpers mit dem Primärserum angefertigten Präparaten verglichen wurde. SPHK1a-Immunreaktivität war nur bei Verwendung nicht-präabsorbierten Antiserums vorhanden. Somit wurde der eingesetzte Antikörper gegen SPHK1a als spezifisch angesehen.

# Ergebnisse

## ***Vorkommen von SPHK im Lungengewebe***

### **Immunhistochemie**

Zum Vergleich des Vorkommens SPHK-1a-immunreaktiver Zellen im Lungengewebe asthmatischer und gesunder Ratten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Allergenprovokation wurden folgende Gruppen miteinander verglichen: Gewebeschnitte von jeweils drei gesunden und drei asthmatischen Ratten 24 Stunden sowie 48 Stunden nach Allergenprovokation wurden zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung herangezogen. In jeder Gruppe wurden Doppelimmunfluoreszenzuntersuchungen mit einer Kombination des SPHK-1a-Antikörpers und den oben genannten Antikörpern gp91phox sowie ED1 durchgeführt. Neben der Verwendung von gespültem Lungengewebe wurden ebenfalls jeweils drei Tieren jeder Gruppe ungespültes Lungengewebe entnommen und unter denselben Bedingungen mit den Antikörpern gp91phox und SPHK-1a inkubiert und untersucht. Von jedem Präparat wurden jeweils drei Gesichtsfelder eines repräsentativen Bereiches des Lungenparenchyms ausgewertet.

### ***Lokalisation von SPHK im Lungengewebe***

In allen untersuchten Präparaten zeigten glatte Muskelzellen aller Lungengefäße und Bronchien eine intensive cytoplasmatische SPHK1a-Immunreaktivität (s. Abb. 7, 8, 9, 10a). Des Weiteren zeigten wenige der im Lungenparenchym sowohl inter- als auch intraalveolär gelegenen, mononukleären Zellen SPHK1a-Immunreaktivität im Bereich des Cytoplasmas (s. Abb. 10a, 10b, 11). Die interstitiell gelegenen SPHK1a-immunreaktiven mononukleären Zellen zeigten eine inhomogene Verteilung: Größere Ansammlungen fanden sich vereinzelt sowohl bei Asthma- als auch bei Kontrolltieren im perivaskulären und peribronchialen Bereich (s. Abb. 8, 9). In der Lungenperipherie fanden sich SPHK1a-immunreaktive mononukleäre Zellen in geringer Anzahl im Alveolarraum und in höherer Anzahl in den interalveolären Septen. Im Unterschied zu den Tieren der Kontrollgruppe und den nach 48 Stunden untersuchten Tieren war in der Gruppe der Asthmatiere 24 Stunden nach Allergenprovokation die Anzahl der in der Lungenperipherie lokalisierten SPHK1a-immunreaktiven mononukleären Zellen deutlich erhöht.

Zur näheren Charakterisierung der mononukleären Zellen wurden

Doppelimmunfluoreszenzuntersuchungen mit dem gegen die in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten enthaltene NADPH-Oxidase-Untereinheit gp91phox gerichteten Antikörper gp91phox bzw. mit dem das makrophagen-spezifische CD68-Antigen bindenden Antikörper ED1 durchgeführt. Hierbei wurden zunächst durch Auszählung die absoluten Zahlen an SPHK1a- und gp91phox- bzw. ED1-immunreaktiven mononukleären Zellen pro Gesichtsfeld ermittelt. Durch Vergleich desselben Bildausschnittes unter Verwendung des Cy3- bzw. FITC- Filters wurde die Anzahl der Zellen, bei denen eine Kolokalisation von SPHK1a und CD68 bzw. gp91phox vorlag, ermittelt. Um zu ermitteln, welcher Teil der SPHK1a-immunreaktiven Zellen zur Gruppe der neutrophilen Granulozyten bzw. Makrophagen gehört, wurden der prozentuale Anteil der ED1- bzw. gp91phox-immunreaktiven Zellen an der Zahl der SPHK1a-immunreaktiven Zellen berechnet. In allen Schnitten waren in 100% der SPHK1a-immunreaktiven, mononukleären Zellen SPHK1a und gp91phox kolokalisiert (s. Abb. 8, 9, 10a, 10b, 11). Eine Kolokalisation von SPHK1a und CD68 lag dagegen nur bei einer Subpopulation der SPHK-1a-immunreaktiven Zellen vor. Der Anteil SPHK-1a-immunreaktiver Zellen, welche eine Bindung des ED1-Antikörpers zeigten, lag unabhängig von der Zugehörigkeit zur Asthma- oder Kontrollgruppe 24 und 48 Stunden nach Allergenprovokation bei durchschnittlich 80%.

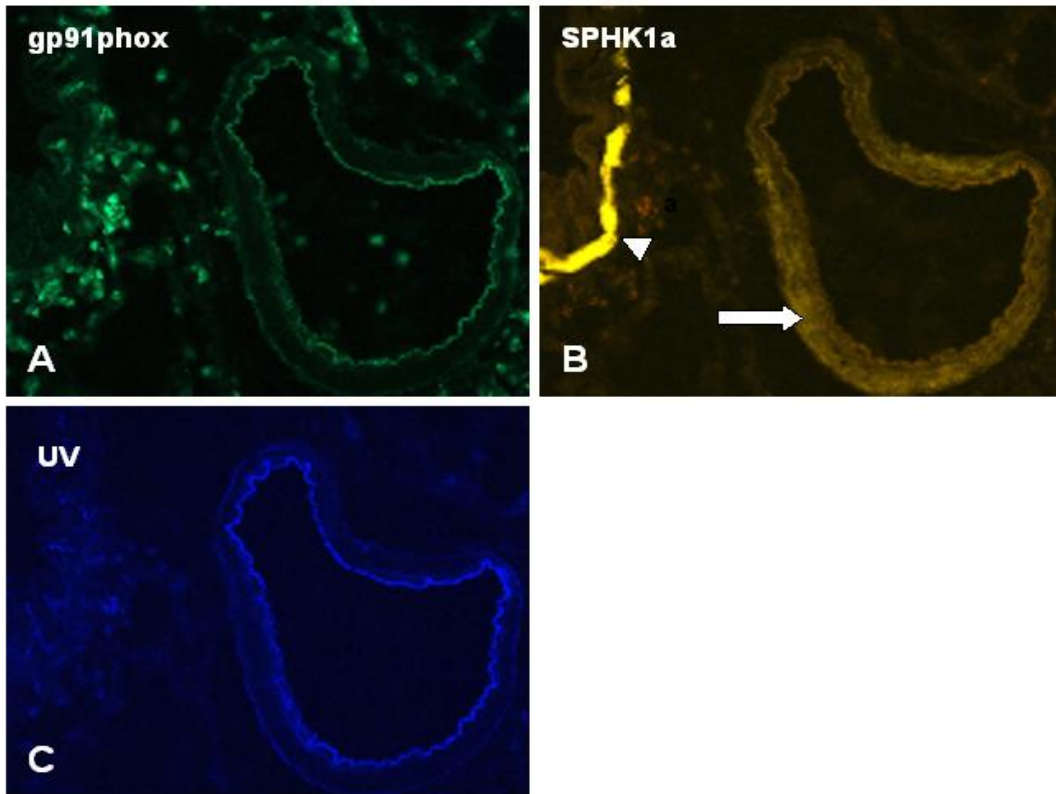


Abb. 7: Die Doppelimmunfluoreszenz zeigt perivaskuläre und peribronchiale Ansammlungen mononukleärer Zellen (A). Die glatte Muskulatur der Atemwege zeigt eine starke SPHK1a-Immunreaktivität; der Pfeilkopf in B zeigt auf die Tunica muscularis eines Bronchus, der Pfeil in B weist auf die Tunica muscularis einer Pulmonalarterie. Die Kontrolle auf Autofluoreszenz (Bild C, UV) zeigt die Membrana elastica interna der Pulmonalarterie.

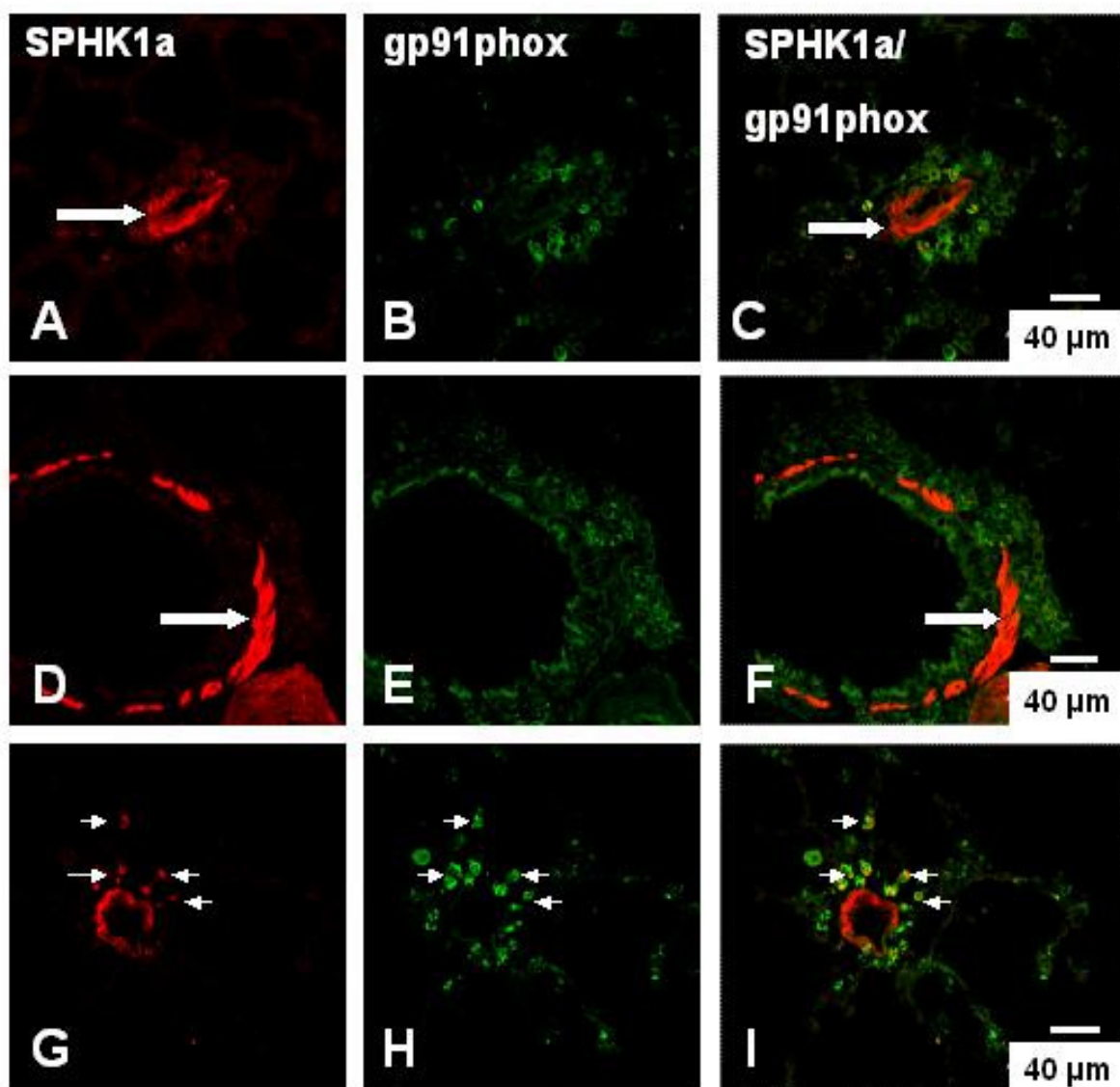


Abb. 8: SPHK1a-Immunreaktivität in glatter Gefäßmuskulatur (Pfeile in Bild A, C), in glatter Bronchialmuskulatur (Pfeile in Bild D, F) sowie in perivaskulär gelegenen immunkompetenten Zellen



(Pfeile in Bild G, H, I). Durch Überlagerung der Fluoreszenzen der verwendeten Sekundärantikörper (Bild C, F, I) wird die Kolo-kalisation von SPHK1a (Bild A, D, G) und gp91phox (Bild B, E, H) in perivaskulären immunkompetenten Zellen bei einem Tier der Kontrollgruppe dargestellt. Maßstab = 40  $\mu$ m.

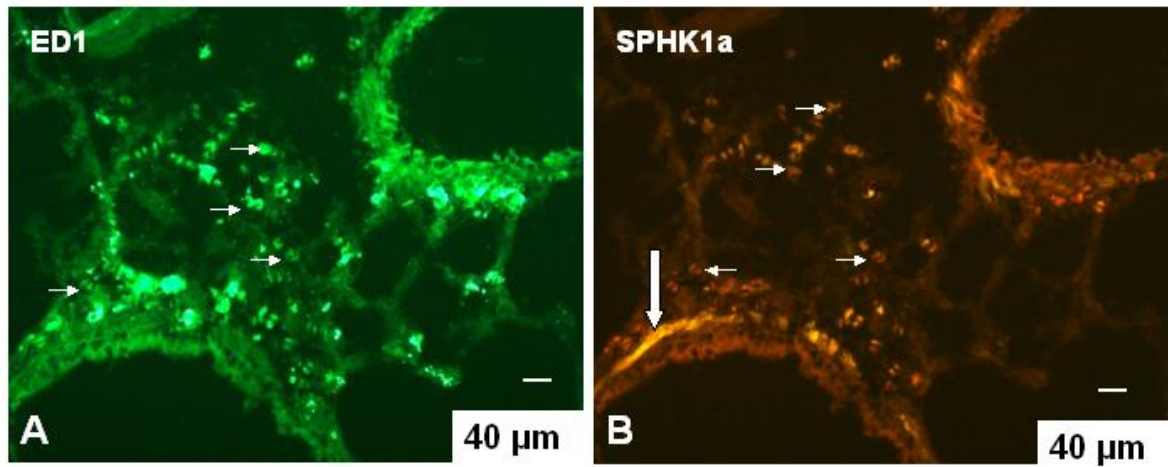


Abb. 9: SPHK1a-Immunreaktivität in glatter Bronchialmuskulatur (breiter Pfeil in Bild B) und in ED1-immunreaktiven Zellen (schmale Pfeile in Bild A; B) im Peribronchial- und Alveolarbereich bei einem Kontrolltier. Maßstab = 40 µm.

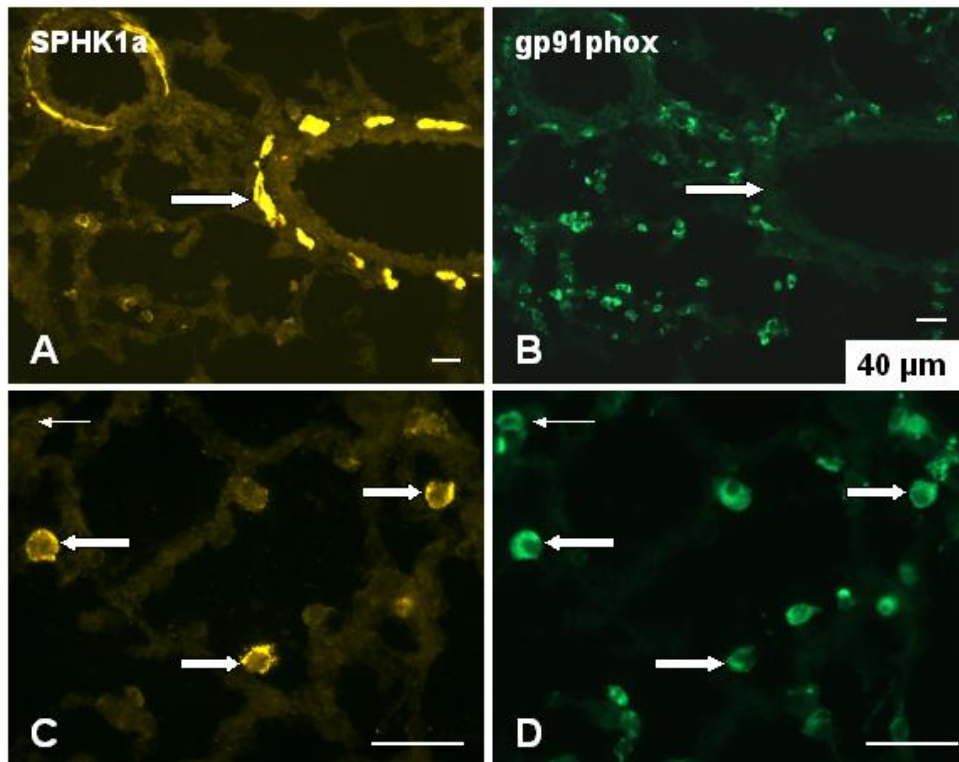


Abb. 10a: SPHK1a-Immunreaktivität in glatter Bronchialmuskulatur (breite Pfeile in Bild A, B) und im Cytoplasma gp91phox-immunreaktiver Zellen im inter- und intraalveolären Bereich in der Lungenperipherie (Bild C, D) bei einem Tier der Asthmagruppe. Die meisten gp91phox-immunreaktiven Zellen zeigen auch SPHK1a-Immunreaktivität (breite Pfeile in Bild C, D); vereinzelte Zellen sind jedoch nur gp91phox-immunreaktiv (schmaler Pfeil in Bild D). Maßstab = 40 µm.

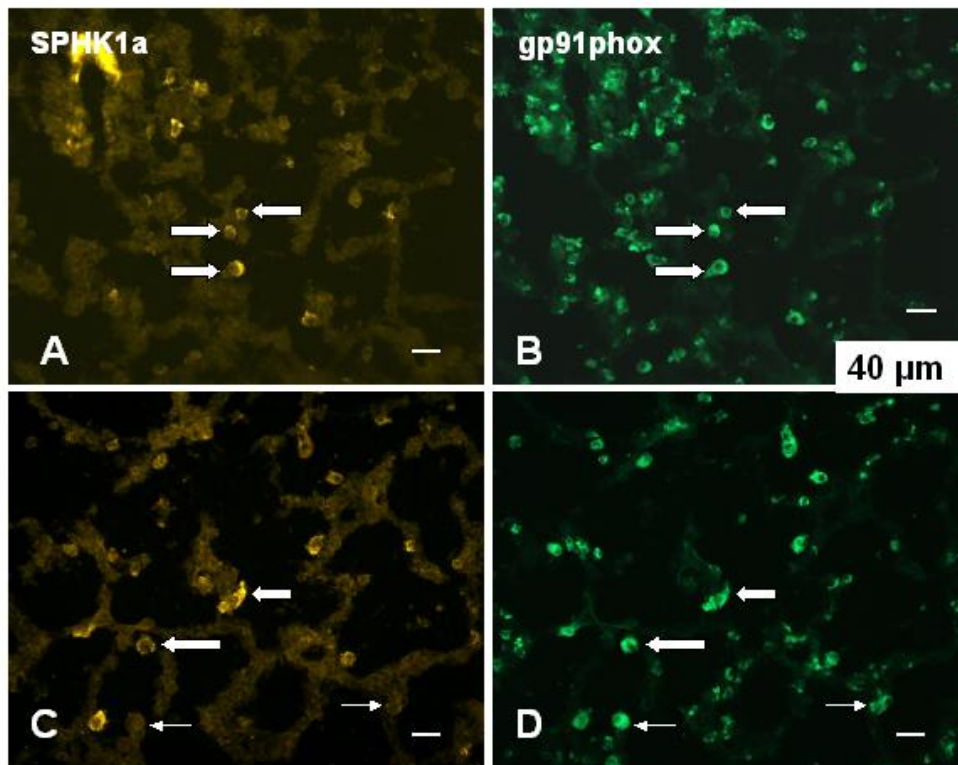


Abb. 10b: SPHK1a- und gp91phox-immunreaktive Zellen in der Alveolarregion desselben Tieres wie in Abb. 10a (Bild A, B, C, D). Zellen, in denen SPHK1a und gp91phox kolokalisiert vorkommen, sind mit breiten Pfeilen, gp91phox-immunreaktive Zellen ohne SPHK1a-Immunreaktivität mit schmalen Pfeilen gekennzeichnet. Maßstab = 40  $\mu\text{m}$ .

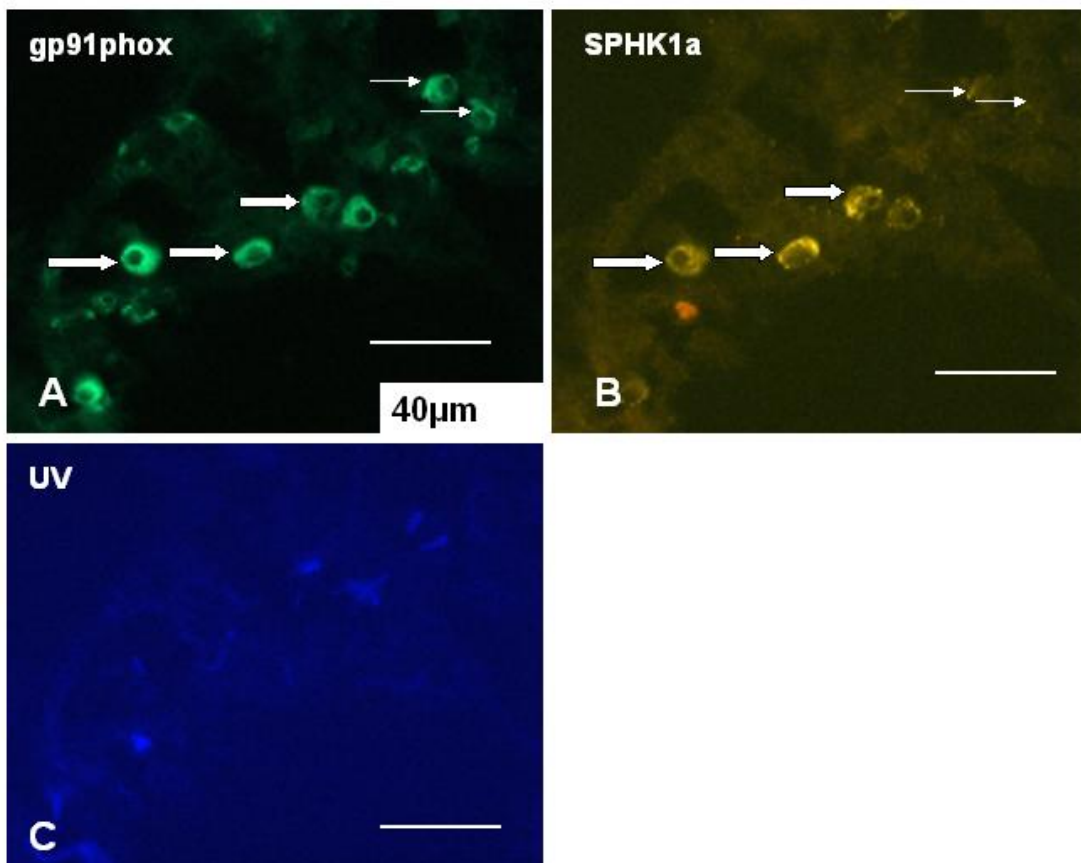


Abb. 11: SPHK1a- (Bild B) und gp91phox-immunreaktive (Bild A) Zellen in Alveolen und interalveolären Septen in der Lungenperipherie eines Tieres der Asthmagruppe. Deutlich zu sehen ist die Begrenzung der SPHK1a-Immunreaktivität auf den Bereich des Cytoplasmas (Bild B). Nicht alle gp91phox-immunreaktiven Zellen zeigen SPHK1a-Immunreaktivität (schmale Pfeile in Bild A, B). In einigen Zellen ist die Kolokalisation von SPHK1a und gp91phox deutlich sichtbar (breite Pfeile in Bild A, B). Das mit dem UV-Filter aufgenommene Bild (Bild C) zeigt, dass die beobachtete Fluoreszenz der markierten Zellen tatsächlich auf Bindung der eingesetzten Antikörper und nicht auf Autofluoreszenz der Zellen beruht, da hier nur im UV-Bereich fluoreszente elastische Fasern und keine Fluoreszenz der betreffenden Zellen zu sehen ist. Maßstab = 40 µm.

## ***Vorkommen von SPHK1a in gp91phox-immunreaktiven mononukleären Zellen***

### **Vergleich von Asthma- und Kontrollgruppe**

Der Anteil SPHK1a- und gp91phox- immunreaktiver Zellen war bei den Tieren mit allergischem Asthma gegenüber den Kontrolltieren 24 Stunden nach Allergenprovokation signifikant erhöht. 48 Stunden nach Allergenprovokation lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen Asthma- und Kontrolltieren vor. Der Anteil SPHK1a-immunreaktiver Zellen bei Asthmatischen lag hier nur geringfügig über dem Niveau der Kontrollgruppe (s. Abb. 12; Tab. 3, 4). Die Untersuchung ungespülter Lungenschnitte ergab ebenfalls signifikante Erhöhungen der Werte der Asthmatischen im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe nach 24 Stunden; hier waren die Unterschiede zwischen Asthma- und Kontrolltieren wesentlich größer. Die nach 48 Stunden ermittelten Werte zeigten auch im ungespülten Lungengewebe keine signifikanten Unterschiede (s. Tab. 5, 6).

### **Vergleich der 24 und 48 Stunden nach Allergenprovokation untersuchten Gewebe**

Sowohl in der Gruppe der Asthma- als auch in der Gruppe der Kontrolltiere kam es zu einem signifikanten Rückgang des Anteiles SPHK1a-immunreaktiver Zellen an der Gesamtzahl gp91phox-haltiger Zellen zwischen 24 und 48 Stunden nach Allergenprovokation, wobei der Rückgang in der Gruppe der Asthmatischen stärker ausfiel als in der Kontrollgruppe (s. Tabelle 3, 4). Dies ergab sowohl die Untersuchung gespülten als auch ungespülten Lungengewebes. Im ungespülten Lungengewebe fielen die Unterschiede zwischen den ermittelten 24- und 48 Stunden-Prozentanteilen größer aus als im gespülten Lungengewebe (s. Tabelle 5, 6).

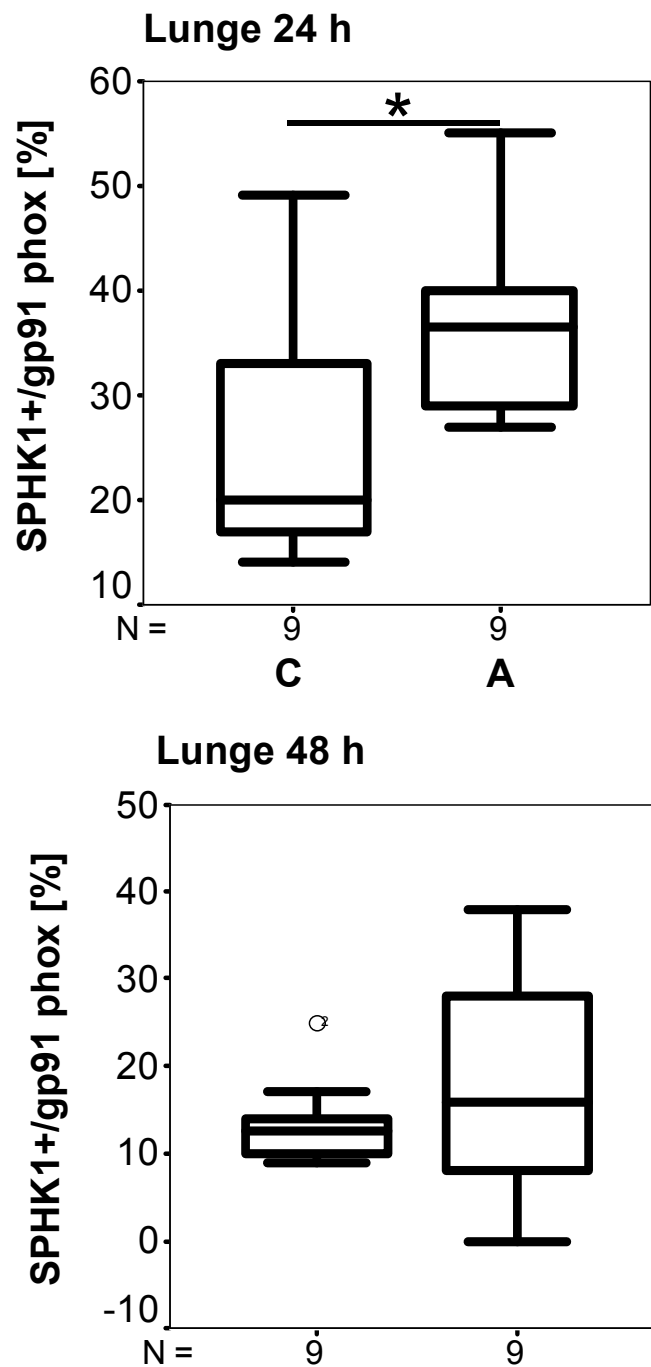


Abb. 12: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die 25- und 75- Perzentile des Anteiles SPHK1a-immunreaktiver Zellen an der Gesamtzahl gp91phox-positiver Zellen im Lungenparenchym. Vergleich von Asthma (A)- und Kontrollgruppe (C) 24 (oben) und 48 (unten) Stunden nach Allergenprovokation. N = Anzahl ausgezählter Gesichtsfelder

## **Vorkommen von SPHK 1a in ED1-immunreaktiven mononukleären Zellen**

Es wurden jeweils drei Gewebeschnitte gespülter Lungen von Asthma- und Kontrolltieren 24 Stunden sowie 48 Stunden nach Allergenprovokation mit primären Antikörpern gegen SPHK-1a und CD68 inkubiert und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Um die Expression von SPHK-1a durch ED1-immunreaktive mononukleäre Zellen im Verlauf allergischen Asthmas zu quantifizieren, wurde der prozentuale Anteil der Zellen, in welchen beide Antigene kolokalisiert vorlagen, an der Gesamtzahl ED1-immunreaktiver Zellen errechnet. Mithilfe des Mann-Whitney-Tests wurden nach 24 sowie nach 48 Stunden die Gruppe der Asthmatiere mit der jeweiligen Gruppe der Kontrolltiere sowie innerhalb der Asthma- und Kontrolltiere die Gruppe der nach 24 sowie nach 48 Stunden untersuchten Tiere auf signifikante Unterschiede bezüglich dieses Merkmales miteinander verglichen.

### **Vergleich von Asthma- und Kontrollgruppe**

Der Anteil SPHK1a-immunreaktiver ED1-positiver Zellen war bei den Tieren mit allergischem Asthma gegenüber den Kontrolltieren 24 Stunden nach Allergenprovokation signifikant erhöht. 48 Stunden nach Allergenprovokation lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen Asthma- und Kontrolltieren vor. Der Anteil SPHK1a-immunreaktiver Zellen bei Asthmatiere lag hier auf dem Niveau der Kontrollgruppe (s. Abb. 13; Tab. 3, 4).

### **Vergleich der 24 und 48 Stunden nach Allergenprovokation untersuchten Gewebe**

In der Gruppe der Kontrolltiere lag zwischen 24 und 48 Stunden nach Allergenprovokation kein signifikanter Unterschied des Anteils SPHK1a-immunreaktiver Zellen an der Gesamtzahl ED1-immunreaktiver Zellen vor. Im Unterschied dazu fand in der Gruppe der Asthmatiere nach 48 Stunden eine signifikante Verringerung des Anteiles SPHK1a-immunreaktiver Zellen im Vergleich zu den nach 24 Stunden ermittelten Werten statt (s. Tab. 3, 4).



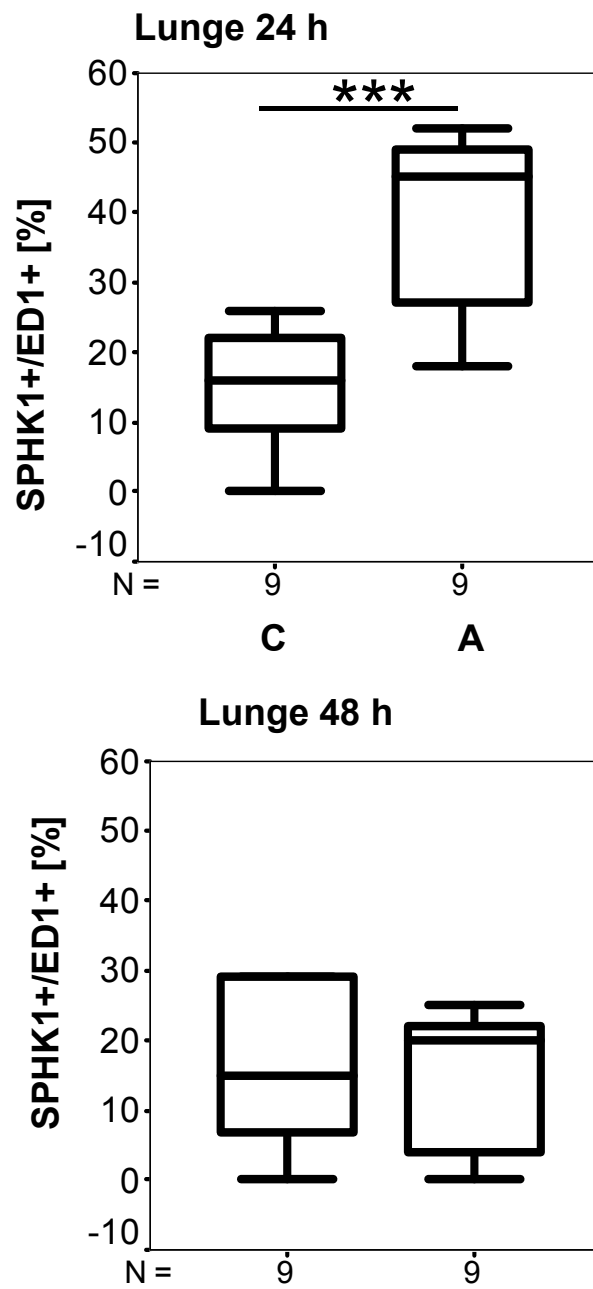


Abb. 13: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die 25- und 75- Perzentile des Anteiles SPHK1a-immunreaktiver Zellen an der Gesamtzahl der ED1-positiven Zellen im Lungenparenchym. Vergleich von Asthma (A)- und Kontrollgruppe (C). N = Anzahl ausgezählter Gesichtsfelder

				Median +/- SD % SPHK1a+
gp91phox	Gewebe	24 h	C	20,0 +/- 11,78
			A	36,5 +/- 8,99
		48 h	C	12,5 +/- 5,13
			A	16,0 +/- 12,72
	BAL	24 h	C	26,5 +/- 18,91
			A	28,0 +/- 39,49
		48 h	C	8,0 +/- 7,85
			A	22,4321 +/- 16,00
ED1	Gewebe	24 h	C	16,0 +/- 8,5
			A	45,0 +/- 13,22
		48 h	C	15,0 +/- 20,37
			A	20,0 +/- 30,85
	BAL	24 h	C	20,5 +/- 22,056
			A	56,75 +/- 26,38
		48 h	C	7,0 +/- 11,28
			A	36,0 +/- 10,32

Tab. 3: Medianwerte und Standardabweichung (SD) des prozentualen Anteiles SPHK1a- und gp91phox- bzw. ED1-immunreaktiver Zellen an der Gesamtzahl gp91phox- bzw. ED1-positiver mononukleärer Zellen in Lungengewebe und BAL bei Asthma (A)- und Kontrollgruppe (C) 24 und 48 Stunden nach Allergenprovokation.

gespülte Lungen			gp91phox				ED1			
			24 h		48 h		24 h		48 h	
			C	A	C	A	C	A	C	A
Gewebe	24 h	C	0,019 (*)	0,004 (***)			0,001 (***)	1		
		A			0,006 (***)				0,019 (*)	
	48 h	C			0,73				0,931	
		A								
BAL	24 h	C	0,541	0,002 (***)			0,001 (***)	0,002 (***)		
		A			0,222				0,023 (*)	
	48 h	C		0,031 (*)	0,001 (***)				0	
		A								

Tab. 4: Signifikanzen (p-Werte) der Unterschiede bezüglich des prozentualen Anteiles SPHK1a- und gp91phox- bzw. ED1-immunreaktiver Zellen an der Gesamtzahl gp91phox- bzw. ED1-positiver mononukleärer Zellen zwischen den miteinander verglichenen Gruppen (A=Asthmagruppe; C=Kontrollgruppe) 24 und 48 Stunden nach Allergenprovokation in gespültem Lungengewebe und BAL. Die Höhe des p-Wertes zweier miteinander verglichener Gruppen bezeichnet die Signifikanz des Unterschiedes zwischen diesen, wobei  $p \leq 0,05$  = signifikant (\*);  $p \leq 0,01$  = hoch signifikant (\*\*);  $p \leq 0,005$  = höchst signifikant (\*\*\*)

Gewebe, ungespült			Median +/- SD %SPHK1a+
gp91phox	24 h	C	8,0 +/- 10,11
		A	49,0 +/- 13,37
	48 h	C	8,321 +/- 11,33
		A	6,667 +/- 6,89

Tab. 5: Medianwerte und Standardabweichung des prozentualen Anteiles SPHK1a- und gp91phox-immunreaktiver Zellen an der Gesamtzahl gp91phox-immunreaktiver mononukleärer Zellen in ungespültem Lungengewebe bei Asthma (A)- und Kontrollgruppe (C) 24 und 48 Stunden nach Allergenprovokation.

Gewebe, ungespült			gp91phox			
			24 h		48 h	
			C	A	C	A
Gewebe	24 h	C		0 (***)	0,546	
		A				0 (***)
	48 h	C				1
		A				

Tab. 6: Signifikanzen (p-Werte) der Unterschiede bezüglich des prozentualen Anteiles SPHK1a- und gp91phox- bzw. ED1-immunreaktiver Zellen an der Gesamtzahl gp91phox- bzw. ED1-mononukleärer Zellen zwischen den miteinander verglichenen Gruppen (A = Asthmagruppe; C = Kontrollgruppe) 24 und 48 Stunden nach Allergenprovokation in ungespültem Lungengewebe.

## RT-PCR

Aus revers transkribierter cDNA aus dem Lungengewebe aller Tiere konnten mit Primern gegen SPHK1 und SPHK2 Produkte mit den berechneten Größen von 107 bzw. 121 Basenpaaren nachgewiesen werden. In zur Kontrolle hergestellten Ansätzen ohne Zugabe von Reverser Transkriptase bzw. ohne Template wurden keine Produkte amplifiziert.

## **Quantitative RT-PCR**

Anhand der in der quantitativen RT-PCR ermittelten  $\Delta$ CT- Werte wurden die relativen Mengen an exprimierter mRNA von SPHK1 und  $-2$  miteinander verglichen. Zur besseren Darstellung wurden die  $50-\Delta$ CT- Werte gebildet, da ein höherer  $\Delta$ CT- Wert eine niedrigere mRNA-Expression bezeichnet (s. Abb. 14). Dadurch konnte anhand eines höheren Zahlenwertes direkt auf eine höhere mRNA-Expression des entsprechenden Enzymes geschlossen werden.

### ***SPHK1***

#### **Vergleich von Asthma- und Kontrollgruppe**

24 Stunden nach Allergenprovokation lag in der Gruppe der Asthmatiere im Vergleich zur Kontrollgruppe eine erhöhte SPHK1-mRNA-Expression vor; nach 48 Stunden waren die Unterschiede geringer (s. Abb. 14).

#### **Vergleich der 24 und 48 Stunden nach Allergenprovokation untersuchten Gewebe**

Sowohl in der Gruppe der Asthma- als auch der Kontrolltiere kam es zwischen 24 und 48 Stunden nach Allergenprovokation zu einer Steigerung der SPHK1-mRNA-Expression (s. Abb. 14).

### ***SPHK2***

Die Expression von SPHK2-mRNA lag in beiden Gruppen sowohl 24 als auch 48 Stunden nach Allergenprovokation höher als die mRNA-Expression von SPHK1 (s. Abb. 14).

#### **Vergleich von Asthma- und Kontrollgruppe**

Die Expression von SPHK2-mRNA war 24 Stunden nach Allergenprovokation bei den Tieren der Asthmagruppe gegenüber den Kontrolltieren leicht, aber signifikant erniedrigt; 48 Stunden nach Allergenprovokation lagen keine signifikanten Unterschiede mehr vor (s. Abb. 14).

## **Vergleich der 24 und 48 Stunden nach Allergenprovokation untersuchten Gewebe**

In beiden Gruppen lag die relative Expression von SPHK2 sowohl 24 als auch 48 Stunden nach Allergenprovokation auf dem gleichen Niveau (s. Abb.14).

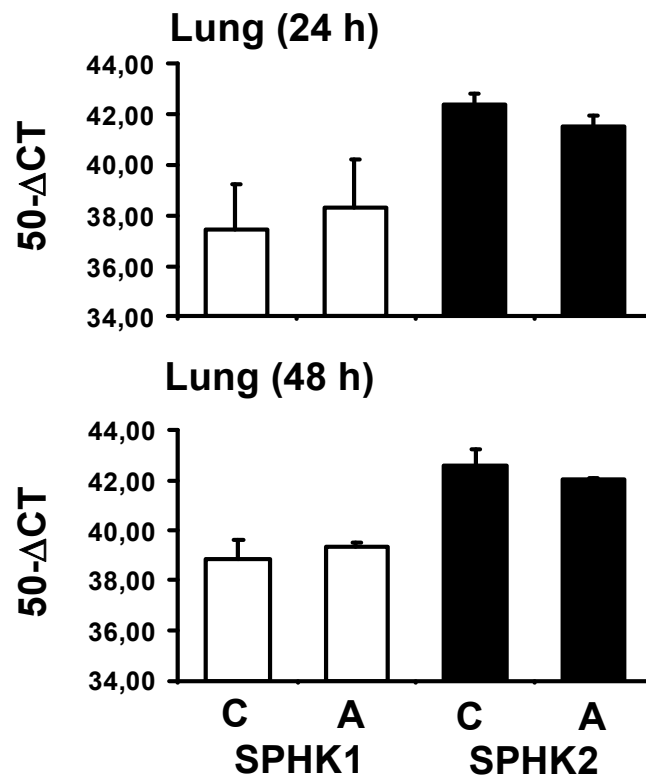


Abb. 14: Vergleich der unterschiedlichen  $\Delta$ CT-Werte der SPHK1- und -2-Expression der Asthma- (A) und Kontrollgruppe (C), bezogen auf das house keeping gene  $\beta$ -Mikroglobulin. Der  $\Delta$ CT-Wert bezeichnet die Zyklenzahl, die zwischen der Amplifikation des house keeping gene und des gesuchten Gens liegt. Höhere  $\Delta$ CT-Werte weisen auf eine geringere Expression des gesuchten Gens hin. Die hier gewählte Einheit 50- $\Delta$ CT wurde zur Verdeutlichung gewählt; ein höherer Wert zeigt hier eine höhere Expressionsrate an. Da bei einigen Probanden das house keeping gene nicht konstant exprimiert wurde, konnten bei diesen keine  $\Delta$ CT-Werte ermittelt werden. Diese Tiere wurden bei der Berechnung der durchschnittlichen  $\Delta$ CT-Werte nicht berücksichtigt.

## ***Vorkommen von SPHK1a in Bronchoalveolärer Lavage***

### **Immunhistochemie**

Zur immunhistochemischen Untersuchung der BAL-Zellen wurde die BAL von je sechs asthmatischen und gesunden Tiere 24 Stunden sowie von jeweils drei Tieren beider Gruppen 48 Stunden nach Allergenprovokation einer doppelimmunhistochemischen Untersuchung mit SPHK1a- sowie ED1- Antikörpern unterzogen. Zur Untersuchung mit SPHK1a- und gp91phox-Antikörpern wurden je drei Tiere pro Gruppe verwendet. Alle SPHK1a-immunreaktiven Zellen zeigten eine Kolo-kalisation mit dem gp91phox-Antigen (s. Abb. 16). Bei den Tieren der Kontrollgruppe war eine deutlich schwächere SPHK1a-Immunreaktivität zu beobachten (s. Abb. 15). Bezüglich der Kolo-kalisation von SPHK1a mit dem CD68-Antigen traten sowohl in der Gruppe der Asthmatiere als auch in der Gruppe der Kontrolltiere Unterschiede auf: Bei den meisten der Tiere beider Gruppen lag in 100% der SPHK1a-immunreaktiven Zellen eine Kolo-kalisation mit dem CD68-Antigen vor (s. Abb. 17), während bei vereinzelt Tieren unabhängig von ihrer Zugehörigkeit zur Asthma- oder Kontrollgruppe keine Kolo-kalisation der beiden Antigene beobachtet wurde (s. Abb. 18).

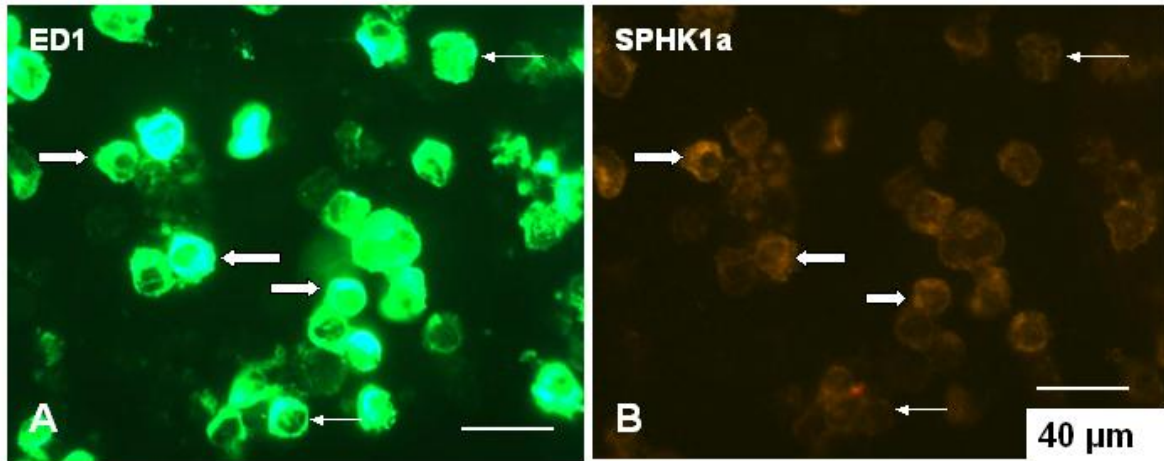


Abb. 15: Deutlich schwächere SPHK1a-Immunreaktivität in Zellen der BAL eines Kontrolltieres 24 Stunden nach Allergenprovokation. In allen SPHK1a-immunreaktiven Zellen (Bild B) sind SPHK1a und ED1 kolokalisiert (breite Pfeile). Zusätzlich sind ED1-positive, SPHK1a-negative mononukleäre Zellen sichtbar (schmale Pfeile). Maßstab = 40 µm.



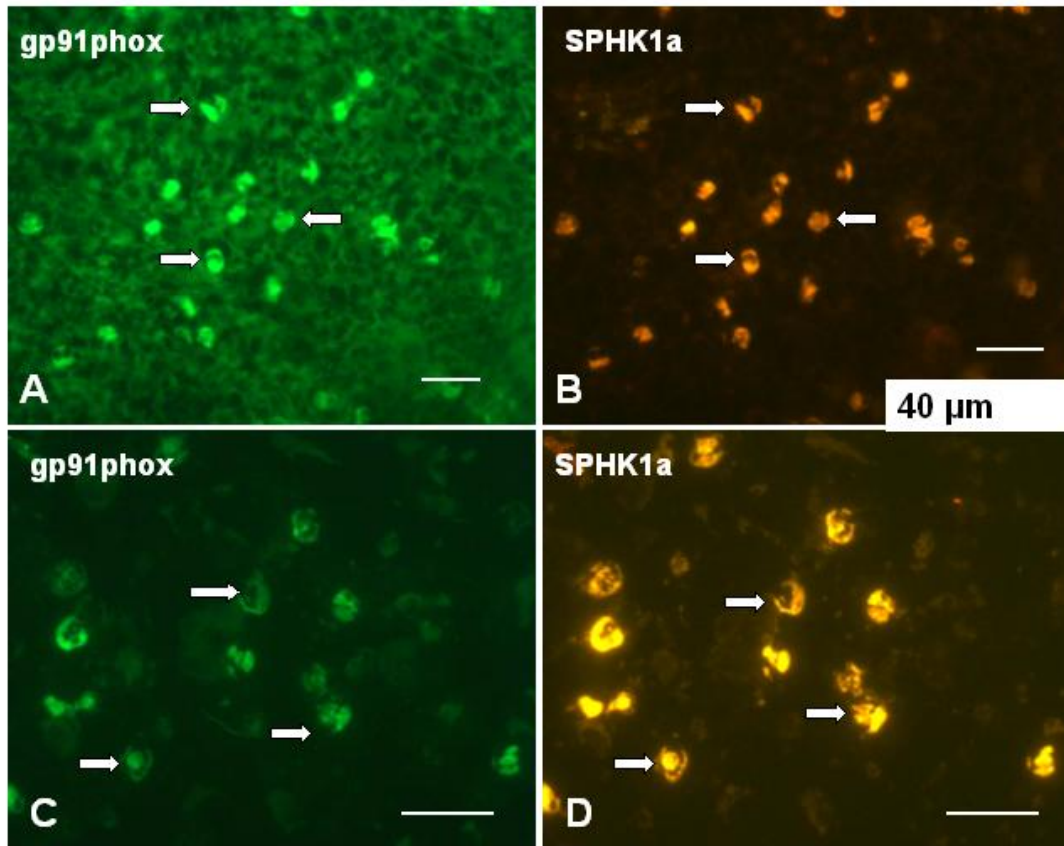


Abb. 16: Koloalisation von SPHK1a und gp91phox in Zellen der BAL (Pfeile), aufgenommen mit 20- (Bild A, B) und 40-facher Vergrößerung (Bild C, D) bei einem Tier der Asthmagruppe. Maßstab = 40  $\mu\text{m}$

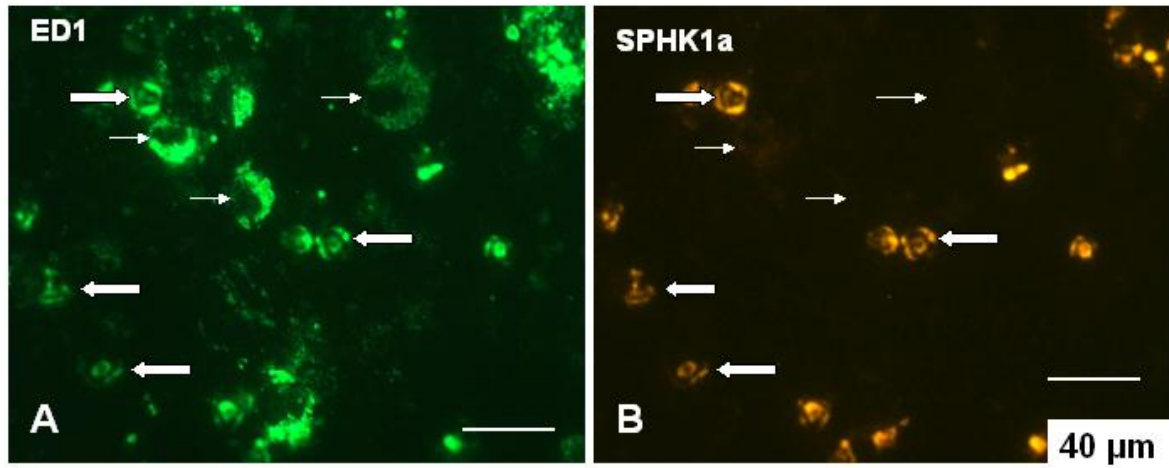


Abb. 17: Kolokalisation von SPHK1a (Bild B) und ED1 (Bild A) in mononukleären Zellen der BAL eines Asthmaticus 24 Stunden nach Allergenprovokation. Alle SPHK1a-immunreaktiven Zellen sind ED1-positiv (breite Pfeile). Gleichzeitig sind ED1-positive Zellen sichtbar, die keine SPHK1a-Immunreaktivität zeigen (schmale Pfeile). Maßstab = 40  $\mu\text{m}$ .

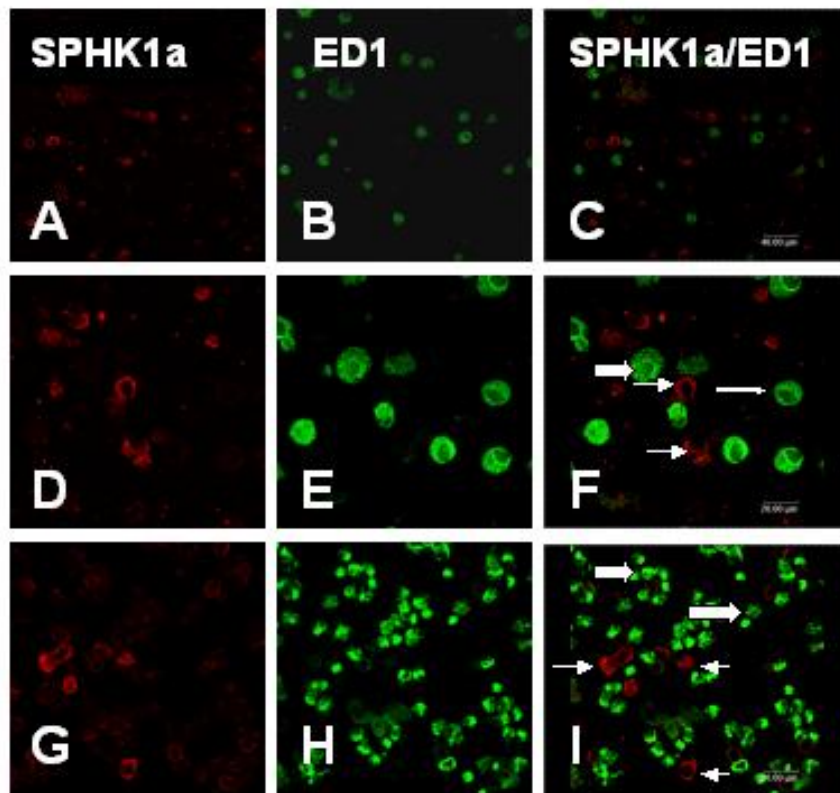


Abb. 18: SPHK1a- (Bild A, D, G) und ED1-Immunreaktivität (Bild B, E, H) in Zellen der BAL in 20- (Bild A-C, G-I) und 40-facher Vergrößerung (Bild D-F). Es sind sowohl SPHK1a-immunreaktive Zellen ohne ED1-Immunreaktivität (Bild F, I; schmale Pfeile), als auch ED1-immunreaktive Zellen mit fehlender SPHK1a-Immunreaktivität (Bild F, I; breite Pfeile) sichtbar. Maßstab = 40  $\mu$ m

## **Vorkommen von SPHK1a in gp91phox-immunreaktiven mononukleären Zellen**

### **Vergleich von Asthma- und Kontrollgruppe**

24 Stunden nach Allergenprovokation lagen keine signifikanten Unterschiede des Anteils SPHK1a-immunreaktiver Zellen an der Gesamtzahl gp91phox-immunreaktiver Zellen vor, während dieser nach 48 Stunden in der Gruppe der asthmatischen Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht war (s. Abb. 19; Tab. 3, 4).

### **Vergleich der 24 und 48 Stunden nach Allergenprovokation untersuchten Gewebe**

48 Stunden nach Allergenprovokation sank der Anteil SPHK1a-immunreaktiver Zellen an der Gesamtzahl in der BAL enthaltener gp91phox-immunreaktiver Zellen in Asthma- und Kontrollgruppe im Vergleich zu dem nach 24 Stunden ermittelten Anteil signifikant ab (s. Tab. 3, 4).

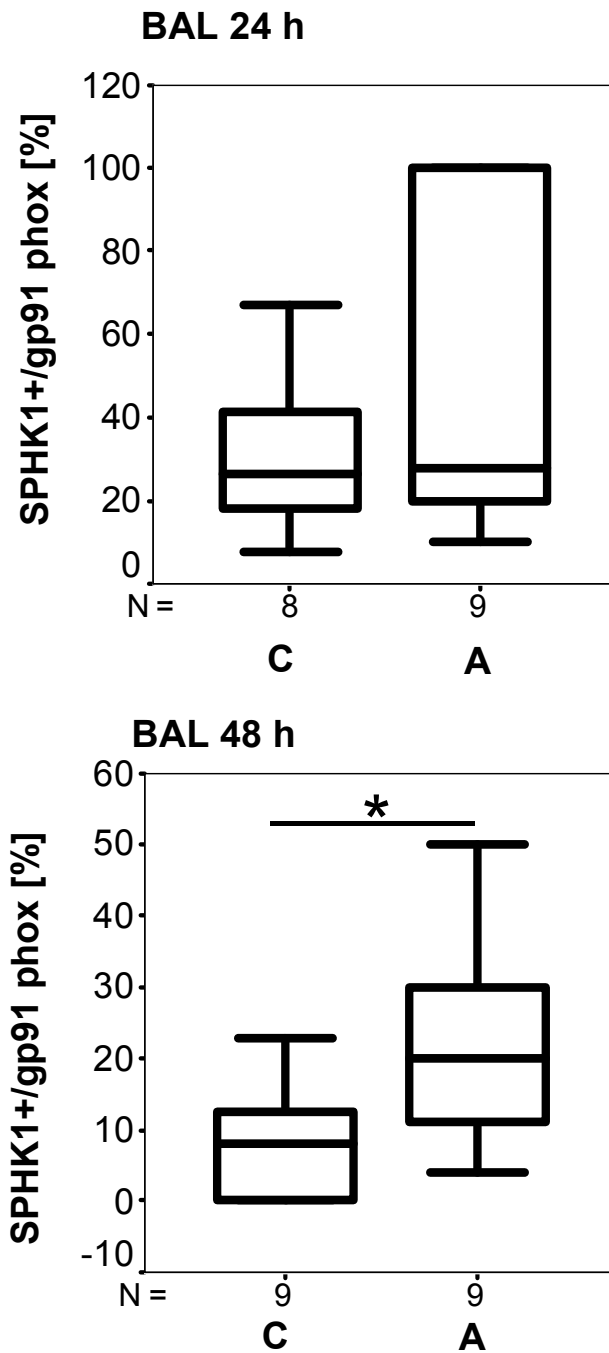


Abb. 19: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die 25- und 75- Perzentile des Anteiles SPHK1a-immunreaktiver Zellen an der Gesamtzahl der gp91phox-positiven Zellen in der BAL. Vergleich von Asthma (A)- und Kontrollgruppe (C). N = Anzahl ausgezählter Gesichtsfelder

## ***Vorkommen von SPHK1a in ED1-immunreaktiven mononukleären Zellen***

### **Vergleich von Asthma- und Kontrollgruppe**

Sowohl 24 als auch 48 Stunden nach Allergenprovokation war der Anteil SPHK1a-immunreaktiver Zellen an der Gesamtzahl in der BAL enthaltener ED1-positiver Zellen in der Gruppe der Asthmatiere im Vergleich mit der Kontrollgruppe signifikant erhöht (s. Abb. 20; Tab. 3, 4).

### **Vergleich der 24 und 48 Stunden nach Allergenprovokation untersuchten Gewebe**

48 Stunden nach Allergenprovokation sank der Anteil SPHK1a-immunreaktiver Zellen an der Gesamtzahl in der BAL enthaltener ED1-positiver Zellen in Asthma- und Kontrollgruppe im Vergleich zu dem nach 24 Stunden ermittelten Anteil signifikant ab (s. Tab. 3, 4).

### **Vergleich zwischen BAL und Lungengewebe**

Sowohl in der Asthma- als auch in der Kontrollgruppe lag 24 und 48 Stunden nach Allergenprovokation der Anteil SPHK1a-immunreaktiver Zellen an der Gesamtzahl ED1-positiver Zellen in der BAL höher als es in den Lungengewebeschnitten der Fall war (s. Tab. 3).

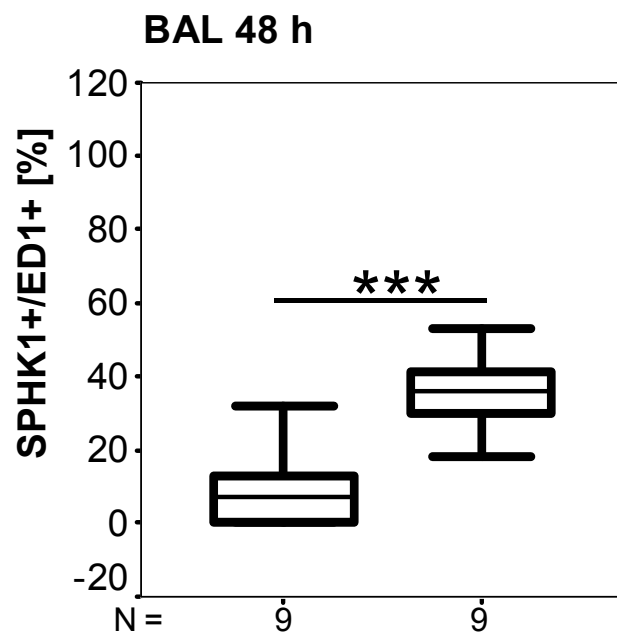
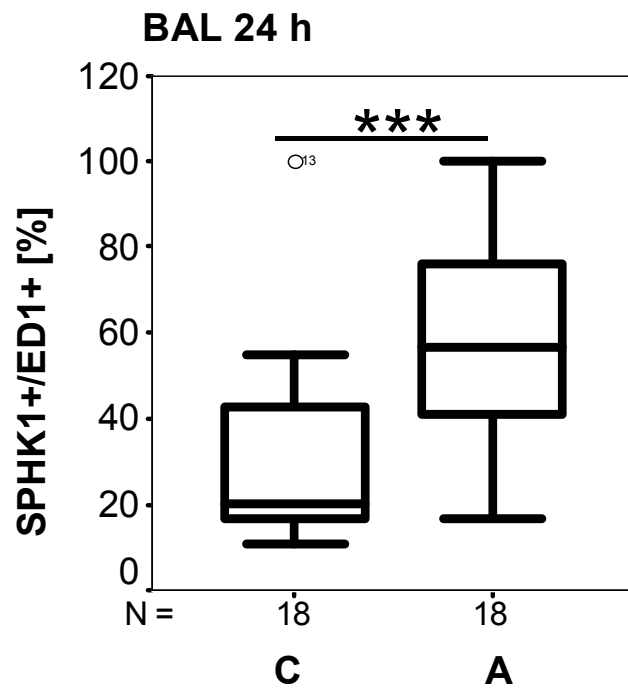


Abb. 20: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die 25- und 75- Perzentile des Anteiles SPHK1a-immunreaktiver Zellen an der Gesamtzahl der ED1-positiven Zellen in der BAL. Vergleich von Asthma (A)- und Kontrollgruppe (C). N = Anzahl ausgezählter Gesichtsfelder

## **Quantitative RT-PCR**

### ***SPHK1***

#### **Vergleich von Asthma- und Kontrollgruppe**

24 Stunden nach Allergenprovokation lag bei den Tieren der Kontrollgruppe eine höhere SPHK1-Expression vor, während 48 Stunden nach Allergenprovokation die Gruppe der Asthmatiere eine höhere SPHK1-Expression zeigte (s. Abb. 21).

#### **Vergleich der nach 24 und 48 Stunden nach Allergenprovokation untersuchten Gewebe**

In beiden Gruppen kam es zwischen 24 und 48 Stunden nach Allergenprovokation zu einem Anstieg der SPHK1-Expression, dabei war dieser in der Gruppe der Asthmatiere stärker als in der Gruppe der Kontrolltiere (s. Abb. 21).

### ***SPHK2***

Insgesamt war in allen Gruppen eine wesentlich höhere Expression von SPHK2 als von SPHK1 zu beobachten (s. Abb. 21).

#### **Vergleich von Asthma- und Kontrollgruppe**

24 Stunden nach Allergenprovokation lag bei den Tieren der Kontrollgruppe eine signifikant höhere SPHK2-Expression vor, während 48 Stunden nach Allergenprovokation keine Unterschiede zwischen Asthma- und Kontrollgruppe vorlagen (s. Abb. 21).

#### **Vergleich der 24 und 48 Stunden nach Allergenprovokation untersuchten Gewebe**

Nur in der Gruppe der Asthmatiere kam es zwischen 24 und 48 Stunden nach Allergenprovokation zu einem Anstieg der SPHK2-Expression, während diese in der Kontrollgruppe gleich blieb (s. Abb. 21).



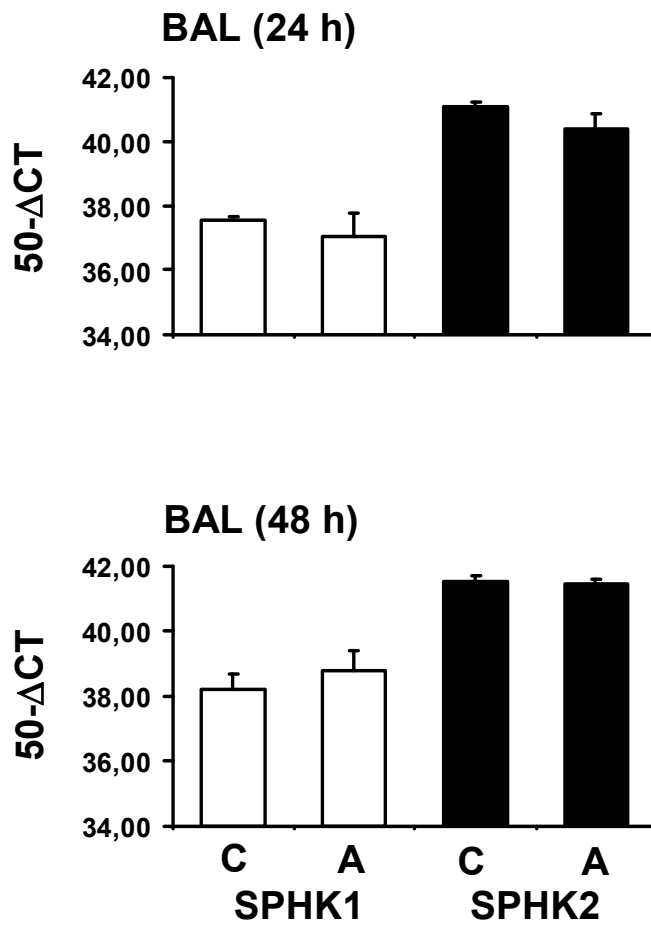


Abb. 21: 50- $\Delta$ CT-Werte der SPHK1- und -2-Expression in BAL 24 und 48 Stunden nach Allergenprovokation.

## **Diskussion**

In der vorliegenden Studie wurde das S1P generierende Enzym SPHK1 und dessen Regulation im Lungengewebe und in der BAL an allergischem Asthma leidender Ratten im Vergleich zu Kontrolltieren nach Allergenprovokation untersucht. Dazu wurden sowohl Immunhistochemie als auch quantitative Reverse-Transcription-PCR (qRT-PCR) eingesetzt. In der qRT-PCR wurde auch die Isoform SPHK2 untersucht. Die immunhistochemischen Untersuchungen dienten zum Nachweis des Enzymes auf der Proteinebene, während die qRT-PCR zum Nachweis der Expression des SPHK1- und SPHK2 –Gens auf mRNA-Ebene durchgeführt wurde. Das immunhistochemische Bild von Lungengewebe und BAL gab die Herkunft und Lokalisation SPHK1a-produzierender Zellen sowie die zelluläre Verteilung des Enzymes wieder; zusätzlich konnten Änderungen in der Anzahl SPHK1a-exprimierender Zellen durch Auszählung der SPHK1a-immunreaktiven Zellen quantitativ erfasst werden. Die mithilfe der Immunhistochemie gewonnenen Erkenntnisse wurden anhand von qRT-PCR auf mRNA-Ebene überprüft. Durch den Vergleich von an allergischem Asthma erkrankten mit gesunden Ratten wurde untersucht, ob die Akutphase allergischen Asthmas mit einer veränderten Expression von SPHK1/-2 einhergeht. Um die Expression von SPHK auf ihre Zeitabhängigkeit im Verlauf von allergischem Asthma zu überprüfen, wurden sowohl 24 als auch 48 Stunden nach Allergenprovokation entnommene Lungengewebe- bzw. BAL-Proben untersucht.

## ***Methodische Aspekte***

### **Einsatz von Brown-Norway Ratten**

Die Verwendung OVA-sensibilisierter BN-Ratten ist ein etabliertes Modell zur Untersuchung des allergischen Asthmas und wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen zu diesem Zweck eingesetzt (Schneider et al. 1997; Schuster et al. 2000; Sirois & Bissonnette 2001; Careau et al. 2002; Singh et al. 2002). Die besondere Eignung der BN-Ratten ist in der charakteristischen Entwicklung einer TH2-betonten Immunantwort mit hierfür typischem Cytokinprofil und der Ausprägung einer allergischen Früh- wie auch Spätreaktion, wie sie beim allergischen Asthma des Menschen vorkommen, begründet (Renzi et al. 1993; Sirois & Bissonnette 2001; Hylkema et al. 2002; Singh et al. 2002). Bisherige Untersuchungen, welche sich mit dem Vorkommen von SPHK und S1P bei allergisch bedingtem Asthma beschäftigten, betrafen die Effekte von S1P auf unterschiedliche pulmonale Zelltypen (Ammit et al. 2001; Cummings et al. 2002; Ryan et al. 2003). Hierzu wurden von Cummings et al.

(2002) humane Bronchialepithelzellen und von Ryan et al. (2003) BAL-Proben sensibilisierter SD-Ratten untersucht. Ammit et al. (2001) wiesen erhöhte S1P-Spiegel in humanen, in der Akutphase allergischen Asthmas entnommenen BAL-Proben sowie, wie auch Rosenfeldt et al. (2003) die Wirkung von S1P auf humane glatte Atemwegsmuskelzellen im Zellkulturmodell nach. Melendez et al. (2002) nutzten aus humanem Knochenmark gewonnene Mastzellen zum Nachweis der SPHK-Produktion nach Antigenstimulation. Untersuchungen zur Herkunft von S1P bei allergischem Asthma im Lungengewebe in unterschiedlichen Phasen der allergischen Reaktion wurden bisher nicht durchgeführt. Durch den Einsatz OVA-sensibilisierter BN-Ratten wurde die Entnahme von Lungengewebe während der Akutphase allergischen Asthmas ermöglicht. Die immunhistochemische Untersuchung von Lungenschnitten und BAL-Proben in der Früh- und Spätphase der akuten allergischen Reaktion mit einem Antikörper gegen SPHK1a erlaubte Rückschlüsse auf die Ursprungsorte von S1P in der Lunge. Die Durchführung der quantitativen RT-PCR von Lungengewebe und BAL-Material diente zusätzlich zur Erkennung quantitativer Unterschiede der SPHK-Expression der untersuchten Gruppen. Ein bei der Bewertung der Untersuchungsbefunde zu berücksichtigender Faktor bei der Verwendung von BN-Ratten besteht in der Tendenz dieses Stammes zu hohen Leukozytenzahlen, die auch bei unbehandelten Tieren vorliegt. Des Weiteren berichten Singh et al. (2002) von großen interindividuellen Schwankungen in Bezug auf die Intensität der allergischen Reaktion nach Allergenprovokation. Auch in Gewebeproben von Tieren der Kontrollgruppe beobachteten Singh et al. (2002) und Ohtsuka et al. (1997) bei Verwendung des OVA-BN-Modells zum Teil granulomatös-entzündliche Veränderungen des Lungengewebes mit Ansammlungen von eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen und mehrkernigen Riesenzellen. Diese Eigenschaften des BN-Stammes könnten als Ursache für die zum Teil ermittelten hohen Standardabweichungen vom Medianwert innerhalb der unterschiedlichen Gruppen in Frage kommen.

## **Nachweis von SPHK1a**

S1P kann als Metabolit der ubiquitär vorkommenden Sphingolipide im Rahmen des Sphingolipidstoffwechsels in vielen unterschiedlichen Zellen gebildet werden. In vielen Zellen liegt ein konstant geringes Basalniveau der S1P-Konzentration vor. Notwendig zur Synthese von S1P ist das Enzym SPHK, durch welches die Gleichgewichtsreaktion zwischen den Sphingolipidmetaboliten Ceramid, Sphingosin und S1P zugunsten von S1P verschoben wird (Cuvillier et al. 1996; Maceyka et al. 2002; Spiegel & Milstien 2003b). Die Expression und Aktivierung von SPHK unterliegt einer von vielen unterschiedlichen Reizen abhängigen Regulation (Olivera et al. 1999; Pitson et al. 2000; Hla 2003; Le Stunff et al. 2004b). Die

Untersuchung des Vorkommens der am Sphingolipidstoffwechsel beteiligten Enzyme stellt einen wichtigen Ansatzpunkt zum Verständnis der Rolle der einzelnen Metaboliten dar (Le Stunff et al. 2004b). Verschiedene Arbeitsgruppen entwickelten bereits erfolgreich Verfahren zur direkten Quantifizierung von S1P. Hierzu ist eine Vereinzelnung und Suspendierung der Zellen (Yatomi et al. 1995) bzw. Extrahierung von S1P aus den Zellen (Olivera et al. 1994; Edsall & Spiegel 1999) erforderlich. Ein direkter Nachweis von S1P an Gewebeschnitten ist daher nicht möglich. Bei der Messung der S1P-Spiegel konnten Edsall & Spiegel (1999) einen direkten Anstieg der S1P-Konzentration nach Aktivierung von SPHK nachweisen. Durch Überexpression von SPHK durch NIH 3T3-Fibroblasten und HEK293- Zellen erzielten Olivera et al. (1999), welche mithilfe von SPHK1a die Effekte intrazellulären S1P untersuchten, einen Anstieg der intra-, nicht aber der extrazellulären S1P-Konzentration. Aus dem Nachweis des Enzymes SPHK, wie er in dieser Studie durchgeführt wurde, lässt sich die Möglichkeit einer S1P-Synthese in den SPHK1 enthaltenden Zellen herleiten. SPHK1 wurde erstmals von Olivera et al. (1998) aus Nierengewebe der Ratte isoliert und von Kohama et al. (1998) kloniert; diese Isoform wird im Lungengewebe von Mäusen am stärksten exprimiert (Fukuda et al., 2003). Melendez et al. (2002) untersuchten nach der Klonierung humaner SPHK1 deren Gewebeverteilung, wobei die höchsten Expressionsraten unter anderem in humanem Lungengewebe beobachtet wurden. In der hier vorliegenden Untersuchung wurden mithilfe der PCR beide Isoformen in Lungengewebe und BAL nachgewiesen, wobei SPHK2 verglichen mit der SPHK1-Expression verstärkt exprimiert wurde. Dies steht im Widerspruch zu den bisher veröffentlichten Mengenangaben. Da kein Antikörper gegen SPHK2 erhältlich war, konnten die Ergebnisse der PCR bezüglich der SPHK2 in dieser Untersuchung nicht mithilfe immunhistochemischer Methoden überprüft werden.

## Verwendung von BAL-Material

Die im Verlauf allergischen Asthmas freigesetzten proinflammatorisch wirkenden Cytokine sind als Aktivatoren von SPHK in unterschiedlichen Zellen des Immunsystemes identifiziert worden (Olivera & Spiegel 1993; Choi et al. 1996; Pyne et al. 1996; Nikolova-Karakashian 1997; Melendez et al. 1998; Xia et al. 1998). Die an den pathohistologischen Prozessen in der Lunge beteiligten immunkompetenten Zellen sind nicht nur im Lungeninterstitium verteilt, sondern sind ebenfalls in der Lage, in den Alveolarraum auszuwandern. Viele Untersuchungen weisen zudem darauf hin, dass zwischen im Alveolarraum gelegenen und im Lungeninterstitium lokalisierten Makrophagen funktionelle Unterschiede bestehen, was unter anderem durch die Sekretion unterschiedlicher Mediatoren gekennzeichnet ist. Poulter & Burke (1996) gehen davon aus, dass das durch eine Verschiebung des Verhältnisses von Alveolar- zu interstitiellen Makrophagen bedingte veränderte Cytokinmuster in der Lunge während einer entzündlichen Erkrankung wesentlich zu deren Verlauf beiträgt. Menard und Bissonnette (2000) wiesen einen Anstieg der Produktion proinflammatorischer Mediatoren durch Alveolarmakrophagen im Verlauf allergischen Asthmas nach. Ammit et al. (2001) führten Untersuchungen zur Bestimmung der S1P-Konzentrationen an BAL-Proben von an allergischem Asthma erkrankten Menschen nach segmentaler Allergenprovokation durch und wiesen einen signifikanten Anstieg der S1P-Konzentration im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen nach, welcher 48 Stunden nach Allergenprovokation den Maximalwert erreichte. Die Normalisierung der S1P-Konzentration auf ein Basalniveau fand nach 4-6 Tagen statt. Hinweise auf die Funktionen von S1P im Alveolar- und Bronchialraum geben die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen, welche unter anderem die Stimulation der Interleukin-8-Sekretion durch Bronchialepithelzellen (Cummings et al. 2002) sowie die Veränderung der biophysikalischen Eigenschaften der alveolaren Surfactantflüssigkeit (Ryan et al. 2003) durch S1P nachwiesen. Da es sich hierbei um S1P-Rezeptor- (Cummings et al. 2002) bzw. extrazellulär vermittelte Effekte (Ryan et al. 2003) handelte, muss von einer S1P-Produktion und -freisetzung im Alveolar- bzw. Bronchialraum ausgegangen werden. Die in der vorliegenden Studie durchgeführte Untersuchung von BAL-Proben zusätzlich zur Untersuchung von Lungengewebe erlaubt die Bestimmung der relativen SPHK-mRNA-Produktion im Alveolar- und Bronchialraum sowie die Identifikation und Quantifizierung der daran beteiligten Zellen.

## **Einsatz und Auswertung der Doppelimmunhistochemie**

Sowohl im Lungengewebe als auch im Alveolarraum kommen verschiedene Spezies immunkompetenter Zellen vor, deren Anzahl und Zusammensetzung besonders im Verlauf entzündlicher Prozesse in erheblichem Ausmaß variieren können. Die unterschiedlichen Zellspezies lassen sich aufgrund morphologischer Merkmale nicht sicher differenzieren. Die Differenzierung der hier in den Lungengewebe- und BAL-Proben vorkommenden SPHK1a-immunreaktiven Zellen erforderte daher den Einsatz spezifischer Antikörper. Aus diesem Grund wurde zunächst der Antikörper gegen die in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten vorhandene Untereinheit gp91phox des Enzyms NADPH-Oxidase verwendet (Teufelhofer et al. 2003; van Maanen et al. 2005; Banulius et al. 2005). Da sowohl im Lungengewebe als auch in der BAL in allen SPHK1a-immunreaktiven Zellen eine Kolo-kalisation von SPHK1a und gp91phox vorlag, wurde zur weiteren Differenzierung zusätzlich der Antikörper ED1, welcher an das Makrophagen-spezifische CD68-Antigen bindet (Colic et al. 1990), eingesetzt. Dies ermöglichte eine Differenzierung zwischen Makrophagen und neutrophilen Granulozyten. Durch die Bestimmung des Prozentanteiles NADPH-Oxidase- bzw. ED1-immunreaktiver Zellen an der Anzahl SPHK1a-immunreaktiver Zellen wurde festgestellt, welcher Teil der SPHK1a-immunreaktiven Zellen zur Gruppe neutrophiler Granulozyten bzw. Makrophagen gehört. Da 100% der SPHK1a-immunreaktiven mononukleären Zellen eine Kolo-kalisation mit dem NADPH-Oxidase-Antigen zeigten und somit der Gruppe der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen zugeordnet werden konnten, diente die Bestimmung des Anteils ED1-immunreaktiver Zellen dazu, den Anteil der SPHK1a-immunreaktiven Makrophagen an der Gruppe gp91phox-immunreaktiver Zellen zu bestimmen. Durch Allergenprovokation sensibilisierter BN-Ratten kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Gesamtzahl immunkompetenter Zellen sowohl in der BAL als auch im Gewebe (Renzi et al. 1993; Schuster et al. 2000; Singh et al. 2002). An dieser Erhöhung sind unter anderem sowohl Makrophagen (Schuster et al. 2000; Sirois & Bissonnette 2001) als auch neutrophile Granulozyten (Elwood et al. 1992; Renzi et al. 1993; Yu et al. 1995; Schneider et al. 1997; Schuster et al. 2000) beteiligt. Da in SPHK-exprimierenden Zellen die Expression stets auf einem gewissen Basalniveau liegt (Pitson et al. 2003), kann ein Anstieg der SPHK-Expression in BAL und Gewebe, wie er in dieser Arbeit anhand von quantitativer PCR nachgewiesen wurde, sowohl einerseits durch einen einwanderungsbedingten Anstieg der Gesamtzahl immunkompetenter, SPHK-exprimierender Zellen als auch durch die Erhöhung des Anteiles SPHK-exprimierender Zellen an den vorhandenen immunkompetenten Zellen bedingt sein. Daher wurde in dieser Untersuchung der Anteil der SPHK1a-immunreaktiven mononukleären Zellen an der Gesamtzahl mit SPHK1a kolokalisierter gp91phox- bzw. ED1-immunreaktiver Zellen

ermittelt. Dadurch konnte beurteilt werden, ob eine Erhöhung der SPHK-Expression asthmatischer Tiere unabhängig vom Anstieg der Gesamtzahl infiltrierender immunkompetenter Zellen hervorgerufen wird.

## ***SPHK im Lungengewebe***

### **Intrazelluläre Lokalisation von SPHK1a**

In allen SPHK1a-immunreaktiven Zellen war eine homogene Verteilung von SPHK1a im Bereich des Cytosols zu beobachten. Der Zellkern zeigte keine SPHK1a-Immunreaktivität. Diese Beobachtungen stimmen mit Untersuchungen von Kohama et al. (1998) und Olivera et al. (1999) überein, welche nach Überexpression von SPHK1a in verschiedenen Zellspezies den größten Anteil der SPHK1a-Immunreaktivität ebenfalls im Cytoplasma nachweisen konnten. Die durch Kohama et al. (1998) veröffentlichte Aminosäuresequenz der Isoform SPHK1a deutet ebenfalls auf eine vorwiegend cytosolische Lokalisation von SPHK1a hin.

### **Glatte Muskelzellen**

In glatten Muskelzellen der Atemwege und Blutgefäße nimmt SPHK durch Aktivierung multipler Signalwege eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Kontraktions-, Differenzierungs- und Wachstumsprozessen ein (Rosenfeldt et al. 2003; Lockmann et al. 2004). Rosenfeldt et al. (2003) zeigten an isolierten humanen glatten Atemwegsmuskelzellen nach exogener Zugabe von S1P in nanomolaren Konzentrationen die Induktion von Kontraktionsvorgängen durch Aktivierung und Neubildung kontraktile Elemente sowie der Mobilisierung intra- und extrazellulärer Calciumreserven. Die Konzentrationssteigerung exogen applizierten S1P löste zudem in diesen Zellen eine Steigerung der Proliferationsrate sowie die Sekretion des proinflammatorischen Cytokins IL-6 aus. Mit Ausnahme des S1PR5 werden alle S1P-Rezeptoren von glatten Muskelzellen exprimiert. Verschiedenen Autoren zufolge findet eine Sekretion intrazellulär generierten S1P in den Extrazellulärraum statt (Hobson et al. 2001; Rosenfeldt et al. 2001). Dieser Vorgang ist nicht jeder Zellspezies möglich (Olivera et al. 1999). Es ist daher fraglich, welche Rolle die intrazelluläre Produktion von S1P in glatten Muskelzellen bei der Vermittlung der rezeptorabhängigen Effekte in der glatten Muskulatur auf auto- und parakrinem Weg spielt, wofür ein Transport von S1P in den Extrazellulärraum notwendig ist. In glatten Atemwegs- und Gefäßmuskelzellen synthetisiertes S1P spielt vermutlich in erster Linie eine Rolle bei der Rezeptor-unabhängigen Mobilisierung intrazellulärer Calciumreserven, wie sie durch Ghosh et al.

(1994) beschrieben wurde. Die daraus resultierende Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration trägt zur Vermittlung muskulärer Kontraktionsvorgänge bei. In dieser Untersuchung wurde die Expression von SPHK1a sowohl bei asthmatischen als auch bei gesunden Tieren in glatten Gefäß- und Atemwegsmuskelzellen nachgewiesen. Unterschiede zwischen Asthma- und Kontrollgruppe sowie zwischen den zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersuchten Tieren ließen sich nicht feststellen. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass durch SPHK-Aktivität intrazellulär synthetisiertes S1P in glatten Gefäß- und Atemwegsmuskelzellen sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch im Verlauf akuten allergischen Asthmas zur Vermittlung intrazellulär und möglicherweise auch extrazellulär vermittelter Effekte beiträgt. Da die in der Lunge vorhandenen glatten Gefäß- und Bronchialmuskelzellen ebenfalls einen Teil der gesamten in der Lunge vorkommenden Zellen repräsentieren, ist die mithilfe der qRT-PCR nachgewiesene SPHK-Expression zu einem Teil auf die SPHK-Expression der glatten Muskelzellen zurückzuführen.

## **Mononukleäre Zellen**

Die Beteiligung von Sphingolipidmetaboliten an der Vermittlung immunologischer Prozesse konnte in den letzten 15 Jahren durch viele Untersuchungen nachgewiesen werden. Dabei spielen immunkompetente Zellen sowohl als Produzenten als auch als Effektorzellen von S1P eine Rolle (Goetzl & Rosen 2004; Wu et al. 2004). In dieser Untersuchung zeigten bei allen untersuchten Tieren 100% der nicht-glattmuskulären SPHK1a-immunreaktiven Zellen gp91phox-Immunreaktivität, wie sie bei neutrophilen Granulozyten und Makrophagen vorkommt, bei ca. 80% lag eine Kolo-kalisation mit dem makrophagenspezifischen CD68-Antigen vor. Es handelt sich daher bei 80% der SPHK1a-immunreaktiven mononukleären Zellen im Lungengewebe um Makrophagen, während die übrigen SPHK1a-exprimierenden Zellen aufgrund ihres Gehaltes an gp91phox bei gleichzeitigem Fehlen des CD68-Antigens als neutrophile Granulozyten identifiziert werden konnten. Beide Zellspezies spielen in der Pathogenese des allergischen Asthmas eine Rolle. Lamblin et al. (1998), Jatakanon et al. (1999) sowie Sampson (2000) berichten vom Auftreten neutrophiler Granulozyten bei Patienten mit allergischem Asthma in Abwesenheit zusätzlicher bakterieller Infektionen. Speziell bei Verwendung OVA-sensibilisierter BN-Ratten wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen eine initiale Neutrophilie mit einem Höhepunkt 24 Stunden nach Allergenprovokation beobachtet, welcher 48 Stunden nach Allergenprovokation wieder abfiel (Elwood et al. 1992; Renzi et al. 1993; Yu et al. 1995; Schuster et al. 2000; Careau et al. 2002; Hylkema et al. 2002). Diese Beobachtungen stimmen mit dem hier immunhistochemisch nachgewiesenen Abfall des Anteiles SPHK1a- und gp91phox-immunreaktiver Zellen überein. Obwohl die Rolle neutrophiler Granulozyten in der



Pathogenese allergischen Asthmas noch nicht geklärt ist, ist bekannt, dass diese Zellen durch Synthese unterschiedlicher Mediatoren, darunter auch Lipidmediatoren, wie durch die vorliegende Untersuchung bestätigt wird, zur Atemwegobstruktion, Gewebeschädigung und zum Remodeling der Atemwege beitragen. Sampson (2000) betrachtete die Infiltration des Lungengewebes mit neutrophilen Granulozyten als Resultat einer verlängerten Lebensdauer dieser Zellen infolge verminderter Apoptoseprozesse. Die hier beobachtete SPHK-Expression durch neutrophile Granulozyten könnte aufgrund der intrazellulär vermittelten anti-apoptischen und proliferationsfördernden Wirkung von S1P, wie sie von Olivera et al. (1999) nach Überexpression von SPHK in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen wurde, zur Verlängerung der Überlebenszeit dieser Zellen im Lungengewebe beitragen. Die Produktion von S1P durch neutrophile Granulozyten sowie durch Makrophagen wurde ebenfalls bereits in verschiedenen Untersuchungen beobachtet: Ibrahim et al. (2004) wiesen anhand von *in vitro*-Experimenten die rapide Stimulation der SPHK-Aktivität in neutrophilen Granulozyten durch Bindung des im Verlauf verschiedener immunvermittelter entzündlicher Erkrankungen gebildeten Anaphylatoxins C5a nach. Die dadurch erhöhte Produktion von S1P führte zu einer, für die Aktivierung neutrophiler Granulozyten notwendigen Mobilisierung intrazellulärer  $Ca^{2+}$ -Reserven und damit zur Degranulation, der Auslösung des „oxidative burst“ durch Aktivierung der NADPH-Oxidase (Niwa et al. 2000) und erhöhter chemotaktischer Aktivität. Den gleichen Signalweg aktivierten aus venösem Blut frisch isolierte humane neutrophile Granulozyten nach Bindung der als Primingfaktoren für neutrophile Granulozyten bekannten Entzündungsmediatoren platelet activating factor, TNF- $\alpha$  und einem Substanz P-Analog (MacKinnon et al. 2002). Chuang et al. (2000) berichten von der Beteiligung von SPHK bei der  $Fc\gamma$ -Rezeptor-vermittelten  $Ca^{2+}$ -Freisetzung in neutrophilen Granulozyten. Über den ebenfalls durch Makrophagen exprimierten C5a-Rezeptor wird auch bei dieser Zellspezies die Aktivierung von SPHK und deren Translokation zur Zellmembran vermittelt, was in Untersuchungen von Melendez & Ibrahim (2004) bei von humanen Monozyten stammenden Makrophagen *in vitro* die gleichen Effekte auslöste wie bei neutrophilen Granulozyten. Aas et al. (2001) konnten an neutrophilen Granulozyten ebenfalls die S1P-abhängige Mobilisierung intrazellulärer  $Ca^{2+}$ -Reserven nachweisen. Hier führte das Plasmaprotein Fibronectin zur Interferon- $\gamma$ -abhängigen Aktivierung von SPHK. Da es sich bei Fibronectin um ein im Blutplasma vorkommendes Protein handelt und die Aktivierung neutrophiler Granulozyten die Steigerung der Migrationsaktivität einschließt, könnte die Fibronectin-abhängige Aktivierung von SPHK in neutrophilen Granulozyten zu deren Migration aus dem pulmonalen Gefäßbett, welches ein Reservoir großer Zahlen neutrophiler Granulozyten darstellt (Sibille & Reynolds 1990), in das umliegende Gewebe beitragen. Dies ist eine mögliche Erklärung für das Vorliegen von perivaskulären Ansammlungen SPHK1a-immunreaktiver mononukleärer Zellen, welche sich in der hier vorgestellten Arbeit sowohl bei Tieren der Asthma- als auch

der Kontrollgruppe fanden. Auch andere Arbeitsgruppen beobachteten sowohl bei asthmatischen BN-Ratten (Schneider et al. 1997) als auch bei Menschen (Careau et al. 2002) die Akkumulation von mononukleären Zellen in Form perivaskulärer und peribronchialer Aggregate im Lungengewebe. Makrophagen repräsentieren die Mehrheit phagozytierender Zellen im unteren Respirationstrakt (Sibille & Reynolds 1990; Sirois & Bissonnette 2001). In der vorliegenden Untersuchung konnten 80% der SPHK1a-immunreaktiven Zellen durch den Nachweis des CD68-Antigens als Makrophagen identifiziert werden. Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, dass diese eine wichtige Rolle bei allergisch bedingtem Asthma spielen. In Untersuchungen von Poston et al. (1992), Viksman et al. (1997) und Laskin et al. (2001) konnte nachgewiesen werden, dass sich die im Verlauf allergischen Asthmas als Effektorzellen dienenden Makrophagen in einem aktivierten Zustand befinden. Im Zustand der Aktivierung kommt es zu einer verstärkten Genexpression (Vignola et al. 1994; Laskin et al. 2001), was aktivierte Makrophagen zur Synthese und Abgabe verschiedener Entzündungsmediatoren befähigt (Yu et al. 1995; Careau et al. 2002). Auch die Synthese und Sekretion von S1P durch aktivierte Makrophagen gilt als gesichert (Baumruker & Prieschl 2002). Gomez-Munoz et al. (2003) wiesen die Verschiebung des Sphingolipidgleichgewichtes mit einer erhöhten S1P-Konzentration bei gleichzeitiger Verminderung der Ceramidkonzentration in humanen Makrophagen nach, was in diesen aufgrund der Verminderung der Ceramid-induzierten Apoptose zur intrazellulär vermittelten Verlängerung der Lebensdauer der Zellen führte. Verschiedene Autoren gehen von der Existenz unterschiedlicher Makrophagensubpopulationen aus, welche sich in Funktion und Cytokinmuster unterscheiden (Sibille & Reynolds 1990; Poulter & Burke 1996; Johansson et al. 1997; Zeibecoglou et al. 2000; Laskin et al. 2001). Laskin et al. (2001) unterscheiden innerhalb dieser Subpopulationen reifere Makrophagen geringerer Dichte sowie weniger reife Makrophagen höherer Dichte. Letztere zeigen signifikant höhere zellspezifische Leistungen, unter anderem auch in Bezug auf Synthese und Sekretion unterschiedlicher Mediatoren. Dies erklärt möglicherweise die Beobachtung, dass in dieser Untersuchung nur ein Teil der im Gewebe vorkommenden Makrophagen SPHK1a-Immunreaktivität zeigten. Es ist denkbar, dass es sich hierbei um die Makrophagensubpopulation höherer Dichte handelt. Der in dieser Arbeit nach Allergenprovokation ermittelte Anstieg des Anteils SPHK1a-immunreaktiver Makrophagen könnte Ausdruck eines erhöhten Anteiles der sekretorisch aktiveren Makrophagen höherer Dichte sein. Johansson et al. (1997) sehen eine der Hauptfunktionen interstitieller Makrophagen in der Regulation des Makrophagenpools der Lunge, weshalb sie im Vergleich mit Alveolarmakrophagen eine höhere proliferative Kapazität aufweisen. S1P könnte hier über die intrazellulär vermittelte Steigerung der Mitoserate zu dieser Funktion beitragen. Im Gegensatz zu verschiedenen Untersuchungen an Mastzellen, in welchen eine erhöhte S1P-Produktion durch Kreuzvernetzung von  $Fc\epsilon$ -Rezeptoren nach Antigenbindung

nachgewiesen werden konnte (Choi et al. 1996; Beaven & Baumgartner 1996; Prieschl et al. 1999; Melendez & Khaw 2002; Jolly et al. 2004; Urtz et al. 2004), waren in dieser Untersuchung keine SPHK1a-immunreaktiven Mastzellen festzustellen. Verschiedene Gründe sind hierfür denkbar:

1. Die Aktivierung von gewebeständigen Mastzellen durch Antigenbindung steht als initiales Ereignis jeder allergischen Reaktion vom Typ1 unmittelbar am Anfang der ablaufenden pathophysiologischen Vorgänge und kennzeichnet die allergische Frühreaktion, welche nach ca. 1 Stunde abklingt (Lamblin et al. 1998; Bousquet et al. 2000; Busse et al. 2001; Ferreira 2004; Fireman 2003). Durch Sekretion unterschiedlicher Mediatoren, zu denen auch S1P zählt, bewirken Mastzellen nach 6-9 Stunden den Influx verschiedener weiterer Leukozytenspezies, welche die allergische Spätreaktion charakterisieren. Die hier vorgenommene Gewebeentnahme 24 und 48 Stunden nach Allergenprovokation fand also zum Zeitpunkt der allergischen Spätreaktion statt, an welcher Mastzellen nicht mehr beteiligt sind.
2. Bei allen durchgeführten Untersuchungen zur S1P-Synthese durch Mastzellen handelte es sich um in-vitro-Experimente, während in der hier vorgestellten Arbeit erstmals die SPHK-Expression nach Allergenprovokation anhand eines in-vivo-Modells untersucht wurde. Unterschiede zwischen in-vivo- und in-vitro-Studien sind nicht auszuschließen.
3. Bei den in den genannten Untersuchungen verwendeten Zellen handelte es sich um aus humanem (Melendez & Khaw 2002) bzw. Mäuseknochenmark gewonnene Mastzellen sowie um die Rattentumorzelllinie RBL-2H3 (Prieschl et al. 1999, Jolly et al. 2001, Urtz et al. 2004). Speziespezifische Unterschiede bzw. Unterschiede zwischen der Tumorzelllinie und den in vivo vorkommenden ortsständigen Mastzellen könnten ebenfalls Unterschiede in der Enzymexpression erklären.

## **Vergleich von Asthma- und Kontrollgruppe**

Sowohl auf der Ebene der Proteinexpression als auch auf der mRNA-Ebene zeigten die Tiere der Asthmagruppe im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe 24 Stunden nach Allergenprovokation eine signifikant höhere SPHK-Expression. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass S1P an der Vermittlung der pathophysiologischen Vorgänge allergischen Asthmas beteiligt ist. Diese Befunde ergänzen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, welche bereits Hinweise auf den Zusammenhang zwischen erhöhten S1P-Konzentrationen im Verlauf allergischer Erkrankungen im Allgemeinen (Choi et al. 1996; Roviezzo et al. 2004) bzw. allergischen Asthmas im Besonderen (Ammit et al. 2001) erbrachten. Die Erhöhung der in der qRT-PCR gemessenen SPHK-Expression kam in der

vorliegenden Untersuchung, wie die immunhistochemischen Befunde zeigten, durch die Erhöhung des Anteiles SPHK1a-exprimierender immunkompetenter Zellen zustande. Dies ist vermutlich auf die verstärkte Stimulation der SPHK-Expression durch die im Verlauf der allergischen Reaktion gebildeten verschiedenen Mediatoren sowie S1P selbst, welches in Untersuchungen von Meyer zu Heringdorf et al. (2001) über S1P-Rezeptoren seine eigene Synthese verstärkte, zurückzuführen. Untersuchungen von Menard & Bissonnette (2000) an Makrophagen zeigten, dass diese auf eine Allergenprovokation mit einer verstärkten Synthese proinflammatorischer Mediatoren reagieren, was hier auch für S1P nachgewiesen werden konnte. Die hier auch bei Abwesenheit einer allergischen Reaktion bei den Kontrolltieren nachgewiesene Expression von SPHK kann nicht durch eine Stimulation der SPHK-Expression durch allergische Prozesse erklärt werden. Folgende Ursachen sind hierfür denkbar:

1. In SPHK-exprimierenden Zellen bewegt sich im unstimulierten Zustand die S1P-Produktion stets auf einem geringen Basalniveau (Pitson et al. 2003). Das Vorkommen von S1P in diesen physiologischen Konzentrationen wird von Hla (2004) nicht mit einer proinflammatorischen Wirkung in Verbindung gebracht. Da S1P auch neben seiner Wirkung auf inflammatorische Reaktionen an der Vermittlung vieler weiterer zellulärer Prozesse beteiligt ist, ist die Synthese von S1P durch Tiere der Kontrollgruppe auf niedrigerem Niveau als in der Asthmagruppe vermutlich Ausdruck physiologischer Vorgänge. Die hier vorkommenden SPHK1a-immunreaktiven Zellen fanden sich zum größten Teil im perivaskulären Bereich. Da die S1P-vermittelte Expression von Adhäsionsmolekülen am Gefäßendothel mit der Folge erleichterter Migrationsprozesse bereits nachgewiesen wurde (Xia et al. 1998; Lee et al. 2004), liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den aus den Gefäßen auch im physiologischen Zustand ständig ins Lungengewebe auswandernden Leukozyten bevorzugt um solche handelt, welche S1P sezernieren können, was das gehäufte Vorkommen SPHK1a-immunreaktiver Zellen im perivaskulären Bereich erklärt.
2. Parallel zur Allergenprovokation der Asthmatiere wurden die Tiere der Kontrollgruppe in Allgemeinanästhesie mit dem Narkosegas Isofluran der Inhalation von 0,9% NaCl-Lösung unterzogen. Auch diese Prozedur kann zur Aktivierung unspezifischer inflammatorischer Prozesse beitragen, in deren Verlauf die Produktion von S1P ebenfalls mit einbezogen ist. Zudem rief die Vollnarkose bei einem Teil der Tiere beider Gruppen klinisch auffällige respiratorische Beschwerden hervor, welche sich vermutlich auch auf histologischer Ebene manifestierten.

3. Durch Einsatz des BN-Modells durch andere Arbeitsgruppen ist bekannt, dass auch unbehandelte BN-Ratten zur Ausbildung idiopathischer, granulomatös-entzündlicher Herde aus verschiedenen Leukozytenspezies im Lungengewebe neigen (Ohtsuka et al. 1997; Singh et al. 2002). Die beobachteten perivaskulären Ansammlungen SPHK1a-immunreaktiver mononukleärer Zellen bei den Tieren der Kontrollgruppe könnten ebenfalls ein Hinweis auf die Bildung derartiger Veränderungen sein.

Das Auftreten sog. „Ausreisser“ in der Immunhistochemie, d.h. von Gewebeschnitten, in welchen überdurchschnittlich hohe oder geringe Zellzahlen ermittelt wurden, kann zudem möglicherweise durch technische Schwierigkeiten verursacht werden: Bei der Anfertigung von Gefrierschnitten der Thoraxpakete ist es unvermeidbar, dass nicht jeder Schnitt den exakt vergleichbaren Lungenbezirk der unterschiedlichen Tiere erfasst. Dies führt zu einer gewissen Heterogenität der Proben, was sich unter anderem in unterschiedlichen Zellgehalten auswirken kann. Trotz der Auswahl möglichst ähnlicher Lungenschnitte sind derartige Schwankungen nicht auszuschließen.

Die bei den Tieren der Asthmagruppe erhöhte SPHK-Expression erfüllt bei diesen vermutlich verschiedene Funktionen. Durch die intrazellulär vermittelte Steigerung der Mitoserate bei gleichzeitiger Verminderung apoptotischer Prozesse durch die Verschiebung des Sphingolipidgleichgewichtes wird die Infiltration des Gewebes mit Leukozyten und somit der entzündliche Prozess verstärkt. Besonders die Einwanderung für allergisches Asthma charakteristischer Leukozytenspezies wird, wie verschiedene Untersuchungen zeigten, durch die Vermittlung von exogenem S1P verursacht: Roviezzo et al. (2004) wiesen anhand von in-vitro-Experimenten an humanen eosinophilen Granulozyten sowie in vivo an Rattengewebe die chemotaktische Wirkung von S1P auf diese Zellen nach. Diese führte zur S1P-vermittelten eosinophilen Gewebsinfiltration, wie sie im Verlauf allergischer Erkrankungen vorkommt. Dieselbe Arbeitsgruppe wies die S1P-Rezeptoren S1P1, -2 und -3 auf der Oberfläche eosinophiler Granulozyten nach, deren Expression dosisabhängig durch S1P erhöht wurde. Diese Ergebnisse ergänzen die Untersuchungen von Ammit et al. (2001), die beobachteten, dass die Anzahl eosinophiler Granulozyten und die Konzentration von S1P in der BAL asthmatischer Patienten nach Allergenprovokation miteinander korrelierten. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung deuten darauf hin, dass S1P, welches ausschließlich durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen, nicht aber durch eosinophile Granulozyten synthetisiert wird, auf chemotaktischem Weg zur deren Akkumulation im allergisch-entzündlich veränderten Gewebe beiträgt. Bezüglich der Wirkung auf T-Lymphozyten scheint S1P im Verlauf allergischen Asthmas zudem gewisse antiinflammatorische Effekte auszuüben. Studien an OVA-sensibilisierten

Mäusen unter Verwendung des S1P-Agonisten FTY720 gaben Hinweise darauf, dass S1P zur Verminderung der Anzahl zirkulierender, CD4-positiver T-Lymphozyten führt (Sawicka et al. 2003). Anhand von ähnlichen Untersuchungen konnten Brinkmann et al. (2002) und Mandala et al. (2002) bereits zeigen, dass S1P die Migration von CD4-positiven T-Lymphozyten, welche ebenfalls S1P-Rezeptoren exprimieren (Graeler et al. 1998), aus Lymphknoten und anderen lymphoiden Geweben in das betroffene Gewebe verringert. Bei sensibilisierten Individuen ist die Immigration allergenspezifischer, CD4-positiver T-Lymphozyten nach Allergenkontakt wesentlicher Bestandteil der allergischen Reaktion. Es ist denkbar, dass das im Lungengewebe durch mononukleäre Zellen vermehrt synthetisierte S1P zwar die durch Makrophagen, neutrophile und eosinophile Granulozyten vermittelten Entzündungsvorgänge auf unterschiedlichen Wegen verstärkt, auf den durch Lymphozyten vermittelten Teil der allergischen Reaktion aber eine dämpfende Wirkung ausübt. Der Rückgang der SPHK-Expression nach 48 Stunden könnte so zu einer Aufhebung der S1P-abhängigen Blockade der Lymphozytenemigration und damit eine Infiltration des betroffenen Gewebes mit T-Lymphozyten in der chronischen Phase des allergischen Asthmas begünstigen.

Im Lungengewebe kann sezerniertes und damit extrazellulär verfügbares S1P zudem parakrine Effekte auf benachbarte Zellen ausüben. Im peripheren Lungengewebe sind hiervon neben den bereits besprochenen glatten Gefäß- und Bronchialmuskelzellen besonders benachbarte Leukozyten betroffen, deren Chemotaxis- und Migrationsprozesse über S1P-Rezeptoren verstärkt werden (Lee et al. 2002; Melendez & Ibrahim 2004). Die Expression verschiedener S1P-Rezeptoren durch von Ratten stammende Makrophagen wurde von Hornuss et al. (2002) nachgewiesen. Auf diese Weise könnte S1P zur Migration der Makrophagen sowie anderer Leukozyten in das gesamte Lungengewebe beitragen. Ein Hinweis darauf gibt die in dieser Untersuchung gemachte Beobachtung, dass die in der Asthmagruppe vorkommenden SPHK-immunreaktiven neutrophilen Granulozyten und Makrophagen im Allgemeinen nicht, wie es bei den Tieren der Kontrollgruppe der Fall war, in Form von perivaskulären und peribronchialen Ansammlungen vorlagen, sondern im Interalveolarbereich und den Alveolen der peripheren Lungenbereiche verteilt waren. Des Weiteren wurde bereits die chemotaktische Wirkung von S1P auf T-Lymphozyten nachgewiesen (Graeler et al. 2003), welche, im Gegensatz zu den Beobachtungen von Brinkmann et al. (2002) und Mandala et al. (2002) nach Allergenprovokation sensibilisierter Individuen aus Lymphknoten und peripherem lymphoiden Gewebe in das betroffene Gebiet einwandern. Auch hier kam es zu einer vorübergehenden, S1P-abhängigen, vermehrten Expression von S1P-Rezeptoren auf der Zelloberfläche.

## **Zeitabhängigkeit der SPHK-Expression**

Die hier 24 Stunden nach Allergenprovokation untersuchten Gewebeproben repräsentieren die Spätreaktion des akuten allergischen Asthmas, in welcher die pathologischen Abläufe und Veränderungen im Lungengewebe durch die Infiltration und Cytokinproduktion verschiedener Leukozytenspezies bestimmt werden. 24-48 Stunden nach Allergenprovokation kann es durch Verminderung der Cytokinproduktion und Migration sowie durch apoptotische Prozesse der Leukozyten zum Abklingen der Entzündung kommen. Ist dies nicht der Fall, kommt es aufgrund einer sich selbst erhaltenden Entzündung zur Ausbildung der verlängerten Spätreaktion, welche schließlich zur Ausbildung chronischer Veränderungen der Atemwege führt (Bousquet et al. 2000). Der Beginn dieser Phase wird durch die 48 Stunden nach Allergenprovokation untersuchten Proben repräsentiert. Ammit et al. (2001) wiesen in BAL-Proben asthmatischer Menschen 48 Stunden nach Allergenprovokation die höchsten S1P-Konzentrationen nach, welche erst 4-6 Tage später wieder auf ein Basalniveau abfielen. Diese Beobachtung sowie die Tatsache, dass S1P-Rezeptoren durch glatte Atemwegsmuskelzellen exprimiert werden und S1P auf diese eine proliferationsfördernde Wirkung ausübt (Ammit et al. 2001), veranlassten Jolly et al. (2001) zu der Annahme, dass S1P bei allergischem Asthma sowohl an der Entstehung akuter als auch chronischer Veränderungen beteiligt ist. Die in der vorliegenden Untersuchung gewonnenen Ergebnisse der Immunhistochemie auf der Ebene der Expression des S1P produzierenden Enzymes SPHK zeigen in der Asthmagruppe eine Erhöhung der SPHK-Expression 24 Stunden nach Allergenprovokation, welche 48 Stunden nach Allergenprovokation auf ein der Kontrollgruppe ähnliches Niveau abfiel. Ausgehend von der Annahme, dass der zeitliche Unterschied zwischen mRNA-Expression des Enzymes und Synthese des Produktes S1P nur geringfügig ist, deuten die immunhistochemischen Daten darauf hin, dass S1P bei BN-Ratten nur in der akuten Phase der asthmatischen Reaktion an der Vermittlung der charakteristischen inflammatorischen Prozesse beteiligt ist, während es in der verlängerten Spätphase allergischen Asthmas keine Rolle spielt. Dabei müssen verschiedene Aspekte zur Interpretation der unterschiedlichen Ergebnisse betrachtet werden:

In der Untersuchung von Ammit et al. (2001) wurden BAL-Proben untersucht, während hier zusätzlich Gewebeproben verwendet wurden. Dabei ist zu bedenken, dass zwischen Lungengewebe und BAL häufig Unterschiede in Bezug auf die Anzahl und Zusammensetzung der vorhandenen Zellen vorliegen (Schuster et al. 2000), was beim Vergleich der beiden Kompartimente berücksichtigt werden muss. Des Weiteren ist es denkbar, dass die verminderte Expression von SPHK1 nicht einen unmittelbaren Abfall der S1P-Konzentration zur Folge hat, da diese nicht nur durch die Aktivität von SPHK, sondern

auch durch den Abbau von S1P durch die Enzyme S1P-Phosphatase (Le Stunff et al. 2004b) oder S1P-Lyase (Zhou & Saba 1998; Hannun et al. 2001) reguliert wird. Durch die Aktivität dieser Enzyme werden die zellulären S1P-Konzentrationen normalerweise auf einem geringen Niveau gehalten. Ob diese während allergischer Prozesse ebenfalls beeinflusst werden, ist bisher noch nicht untersucht worden. In der Untersuchung von Ammit et al. (2001) wurde ausschließlich extrazelluläres S1P erfasst, wobei dessen Herkunft nicht geklärt wurde. Es ist bekannt, dass S1P durch aktivierte Leukozyten verschiedener Spezies sezerniert werden kann (Graeler et al. 2002). Selbst nach Reduktion der intrazellulären S1P-Synthese können aufgrund von Sekretion von S1P in den Extrazellulärraum hier höhere S1P-Konzentrationen aufrechterhalten werden. Über den Abbau extrazellulären S1P existieren bisher keine gesicherten Erkenntnisse. Zusätzlich ist zu beachten, dass Ammit et al. (2001) ihre Untersuchungen an humanen BAL-Proben durchführten. Obwohl bekannt ist, dass die hier untersuchten BN-Ratten in Bezug auf das Cytokinprofil und weitere pathophysiologische Charakteristika das menschliche allergische Asthma repräsentieren, kann nicht von identischen Bedingungen bezüglich der Regulation und des Vorkommens von S1P bei beiden Spezies ausgegangen werden. Eine Verminderung der S1P-Synthese durch die am Krankheitsprozess beteiligten Zellen am Ende der akuten Phase der allergischen Reaktion könnte im Sinne einer physiologischen Schutzfunktion vor zu starker Gewebeschädigung durch die Aktivität der eingewanderten Leukozyten interpretiert werden: Neutrophile Granulozyten treten, wie auch am BN-Modell durch Schuster et al. (2000) bei akutem allergischen Asthma nachgewiesen wurde, im Verlauf der Frühphase entzündlicher Reaktionen als wichtige Komponente der unspezifischen Abwehr auf. Gleichzeitig können diese aber bei überschießender Aktivierung oder übermäßiger Verlängerung ihrer Lebensdauer aufgrund der Reduktion von Apoptoseprozessen tiefgreifende Gewebeschäden erzeugen. Vorkommen und Ausmaß von Gewebeschäden durch neutrophile Granulozyten hängen dabei von deren Aktivierungsgrad ab (MacKinnon et al. 2002). Da an der Aktivierung neutrophiler Granulozyten ein S1P-abhängiger Mechanismus beteiligt ist, könnte der Rückgang der S1P-Produktion, wie sie in dieser Untersuchung nach 48 Stunden nachgewiesen wurde, zur Verminderung der entzündlichen Reaktion führen und somit eine überschießende Neutrophilenaktivität verhindern. Auch die Aktivierung von Makrophagen führt in der Akutphase des allergischen Asthmas zur Synthese und Sekretion proinflammatorischer Mediatoren (Bousquet et al. 2000; Menard & Bissonnette 2000), welche neben ihrer physiologischen Funktion ebenfalls zu Gewebeschädigungen beitragen können. Verschiedene Autoren vertreten die Ansicht, dass Makrophagen je nach Aktivierungszustand durch Modulation der abgegebenen Cytokine sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effekte im Lungengewebe entfalten können (Zeibecoglou et al. 2000; Careau & Bissonnette 2004; Peters-Golden 2004). Eine Verminderung der S1P-Synthese 48



Stunden nach Allergenprovokation aufgrund einer verminderten SPHK-Expression durch ED1-immunreaktive Makrophagen könnte ebenfalls zur Verminderung der S1P-abhängigen, proinflammatorischen Effekte auf die pulmonalen Leukozyten sowie zur Verminderung des allergisch bedingten Bronchospasmus aufgrund der Reduktion S1P-vermittelter Kontraktionsvorgänge an glatten Muskelzellen führen. Auf diese Weise wird möglicherweise ein Fortgang der inflammatorischen Prozesse und damit ein Eintritt in die chronische Phase des allergischen Asthmas, welche durch einen sich selbst aufrechterhaltenden Entzündungsprozess gekennzeichnet ist, verhindert. Die Vermutung, dass S1P eher zur Vermittlung akuter als chronischer Entzündungsprozesse beiträgt, wird durch die Beobachtungen von Graeler et al. (2003) und Roviezzo et al. (2004) unterstützt, welche eine Reduktion der biologischen Aktivität von T-Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten durch Verminderung der S1P-Rezeptor-Expression nach verlängerter S1P-Exposition nachwiesen.

Im Gegensatz zur Reduktion des Anteils SPHK1-exprimierender Zellen konnte in der qRT-PCR im Lungengewebe nach dem Anstieg nach 24 Stunden keine Rückkehr der SPHK1-Werte auf geringere Werte nachgewiesen werden. Die SPHK2-Expression blieb zu beiden Zeitpunkten auf gleichem Niveau. Da die Expression auf der mRNA-Ebene vor der Expression auf der Proteinebene stattfindet, ist im Fall von SPHK1 eine zweite Expressionssteigerung, welche auf der Proteinebene noch nicht stattgefunden hatte, nicht auszuschließen.

## ***SPHK in Bronchoalveolärer Lavage***

### **Makrophagen und neutrophile Granulozyten**

Im Gegensatz zum Lungengewebe zeigten bei einem Teil der Tiere unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit alle in der BAL vorkommenden SPHK1a-immunreaktiven mononukleären Zellen eine Kolokalisation mit dem für Makrophagen spezifischen CD68-Antigen und exprimierten die NADPH-Oxidase-Untereinheit gp91phox, während bei vereinzelt Tieren beider Gruppen keine der SPHK1a-immunreaktiven Zellen eine Kolokalisation mit CD68 zeigte (s. Abb. 14). Es ist daher davon auszugehen, dass im Verlauf des allergischen Asthmas eine Migration SPHK1a-exprimierender Makrophagen und neutrophiler Granulozyten in den Alveolarraum stattfindet bzw. die in der BAL nachweisbare SPHK1a-Expression durch im Alveolarraum ansässige Makrophagen und neutrophile Granulozyten verursacht wird. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen wiesen bereits darauf hin, dass Alveolarmakrophagen eine der Hauptquellen proinflammatorischer Mediatoren in der Pathogenese des allergischen Asthmas darstellen (Menard & Bissonnette 2000). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten bei der Differenzierung von Leukozytenspezies in der BAL bei asthmatischen BN-Ratten im Vergleich zu Kontrolltieren nach Allergenprovokation eine signifikante Erhöhung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten nachweisen (Schneider et al. 1997; Schuster et al. 2000). Wie die vorliegende Arbeit zeigt, sind diese Zellspezies für die auch anhand von quantitativer PCR nachgewiesene SPHK-Expression im Alveolarraum verantwortlich. Auffälligerweise konnte nur bei vereinzelt Tieren unabhängig von deren Zugehörigkeit zu Asthma- oder Kontrollgruppe eine SPHK1a-Immunreaktivität neutrophiler Granulozyten beobachtet werden. Die Ursachen hierfür können unterschiedlich sein:

1. Es findet keine Migration SPHK1a-immunreaktiver neutrophiler Granulozyten in den Alveolarraum statt.
2. Es existieren, ebenso wie es bereits im Falle von Makrophagen nachgewiesen wurde (Poulter & Burke 1996; Johansson et al. 1997; Zeibecoglou et al. 2000; Laskin et al. 2001; Sibille & Reynolds 1990), unterschiedliche Subpopulationen von neutrophilen Granulozyten, die durch unterschiedliche Lokalisationen und Zusammensetzung der von ihnen sezernierten Mediatoren gekennzeichnet sind, so dass eine SPHK-Expression durch neutrophile Granulozyten hauptsächlich bei der gewebeständigen Subpopulation vorkommt.
3. Die Migration neutrophiler Granulozyten in den Alveolarraum findet zu einem Zeitpunkt später als 48 Stunden nach Allergenprovokation oder zu einem sehr frühen

Zeitpunkt statt und ist transient, so dass die hier durchgeführten Probennahmen nicht zur Detektion neutrophiler Granulozyten geeignet waren.

4. Das im Gewebe vorliegende Cytokinmilieu unterscheidet sich von dem in der BAL, so dass in den meisten Fällen nur gewebeständige neutrophile Granulozyten zur Expression von SPHK angeregt werden.

Dabei ist zu beachten, dass Alveolarmakrophagen den größten Teil der im Bronchoalveolarraum vorkommenden Leukozytenspezies repräsentieren (Schuster et al. 2000; Sirois & Bissonnette 2001). Die Differenzierung der unterschiedlichen Leukozytenspezies in BAL-Proben sensibilisierter BN-Ratten und einer Kontrollgruppe nach Allergenprovokation durch Singh et al. (2002) ergab eine ca. 100-fach höhere Anzahl von Makrophagen im Vergleich mit neutrophilen Granulozyten bei den Tieren der Kontrollgruppe und eine 10fach höhere Anzahl bei den asthmatischen Tieren. Ein Influx SPHK1a-immunreaktiver neutrophiler Granulozyten, wie er bei vereinzelt Tieren auftrat, kann ebenfalls die Folge einer zusätzlich zu den allergisch bedingten Veränderungen vorliegenden Affektion der Atemwege sein, wie sie auch unter Laborbedingungen nicht auszuschließen ist. Bei den verwendeten Tieren wurde beobachtet, dass einzelne unter diesen nach der zur Allergenprovokation durchgeführten Inhalationsanästhesie mit Isofluran unterschiedlich stark ausgeprägte Störungen des Allgemeinbefindens zeigten sowie im Vergleich zu den übrigen Tieren eine deutlich verlängerte Erholungszeit benötigten. Des Weiteren kann die Anwesenheit neutrophiler Granulozyten in der BAL auf einen Kontakt mit bakteriellen Infektionserregern hinweisen. Trotz Haltung der verwendeten Tiere unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen ist ein Kontakt einzelner Tiere mit Infektionserregern während der zur Sensibilisierung und Allergenprovokation notwendigen Manipulationen oder im Zeitraum zwischen Allergenprovokation und Organentnahme nicht auszuschließen. Das Auftreten SPHK1a-immunreaktiver neutrophiler Granulozyten bei vereinzelt Tieren sowohl in der Asthma- als auch in der Kontrollgruppe legt die Annahme nahe, dass eine vorliegende allergische Reaktion nicht als einzige Ursache hierfür zu betrachten ist.

## **Vergleich von Asthma-und Kontrollgruppe**

Sowohl 24 als auch 48 Stunden nach Allergenprovokation war der Anteil SPHK1a-immunreaktiver, CD68-exprimierender Zellen in der Gruppe der Asthmatiere signifikant erhöht, während dies bei den NADPH-Oxidase-haltigen, gp91phox-immunreaktiven Zellen nur nach 48 Stunden der Fall war. Da in den BAL-Proben keine SPHK-1a-immunreaktiven neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden konnten, die gp91phox-immunreaktiven

Zellen aber die neutrophilen Granulozyten mit einschließen, könnte die Anwesenheit neutrophiler Granulozyten mit fehlender SPHK-Expression in der BAL, welche bei der Berechnung des Anteiles SPHK- und gp91phox-immunreaktiver Zellen an der Gesamtzahl gp91phox-immunreaktiver Zellen berücksichtigt werden, zu diesem Ergebnis führen. Die nach 48 Stunden nachgewiesene Erhöhung des genannten Wertes in der Gruppe der Asthmatiere ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass zu diesem Zeitpunkt bereits ein Rückgang der Anzahl neutrophiler Granulozyten aus dem Alveolarraum erfolgt ist und somit der Anteil SPHK1a-immunreaktiver Makrophagen an der Gesamtzahl gp91phox-immunreaktiver Zellen ansteigt. Alveolarmakrophagen stellen die Hauptquelle proinflammatorischer Mediatoren in der Pathogenese des allergischen Asthmas dar (Menard & Bissonnette 2000). Dementsprechend waren die Unterschiede bezüglich des Anteils SPHK-1a-immunreaktiver Makrophagen zwischen Asthma- und Kontrolltieren in der BAL wesentlich stärker ausgeprägt als im Lungengewebe. Wie bereits bei der Diskussion der im Gewebe erhobenen Befunde erwähnt wurde, existieren auch unter den Alveolarmakrophagen unterschiedliche Subpopulationen, welche sich in Dichte und Reifegrad unterscheiden. Auch hier sind die unreiferen Makrophagen höherer Dichte durch höhere Sekretions- sowie weitere zellspezifische Leistungen gekennzeichnet, so dass vermutlich auch im Alveolarraum die Ursache für den erhöhten Anteil SPHK1a-exprimierender Makrophagen bei den Tieren der Asthmagruppe in einer Erhöhung des Anteiles der sekretorisch aktiveren Makrophagensubpopulation liegt. Careau et al. (2002) bestimmten die Sekretion der Entzündungsmediatoren IL-10 und TNF durch Alveolarmakrophagen sensibilisierter BN-Ratten im Vergleich mit nicht sensibilisierten Kontrolltieren und wiesen 24 Stunden nach Allergenprovokation signifikant erhöhte Konzentrationen beider Substanzen bei den Tieren der Asthmagruppe nach. Die Steigerung der SPHK-Expression durch TNF- $\alpha$  wurde bereits mehrfach beschrieben (Xia et al. 1998; Xia et al. 1999) und kann als mögliche Ursache für die in dieser Arbeit nachgewiesene Erhöhung der SPHK-Expression in der BAL eine Rolle spielen. Der durch Ammit et al. (2001) gemessene Anstieg von S1P in der BAL asthmakranker Menschen nach Allergenprovokation weist zudem auf die Existenz extrazellulären S1P hin. Wie bereits erwähnt wurde, findet durch unterschiedliche Leukozytenspezies, darunter auch Makrophagen, eine Sekretion von S1P in den Extrazellulärraum statt (Graeler et al. 2002). Obwohl Olivera et al. (1999) nach Überexpression von SPHK in NIH 3T3 Fibroblasten und HEK293-Zellen nur eine Erhöhung der intra- nicht aber der extrazellulären S1P-Konzentration nachweisen konnten, scheint hier eine Sekretion von S1P stattzufinden. Es ist denkbar, dass die Ursache für diese unterschiedlichen Beobachtungen in der Verwendung unterschiedlicher Zellspezies liegt, da nicht jede Zellspezies zur Sekretion von S1P in der Lage ist. Das extrazelluläre S1P dient im

bronchoalveolären Raum möglicherweise zur Vermittlung S1P-Rezeptorabhängiger Effekte auf benachbarte Zellen. Hier ist in erster Linie an die Kontraktilitätssteigerung glatter Atemwegsmuskelzellen sowie an die chemotaktische Wirkung auf benachbarte immunkompetente Zellen zu denken.

## **Zeitabhängigkeit der SPHK-Expression**

Sowohl in der Asthma- als auch in der Kontrollgruppe kam es zu einem signifikanten Abfall des Anteiles der SPHK1a-immunreaktiven mononukleären Zellen 48 Stunden nach Allergenprovokation. Es scheint also auch bei den im Alveolarraum ansässigen Zellen eine Reduktion der SPHK-Expression in der Spätphase der allergischen Reaktion zu erfolgen. Im Gegensatz zu den im Lungengewebe erhobenen Befunden liegen in der BAL auch nach 48 Stunden Unterschiede zwischen Asthma- und Kontrollgruppe vor; der Anteil der SPHK1a-immunreaktiven mononukleären Zellen ist auch hier bei den Asthmaticern noch signifikant erhöht. Verschiedene Ursachen sind hierfür denkbar: Durch eine Migration SPHK-1a-immunreaktiver Makrophagen aus dem Gewebe in den Alveolarraum kann im Alveolarraum deren Anzahl ansteigen, während es im Gewebe gleichzeitig zu einem Abfall des Anteiles dieser Zellen kommt. Eine weitere mögliche Ursache könnte in einer höheren Konzentration SPHK-1a-expressionsteigernder Faktoren im Alveolarraum liegen. Da es sich bei Alveolar- und interstitiellen Makrophagen vermutlich um funktionell verschiedene Subpopulationen handelt, ist es außerdem möglich, dass auch in Bezug auf die Expression von SPHK Unterschiede zwischen den unterschiedlich lokalisierten Makrophagen bestehen. Die S1P-Synthese und -Sekretion durch Makrophagen im Bronchoalveolarraum kann im Verlauf akuten Asthmas ebenfalls unterschiedliche Zwecke erfüllen. Wie auch im Gewebe, werden durch extrazelluläres S1P Migrations- und chemotaktische Prozesse benachbarter Leukozyten ausgelöst; des Weiteren dient der Anstieg intrazellulären S1P der Erhaltung und Proliferation des Alveolarmakrophagenpools. Weitere Effektorzellen im Bronchoalveolarraum stellen die glatten Bronchialmuskelzellen dar; hier trägt S1P aufgrund seiner rezeptorvermittelten kontraktionssteigernden Wirkung zum Auftreten des Bronchospasmus bei (Ammit et al. 2001). In Bronchialepithelzellen induziert S1P die Synthese des auf neutrophile Granulozyten chemotaktisch wirkenden Interleukin-8 (Bhattacharya 2004); das hierfür notwendige extrazelluläre S1P wird möglicherweise von den hier nachgewiesenen SPHK-1a-immunreaktiven Makrophagen sezerniert.

## ***Vergleich ungespülter Lungen mit gespülten Lungen***

Die immunhistochemische Untersuchung ungespülten Lungengewebes ergab ebenfalls signifikante Erhöhungen des Anteiles SPHK1a-immunreaktiver Zellen in der Gruppe der Asthmatiere sowohl 24 als auch 48 Stunden nach Allergenprovokation. Nach 48 Stunden wurde auch hier ein signifikanter Abfall der SPHK1a-Expression beobachtet. Es fiel auf, dass die Unterschiede zwischen Asthma- und Kontrollgruppe in ungespültem Gewebe deutlicher ausgeprägt waren. Da bei der Durchführung der BAL vermutlich freie Zellen, welche in ungespültem Gewebe an Ort und Stelle verbleiben und im Gefrierschnitt mit erfasst werden, mit ausgespült werden und bei der Herstellung der Cytospins auf den Objektträger gelangen, fallen in gespültem Gewebe die Unterschiede weniger deutlich aus als in ungespültem Gewebe. Gefrierschnitte von ungespültem Lungengewebe repräsentieren also die Verhältnisse in Lungeninterstitium und Bronchoalveolarraum.

## Zusammenfassung

Die Pathogenese allergischen Asthmas ist durch die Infiltration der Atemwege mit Leukozyten unterschiedlicher Spezies gekennzeichnet, welche durch Sekretion einer großen Zahl von Mediatorsubstanzen zu den charakteristischen klinischen und pathologisch-anatomischen Veränderungen führen. Art und Ausmaß dieser Veränderungen hängen unter anderem von Anzahl und Aktivierungszustand der eingewanderten immunkompetenten Zellen ab. Bei der allergischen Reaktion werden unterschiedliche Stadien durchlaufen, welche jeweils durch unterschiedliche Zellbilder charakterisiert sind. In den letzten Jahren wurde auch im Zusammenhang mit allergischem Asthma der Sphingolipidmetabolit Sphingosin-1-Phosphat (S1P), ein Produkt des Zellmembranstoffwechsels, bezüglich seiner Funktion bei der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen näher untersucht. Es ist bekannt, dass S1P von vielen unterschiedlichen Zellen, darunter auch immunkompetente Zellen, synthetisiert und zum Teil sezerniert werden kann und sowohl intra- als auch extrazellulär vermittelte Effekte auf unterschiedliche Zellpopulationen ausübt. Darunter sind vor allem die mitosefördernde Wirkung sowie die Regulation der zellulären Calciumkonzentration verschiedener Zellspezies und die Förderung der Migrations- und Chemotaxisprozesse immunkompetenter Zellen bekannt. Anhand von *In-vitro*-Experimenten konnte bereits die Beteiligung von S1P an der Vermittlung allergischer Prozesse bestätigt werden. Des Weiteren konnten erhöhte S1P-Werte in der BAL-Flüssigkeit menschlicher Asthmatiker nachgewiesen werden. Die Herkunft von S1P bei allergischem Asthma wurde bisher jedoch nicht geklärt. Daher sollte in der vorliegenden Untersuchung am Brown-Norway-Rattenmodell anhand des Nachweises des S1P-generierenden Enzymes Sphingosinkinase auf der Proteinebene mithilfe von Immunhistochemie sowie auf der Ebene der mRNA-Expression unter Einsatz von quantitativer Reverse-Transcription-PCR (qRT-PCR) die Synthese von S1P in der Akutphase allergischen Asthmas überprüft sowie die daran beteiligten Zellspezies identifiziert und quantifiziert werden. Hierbei wurden Ratten mit allergischem Asthma mit gesunden Kontrolltieren verglichen. Nach mehrfacher Sensibilisierung mit Ovalbumin (OVA) wurden die Tiere einer inhalativen Allergenprovokation unterzogen. Zur Erfassung der unterschiedlichen Kompartimente Lungengewebe und Alveolarraum wurden sowohl gespülte als auch ungespülte Lungengewebeproben sowie mithilfe bronchoalveolärer Lavage (BAL) gewonnene Zellen untersucht. Es konnte sowohl auf der Proteinebene als auch auf der Ebene der mRNA-Expression nachgewiesen werden, dass die Allergenprovokation OVA-sensibilisierter Tiere mit einer signifikant gesteigerten Expression des Enzymes SPHK1 24 Stunden später einhergeht. An der SPHK1a-Produktion waren sowohl glatte Muskelzellen der Lungengefäße sowie der

Bronchien als auch Neutrophile Granulozyten und Makrophagen beteiligt, wobei der bei den Tieren der Asthmagruppe nachgewiesene transiente Anstieg der SPHK-Expression durch Erhöhung des Anteils SPHK1a-exprimierender immunkompetenter Zellen im Lungengewebe sowie im Alveolarraum verursacht wurde. Diese konnten im Lungengewebe zu ca. 80% als ED1-positive Makrophagen und zu 20% als gp91phox-positive neutrophile Granulozyten identifiziert werden, während in der BAL bei den meisten Tieren alle SPHK1a-immunreaktiven Zellen ED1-positive Makrophagen waren. Bei vereinzelt Tieren beider Gruppen zeigten nur gp91phox-immunreaktive Zellen eine SPHK1a-Immunreaktivität. Die bei Kontrolltieren vorhandenen SPHK1a-immunreaktiven Zellen waren zum größten Teil im perivaskulären und -bronchialen Bereich akkumuliert, während bei den Asthmatischen ein großer Teil der peripher gelegenen immunkompetenten Zellen ebenfalls SPHK1a exprimierten, was möglicherweise durch den migrationsfördernden Effekt von S1P verursacht wird. Der Nachweis größerer Unterschiede zwischen Asthma- und Kontrolltieren bei der Untersuchung ungespülten Lungengewebes im Vergleich mit gespültem Lungengewebe weist auf die Migration eines Teils der S1P-produzierenden Zellen in den bronchoalveolären Raum hin.

Die vorliegenden Befunde lassen auf eine Beteiligung von S1P bei der Vermittlung der charakteristischen Veränderungen in der späten Akutphase allergischen Asthmas schließen, wobei S1P vermutlich nicht nur intrazelluläre Effekte ausübt, sondern nach dessen Sekretion benachbarte fixe und mobile Zellen mit beeinflusst.

48 Stunden nach Allergenprovokation war immunhistochemisch ein Rückgang der SPHK1a-Expression durch immunkompetente Zellen in Lungengewebe und BAL festzustellen, was darauf schließen lässt, dass S1P lediglich an der Vermittlung entzündlicher Prozesse in der Akutphase allergischen Asthmas beteiligt ist. Der in der qPCR ermittelte Anstieg der SPHK1 und -2-Expression 48 Stunden nach Allergenprovokation könnte ein Hinweis auf einen zweiten Anstieg der S1P-Produktion zu einem späteren Zeitpunkt sein. Im Gegensatz zu bisherigen Untersuchungen war die relative Expression von SPHK2 in Lungengewebe und BAL stärker als die relative Expression der Isoform SPHK1, was in Ermangelung eines Antikörpers gegen diese Isoform immunhistochemisch nicht überprüft werden konnte.

Die Befunde dieser Arbeit bestätigen die bisher vorliegenden Erkenntnisse zur Beteiligung der Mediatorsubstanz S1P bei allergischem Asthma. Der Nachweis der erhöhten Expression von SPHK vorwiegend durch Makrophagen, welche als wichtige Effektorzellen im Rahmen allergischen Asthmas bekannt sind, trägt zum Verständnis der in Makrophagen ablaufenden Signaltansduktionsprozesse in der Frühphase allergischem Asthmas bei. Die Aufklärung der zeitlichen Abläufe der SPHK-Expression unterstützt die Annahme, dass Makrophagen in den verschiedenen Phasen der allergischen Reaktion durch Änderung ihres Cytokinmusters



unterschiedliche Funktionen ausüben können. Kenntnisse über die Rolle von S1P und die beteiligten Enzyme und Metaboliten des Sphinglipidstoffwechsels bei allergischem Asthma sind für eine mögliche pharmakologische Beeinflussung notwendig. Diese Möglichkeit wurde bereits anhand des partiellen S1P-Agonisten FTY720 untersucht und könnte in Zukunft einen Ansatzpunkt zur Therapie des allergischen Asthmas darstellen.

## Summary

The pathogenesis of acute allergic asthma is characterized by the invasion of different leucocyte species into the lower airway parenchyma. The characteristic pathologic changes are caused by the secretion of a great number of different cytokines and mediator substances by the invading immune cells. The severity as well as the quality of these changes depend upon their number and their degree of activation. Each phase of the allergic reaction shows its typical pattern of invading leucocytes. For the recent years, a lot of attention has been paid to the lipid mediator sphingosine-1-phosphate (S1P), a product of cell membrane metabolism, concerning its role in the pathogenesis of inflammatory diseases, especially of allergic origin. It is well known, that S1P, which can be synthesized by various cell species, exerts different effects depending on the cell type. Some cells are able to secrete S1P into the extracellular space. The effects exerted by S1P can be mediated by intra- or extracellular pathways. Especially the mitotic effect as well as the regulation of the cellular calcium level of special cells and the enhancement of leucocyte migration and chemotactic processes have been investigated. *In vitro* experiments have already given evidence of the participation of S1P in the development of allergic diseases. In addition to this, increased amounts of S1P in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of asthmatic patients were found. Nevertheless, the origin of S1P in acute allergic asthma is still unknown.

The aim of the present study was to find out if there is an upregulation of S1P synthesis and its cellular sources during acute allergic asthma. This was researched by investigating the expression of the S1P-generating enzymes SPHK1 and -2 on the mRNA-level using qRT-PCR and on the protein level using immunohistochemistry. Rats with allergic asthma were compared with a group of healthy control animals. All animals were sensitized by injection of ovalbumin (OVA) several times; then the animals of the asthma group were challenged with the antigen by inhalation whereas the control animals received 0,9% sodium chloride solution instead of OVA. The different compartments of the lung were differentiated by examining slices of rinsed and native lung tissue as well as samples of BALF. A significant increase of SPHK1 expression could be determined on the mRNA level as well as on the protein level 24 hours after allergen challenge. SPHK1a-generating cells were smooth muscle cells of lung vasculature and bronchi as well as macrophages and neutrophil granulocytes. The increased expression of SPHK in asthmatic animals was caused by the elevation of the number of SPHK generating immune cells in lung tissue and BALF. In lung tissue 80% of these cells were identified as ED1-positive macrophages and 20% as neutrophil granulocytes, showing immunoreactivity to the gp91phox antibody. In the most BALF samples nearly 100% of the SPHK1a-producing cells were macrophages, whereas in a few animals of both groups only

neutrophil granulocytes showed a SPHK1a-expression. In the control group the greatest part of SPHK expressing cells was localized in the perivascular and peribronchial region; in asthmatic animals those cells were predominantly found in alveoles and interalveolar spaces in the peripheral regions of the lung. This might be due to the enhancing effect of S1P on cell migration.

Comparison between the asthmatic and control animals revealed greater differences in the number of SPHK-expressing cells in the rinsed lung tissue than in the native tissue indicating a migration of a part of these cells into the alveolar space.

These results point to a role of S1P in the generation of the characteristic inflammatory changes in acute allergic asthma; presumably not only by intracellular effects, but also by acting extracellularly on neighbour cells after being secreted. 48 hours after allergen challenge, there was a decrease of SPHK1a-positive cells both in lung tissue and BALF. This indicates that SPHK predominantly plays a role in the early phase of acute allergic asthma. The elevation of the SPHK1 and -2 expression on the mRNA level revealed by qRT-PCR might indicate a second rise of the SPHK expression in the prolonged phase of the asthmatic reaction. In contrast to previous investigations, the relative expression of the SPHK2 isoform compared to SPHK1 was higher in lung tissue and in BALF; this could not be investigated on the protein level, as there is no antibody available. The results of this work support the previous findings concerning the role of S1P in allergic asthma. The evidence of an increased SPHK-Expression predominantly caused by macrophages during the acute allergic asthmatic reaction contributes to a better understanding of the signaling pathways of the macrophage in allergic asthma. The time-dependent expression of SPHK in macrophages supports the idea, that during the different phases of the asthmatic reaction, Macrophages exert different effects according to their changes in cytokine synthesis. Knowledge of the sphingolipid metabolism in allergic asthma is necessary for a possible pharmacologic intervention. This has recently been tested by using the partial agonist of S1P, FTY720, and might be a useful tool in allergic asthma treatment in future.

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A	Ampère
ACh	Acetylcholin
Al(OH) <sub>3</sub>	Aluminiumhydroxid
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BN	Brown Norway
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium <sup>2+</sup>
CD	Cluster of Differentiation
DAG	Diacylglycerol
dNTP	Desoxynucleotidphosphate
EDG	Endothelial Differentiation Gene
EGF	Epidermal Growth Factor
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERK	Extracellular Regulated Kinase
HASMC	Human Airway Smooth Muscle Cell
HDM	House Dust Mite
HEK	Hamster Embryonic Kidney
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
IR	Immunreaktivität
kDa	Kilodalton
L	Lewis

M	Mol
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
min	Minute
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mM	Millimol
mRNA	Messenger Ribonuclein Acid
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NGF	Nerve Growth Factor
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NSS	Normales Schweineserum
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS + S	Phosphate Buffered Saline plus Sodium
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PFA	Paraformaldehyd
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
pmol	Picomol
q RT-PCR	quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonuclein Acid

rpm	rounds per minute
s	Sekunden
SD	Sprague Dawley
SD	Standardabweichung
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1PR	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor
SPHK	Sphingosinkinase
Th - Zelle	T-Helferzelle
TGF- $\beta$	Tumor Growth Factor- $\beta$
TNF- $\alpha$	Tumor Growth Factor- $\alpha$
U	Unit
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

## Literaturverzeichnis

**Aas V, Algeroy S, Sand KL & Iversen JG (2001)**

Fibronectin promotes calcium-signaling by interferon-gamma in human neutrophils via G-protein and sphingosine kinase-dependent mechanisms.  
Cell Commun Adhes, 8: 125-138

**Adachi-Yamada T, Gotoh T, Sugimura I, Tateno M, Nishida Y, Onuki T & Date H (1999)**

De novo synthesis of sphingolipids is required for cell survival by down-regulating c-Jun N-terminal kinase in drosophila imaginal discs.  
Mol Cell Biol, 19: 7276-7286

**Alemanly R, Meyer zu Heringdorf D, van Koppen CJ & Jakobs KH (1999)**

Formyl peptide receptor signaling in HL-60 cells through sphingosine kinase.  
J Biol Chem, 274: 3994-3999

**Allende ML, Sasaki T, Kawai H, Olivera A, Mi Y, van Echten-Deckert G, Hajdu R, Rosenbach M, Keohane CA, Mandala S, Spiegel S & Proia RL (2004)**

Mice deficient in sphingosine kinase 1 are rendered lymphopenic by FTY720.  
J Biol Chem, 279: 52487-52492

**Alvarez-Vasquez F, Sims KJ, Hannun YA & Voit EEO (2004)**

Integration of kinetic information on yeast sphingolipid metabolism in dynamical pathway models.  
J Theor Biol, 226: 265-291

**Ammit AJ, Hastie AT, Edsall LC, Hoffmann RK, Amrani Y, Krymskaya VP, Kane SA, Peters SP, Penn RB, Spiegel S & Panettieri RA Jr. (2001)**

Sphingosine 1-phosphate modulates human airway smooth muscle cell functions that promote inflammation and airway remodeling in asthma.  
FASEB J, 15: 1212-1214

**An S, Zheng Y & Bleu T (2000)**

Sphingosine 1-phosphate-induced cell proliferation, survival, and related signaling events mediated by G protein-coupled receptors Edg3 and Edg5.  
J Biol Chem, 275: 288-296

**Ancellin N, Colmont C, Su J, Li Q, Mittereder N, Chae SS, Stefansson S, Liao G & Hla (2002)**

Extracellular export of sphingosine kinase-1 enzyme.

J Biol Chem, 8: 6667-6675

**Arm JP & Lee TH (1992)**

The pathobiology of bronchial asthma.

Adv Immunol, 51: 323-382

**Banulius D, Nakano Y, Nauseef WM, Banti B, Cheng G, Lambeth DJ, Burritt JB, Taylor RM & Jesaitis AJ (2005)**

Evaluation of two anti-gp91phox antibodies as immunoprobes for Nox family proteins: mAb 54.1 recognizes recombinant full-length Nox 2, Nox 3 and the C-terminal domains of Nox 1-4 and cross-reacts with GRP 58.

Biochim Biophys Acta, 1752: 186-196

**Barnes PJ (1989)**

New concepts in the pathogenesis of bronchial hyperresponsiveness and asthma.

J Allerg Clin Immunol, 83: 1013-1026

**Baumruker T & Prieschl E (2002)**

Sphingolipids and the regulation of the immune response.

Seminars Immunol, 14: 57-63

**Baumruker T, Bornancin F & Billich A (2005)**

The role of sphingosine and ceramide kinases in inflammatory responses.

Immunol Lett, 96: 175-185

**Beaven MA & Baumgartner RA (1996)**

Downstream signals initiated in mast cells by Fc epsilon RI and other receptors

Curr Opin Immunol 8: 766-772.

**Bektas M, Barak LS, Jolly PS, Liu H, Lynch KR, Lacana E, Suhr KB, Milstien S & Spiegel S (2003)**

The G-protein-coupled receptor GPR4 suppresses ERK activation in a ligand-independent manner.

Biochem, 42: 12181-12191



**Bhattacharya J (2004)**

Lung injury: sphingosine-1-phosphate to the rescue.

Am J Respir Crit Care Med, 170: 928-929

**Billich A, Bornancin F, Devay P, Mechtcheriakova D, Urtz N & Baumruker T (2003)**

Phosphorylation of the immunomodulatory drug FTY720 by sphingosine kinases.

J Biol Chem, 278: 47408-47815

**Birrell MA, McCluskie K, Haddad EB, Battram CH, Webber SE, Foster ML, Yacoub MH & Belvisi MG (2003)**

Pharmacological assessment of the nitric-oxide synthase isoform involved in eosinophilic inflammation in a rat model of sephadex-induced airway inflammation.

JPET, 304: 1285-1291

**Bochner BS, Udem BJ & Lichtenstein LM (1994)**

Immunological aspects of allergic asthma.

Annu Rev Immunol, 12: 295-335

**Bornfeldt KE, Graves LM, Raines EW, Igarashi Y, Wayman G, Yamamura S, Yatomi Y, Sidhu JS, Krebs EG, Hakomori S & Ross R (1995)**

Sphingosine-1-phosphate inhibits PDGF-induced chemotaxis of human arterial smooth muscle cells: spatial and temporal modulation of PDGF chemotactic signal transduction.

J Cell Biol, 130:193-203

**Boschetto P, Mapp CE, Picotti G & Fabbri LM (1989)**

Neutrophils and asthma.

Eur Respir J, 6: 456-459

**Boujaoude LC, Bradshaw-Wilder C, Mao C, Cohn J, Ogretmen B, Hannun YA & Obeid LM (2001)**

Cystic fibrosis transmembrane regulator regulates uptake of sphingoid base phosphates and lysophosphatidic acid: modulation of cellular activity of sphingosine-1-phosphate.

J Biol Chem, 276: 35258-35264

**Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M & Vignola AM (2000)**

Asthma- from bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling.

Am J Respir Crit Care Med, 161: 1720-1745

**Bradley BL, Azzawi M, Jacobson M, Assoufi B, Collins JV, Irani AM, Schwartz LB, Durham SR, Jeffery PK & Kay AB (1991)**

Eosinophils, T-lymphocytes, mast cells, neutrophils, and macrophages in bronchial biopsy specimens from atopic subjects with asthma: comparison with biopsy specimens from atopic subjects without asthma and normal control subjects and relationship to bronchial hyperresponsiveness.

J Allerg Clin Immunol, 88: 661-674

**Brinkmann V, Davis MD, Heise CE, Albert R, Cottens S, Hof R, Bruns C, Prieschl E, Baumruker T, Hiestand P, Foster CA, Zollinger M & Lynch KR (2002)**

The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors.

J Biol Chem, 277: 21453-21457

**Busse WW & Lemanske RF (2001)**

Asthma.

N Engl J Med, 344: 350-362

**Careau E & Bissonnette EY (2004)**

Adoptive transfer of alveolar macrophages abrogates bronchial hyperresponsiveness.

Am J Respir Cell Mol Biol, 31: 22-27

**Careau E, Sirois J & Bissonnette EY (2002)**

Characterization of lung hyperresponsiveness, inflammation, and alveolar macrophage mediator production in allergy resistant and susceptible rats.

Am J Respir Cell Mol Biol, 5: 579-586

**Choi OH, Kim JH & Kinet JP (1996)**

Calcium mobilization via sphingosine kinase in signaling by the Fc epsilon RI antigen receptor.

Nature, 380: 634-636

**Chuang FYS, Sarsaroli M & Unkeless JC (2000)**

Convergence of Fc $\gamma$  receptor IIA and Fc $\gamma$  receptor IIIB signaling pathways in human neutrophils.

J Immunol, 164: 350-360

**Chun J (1999)**

Lysophospholipid receptors: implications for neural signaling.  
Crit Rev Neurobiol, 13: 151-168

**Chun J, Goetzl EJ, Hla T, Igarashi Y, Lynch KR, Moolenaar W, Pyne S & Tigyi G (2002)**

International Union of Pharmacology. XXXIV.  
Lysophospholipid receptor nomenclature.  
Pharmacol Rev, 54: 265-269

**Chung KF (2000)**

Airway smooth muscle cells: contributing to and regulating airway mucosal inflammation?  
Eur Respir J, 15: 961-968

**Cinque B, Di Marzio L, Centi C, Di Rocco C, Riccardi C & Cifone MG (2003)**

Sphingolipids and the immune system.  
Pharmacol Res, 47: 421-437

**Cohn L, Elias JA & Chupp GL (2004)**

Asthma: mechanisms of disease persistence and progression.  
Annu Rev Immunol, 22: 789-815

**Colic M, Popovic LJ, Gasic S, Dragojevic-Simic V, Milicevic NM, Matanovic D & Dujic A (1990)**

Immunohistochemical characterization of rat thymic non-lymphoid cells. 2. Macrophages and granulocytes defined by monoclonal antibodies.  
Immunology, 69: 416-422

**Coroneos E, Martinez M, McKenna S & Kester M (1995)**

Differential regulation of sphingomyelinase and ceramidase activities by growth factors and cytokines.  
J Biol Chem, 270: 23305-23309

**Coroneos E, Wang Y, Panuska JR, Templeton DJ & Kester M (1996)**

Sphingolipid metabolites differentially regulate extracellular signal-regulated kinase and stress-activated protein kinase cascades.  
J Biochem, 316: 13-17

**Coursol S, Fan LM, Le Stunff H, Spiegel S, Gilroy S & Assmann SM (2003)**

Sphingolipid signaling in arabidopsis guard cells involves heterotrimeric G proteins.  
Nature, 423: 651-654

**Cummings RJ, Parinandi NL, Zaiman A, Wang L, Usatyuk PV, Garcia JG & Natarajan (2002)**

Phospholipase D activation by sphingosine-1-phosphate regulates interleukin-8 secretion in human bronchial epithel cells.  
J Biol Chem, 277: 30227-30235

**Cuvillier O (2002)**

Sphingosine in apoptosis signaling.  
Biochim Biophys Acta, 1585: 153-162

**Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek PG, Coso OA, Gutkind S & Spiegel S (1996)**

Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate.  
Nature, 381: 800-803

**Djukanovic R, Roche WR, Wilson JW, Beasley CRW, Twentyman OP, Howarth PH & Holgate ST (1990)**

Mucosal inflammation in asthma.  
Am Rev Respir Dis, 142: 434-457

**Dominguez Ortega J, Leon F, Martinez Alonso JC, Alonso Llamazarez A, Roldan E, Robledo T, Mesa M, Bootello A & Martinez-Cocera C (2004)**

Fluorocytometric analysis of induced sputum cells in an asthmatic population.  
J Invest Allerg Clin Immunol, 14: 108-113

**Edsall LC & Spiegel S (1999)**

Enzymatic measurement of sphingosine 1-phosphate.  
Anal Biochem, 272: 80-86

**Edsall LC, Cuvillier O, Twitty S, Spiegel S & Milstien S (2001)**

Sphingosine kinase expression regulates apoptosis and caspase activation in PC12 cells.  
J Neurochem, 76: 1573-1584

**Edsall LC, Pirianov GG & Spiegel S (1997)**

Involvement of sphingosine 1-phosphate in nerve growth factor-mediated neuronal survival and differentiation.

J Neurosci, 17: 6952-6960

**Edsall LC, Van Brocklyn JR, Cuvillier O, Kleuser B & Spiegel S (1998)**

N,N-Dimethylsphingosine is a potent competitive inhibitor of protein kinase C: modulation of cellular levels of sphingosine 1-phosphate.

Biochemistry, 37: 12892-12898

**Elias JA, Zhu Z, Chupp G & Homer RJ (1999)**

Airway remodeling in asthma.

J Clin Invest, 104: 1001-1006

**Elwood W, Barnes PJ & Chung KF (1992)**

Airway hyperresponsiveness is associated with inflammatory cell infiltration in allergic brown norway rats.

Int Arch Allergy Immunol, 99: 91-97

**English D, Welch Z, Kovala AT, Harvey K, Volpert OV, Brindley DN & Garcia JG (2000)**

Sphingosine 1-phosphate released from platelets during clotting accounts for the potent endothelial cell chemotactic activity of blood serum and provides a novel link between hemostasis and angiogenesis.

FASEB J, 14: 2255-2265

**Fatatis A & Miller RJ (1999)**

Cell cycle control of PDGF-induced Ca(2+) signaling through modulation of sphingolipid metabolism.

FASEB J, 13: 1291-1301

**Ferreira MAR (2004)**

Inflammation in allergic asthma: initiating events, immunological response and risk factors.

Respirology, 9: 16-24

**Fireman P (2003)**

Understanding asthma pathophysiology.

Allergy Asthma Proc, 24: 79-83

**Fukuda Y, Kihara A & Igarashi Y (2003)**

Distribution of sphingosine kinase activity in mouse tissues: contribution of SPHK1.  
Biochem Biophys Res Commun, 309: 155-160

**Futerman AH & HannunYA (2004)**

The complex life of simple sphingolipids.  
EMBO Reports, 5: 777-782

**Garcia JG, Liu F, Verin AD, Birukova A, Dechert MA, Gerthoffer WT, Bamberg JR & English D (2001)**

Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement.  
Clin Invest, 108: 689-701

**Ghosh TK, Bian J & Gill DL (1994)**

Sphingosine 1-phosphate generated in the endoplasmic reticulum membrane activates release of stored calcium.  
J Biol Chem, 269: 22628-22635

**Gillard BK, Clement RG & Marcus DM (1998)**

Variations among cell lines in the synthesis of sphingolipids in de novo and recycling pathways.  
Glycobiology, 8: 885-890

**Goetzi EJ & Rosen H (2004)**

Regulation of immunity by lysosphingolipids and their G protein-coupled receptors.  
J Clin Invest, 114: 1531-1537

**Goetzi EJ, Wang W, McGiffert C, Huang MC & Gräler MH (2004)**

Sphingosine-1-phosphate and its G protein-coupled receptors constitute a multifunctional immunoregulatory system.  
J Cell Biochem, 92: 1104-1114

**Gomez-Munoz A, Kong J, Salh B & Steinbrecher UD (2003)**

Sphingosine-1-phosphate inhibits acid sphingomyelinase and blocks apoptosis in macrophages.  
FEBS Lett, 539: 56-60

**Gomez-Munoz A, Waggoner DW, O'Brien L & Brindley DN (1995)**

Interaction of ceramides, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in regulating DNA synthesis and phospholipase D activity.

J Biol Chem, 270: 26318-26325

**Goodemote KA, Mattie ME, Berger A & Spiegel S (1995)**

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

J Biol Chem, 270: 10272-10277

**Gottlieb D, Heideman W & Saba JD (1999)**

The DPL1 gene is involved in mediating the response to nutrient deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*.

Mol Cell Biol Res Commun, 1: 66-73

**Graeler M, Shankar G & Goetzl EJ (2002)**

Cutting edge: suppression of T cell chemotaxis by sphingosine 1-phosphate.

J Immunol, 169: 4084-4087

**Graeler MH, Bernhardt G & Lipp M (1998)**

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

Genomics, 53: 164-169

**Graeler MH, Kong Y, Karliner JS & Goetzl EJ (2003)**

Protein kinase C epsilon dependence of the recovery from down-regulation of S1P<sub>1</sub> G-protein-coupled receptors of T-Lymphocytes.

J Biol Chem, 278: 27737-27741

**Gundel RH, Wegner CD, Torcellini CA, Clarke CC, Haynes N, Rothlein R, Smith CW & Letts LG (1991)**

Endothelial leukocyte adhesion molecule-1 mediates antigen-induced acute airway inflammation and late-phase airway obstruction in monkeys.

J Clin Invest, 88: 1407-1411

**Hannun YA & Obeid LM (2002)**

The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind.

J Biol Chem, 277: 25847-25850

**Hannun YA, Luberto C & Argraves KM (2001)**

Enzymes of sphingolipid metabolism: from modular to integrative signaling.

Biochemistry, 40: 4894-4903

**Hayashi S, Okada T, Igarashi N, Fujita T, Jahangeer S & Nakamura S (2002)**

Identification and characterization of RPK118, a novel sphingosine kinase-1-binding protein.

J Biol Chem, 277: 33319-33324

**Hla T (2004)**

Physiological and pathological actions of sphingosine 1-phosphate.

Sem Cell Dev Biol, 15: 513-520

**Hla T (2003)**

Signaling and biological actions of sphingosine-1-phosphate.

Pharmacol Res, 47: 401-407

**Hla T & Maciag T (1990)**

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

J Biol Chem, 272: 32566-32572

**Hobson JP, Rosenfeldt HM, Barak LS, Olivera A, Poulton S, Caron MG, Milstien S & Spiegel S (2001)**

Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility.

Science, 291: 1800-1803

**Hornuss C, Hammermann R, Fuhrmann M, Juergens UR & Racké K (2001)**

Human and rat alveolar macrophages express multiple EDG-receptors.

Eur J Pharmacol, 429: 303-308



**Hylkema MN, Hoekstra MO, Luinge M & Timens W (2002)**

The strength of the OVA-induced airway inflammation in rats is strain dependent.  
Clin Exp Immunol, 129: 390-396

**Ibrahim FBM, Pang SJ & Melendez AJ (2004)**

Anaphylatoxin signaling in human neutrophils: a key role for sphingosine kinase.  
J Biol Chem, 279: 44802-44811

**Idzko M, Panther E, Corinti S, Morelli A, Ferrari D, Herouy Y, Dichmann S, Mockenhaupt M, Gebicke-Haerter P, Di Virgilio F, Girolomoni G & Norgauer J (2002)**

Sphingosine 1-phosphate induces chemotaxis of immature and modulates cytokine-release in mature human dendritic cells for emergence of Th2 immune responses.  
FASEB J, 16: 625-627

**Igarashi N, Okada T, Hayashi S, Fujita T, Jahangeer S & Nakamura SI (2002)**

Sphingosine kinase 2 is a nuclear protein and inhibits DNA synthesis.  
J Biol Chem, 278: 46832-46839

**Inagaki Y, Li PY, Wada A, Mitsutake S & Igarashi Y (2003)**

Identification of functional nuclear export sequences in human sphingosine kinase 1.  
Biochem Biophys Res Commun, 311: 168-173

**Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chiung KF & Barnes PJ (1999)**

Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma.  
Am J Respir Crit Care Med, 160: 1532-1539

**Jeffery P (1998)**

Structural alterations and inflammation of bronchi in asthma.  
Int J Clin Pract Suppl, 96: 5-14

**Jenkins GM, Richards A, Wahl T, Mao C, Obeid L & Hannun Y (1997)**

Involvement of yeast sphingolipids in the heat stress response of *saccharomyces cerevisiae*.  
J Biol Chem, 272: 32566-32572

**Jenkins GM & Hannun YA (2001)**

Role for de novo sphingoid base biosynthesis in the heat-induced transient cell cycle arrest of *Saccharomyces cerevisiae*.

J Biol Chem, 276: 8574-8581

**Johansson A, Lundborg M, Skold CM, Lundahl J, Tornling G, Eklund A & Camner P (1997)**

Functional, morphological, and phenotypical differences between rat alveolar and interstitial macrophages.

Am J Respir Cell Mol Biol, 16: 582-588

**Johnson KR, Becker KP, Facchinetti MM, Hannun YA & Obeid LM (2002)**

PKC-dependent activation of sphingosine kinase 1 and translocation to the plasma membrane. Extracellular release of sphingosine-1-phosphate induced by phorbol 12-myristate 13-acetate.

J Biol Chem, 277: 35257-35262

**Johnson KR, Johnson KY, Becker KP, Bielawski J, Mao C & Obeid LM (2003)**

Role of human sphingosine-1-phosphate phosphatase 1 in the regulation of intra- and extracellular sphingosine-1-phosphate levels and cell viability.

J Biol Chem, 278: 34541-34547

**Jolly PS, Bektas M, Olivera A, Gonzalez-Espinosa C, Proia RL, Rivera J, Milstien S & Spiegel S (2004)**

Transactivation of sphingosine-1-phosphate receptors by Fc epsilonRI triggering is required for normal mast cell degranulation and chemotaxis.

J Exp Med, 199: 959-970

**Jolly PS, Rosenfeldt HM, Milstien S & Spiegel S (2001)**

The roles of sphingosine-1-phosphate in asthma.

Mol Immunol, 38: 1239-1245

**Kaneider NC, Djanani A, Fischer-Colbrie R & Wiedermann CJ (2002)**

Sphingosine kinase-dependent directional migration of leucocytes in response to phorbol ester.

Biochem Biophys Res Commun, 297: 806-810

**Karakashian AA, Giltiy NV, Smith GM & Nikolova-Karakashian MN (2004)**

Expression of neutral sphingomyelinase-2 (NSMase-2) in primary rat hepatocytes modulates IL- $\beta$ -induced JNK activation.

FASEB J, 18: 968-970

**Kawa S, Kimura S, Hakomori S & Igarashi Y (1997)**

Inhibition of chemotactic motility and trans-endothelial migration of human neutrophils by sphingosine-1-phosphate.

FEBS Lett, 420: 196-200

**Kay AB & Corrigan CJ (1992)**

Asthma. Eosinophils and neutrophils.

Br Med Bull, 48: 51-64

**Kester M & Kolesnick R (2003)**

Sphingolipids as therapeutics.

Pharmacol Res, 47: 365-371

**Kinet JP (1999)**

The high-affinity IgE receptor Fc epsilon RI: from physiology to pathology.

Annu Rev Immunol, 17: 931-972

**Kleuser B, Maceyka M, Milstien S & Spiegel S (2001)**

Stimulation of nuclear sphingosine kinase activity by platelet-derived growth factor.

FEBS Lett, 503: 85-90

**Kohama T, Olivera A, Edsall L, Nagiec MM, Dickson R & Spiegel S (1998)**

Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase.

J Biol Chem, 273: 23722-23728

**Kolesnick R (2002)**

The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway.

J Clin Invest, 110: 3-8

**Lacana E, Maceyka M, Milstien S & Spiegel S (2002)**

Cloning and characterization of a protein kinase A anchoring protein (AKAP)-related protein that interacts with and regulates sphingosine kinase 1 activity.

J Biol Chem, 277: 32947-32953

**Lamblin C, Gosset P, Tillie-Leblond I, Saulnier F, Marquette CH, Wallaert B & Tonnel AB (1998)**

Bronchial neutrophilia in patients with noninfectious status asthmaticus.

Am J Respir Crit Care Med, 157: 394-402

**Laskin DL, Weinberger B & Laskin JD (2001)**

Functional heterogeneity in liver and lung macrophages.

J Leukoc Biol, 70: 163-170

**Le Stunff H, Galve-Roperh I, Peterson C, Milstien S & Spiegel S (2002)**

Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase in regulation of sphingolipid metabolism and apoptosis.

J Cell Biol, 158: 1039-1049

**Le Stunff H, Mikami A, Giussani P, Hobson JP, Jolly PS, Milstien S & Spiegel S (2004a)**

Role of sphingosine-1-phosphate phosphatase 1 in epidermal growth factor-induced chemotaxis.

J Biol Chem, 279: 34290-34297

**Le Stunff H, Milstien S & Spiegel S (2004b)**

Generation and metabolism of bioactive sphingosine-1-phosphate.

J Cell Biochem, 92: 882-899

**Lee H, Liao JJ, Graeler M, Huang MC & Goetzl EJ (2002)**

Lysophospholipid regulation of mononuclear phagocytes.

Biochim et Biophys Acta, 1582: 175-177

**Lee H, Lin CI, Liao JJ, Lee YW, Yang HY, Lee CY, Hsu HY & Wu HL (2004)**

Lysophospholipids increase ICAM-1 expression in human umbilical cord vein endothelial cells through a Gi- and NF- $\kappa$ -B-dependent mechanism.

Am J Physiol Cell Physiol, 278: C1657-1666

**Lee MJ, Thangada S, Claffey KP, Ancellin N, Liu CH, Kluk M, Volpi M, Sha'afi RI & Hla T (1999)**

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

Cell, 99: 301-312

**Lee MJ, Van Brocklyn JR, Thangada S, Liu CH, Hand AR, Menzeleev R, Spiegel S & Hla T (1998)**

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

Science, 279: 1552-1555

**Leung SY, Eynott P, Noble A, Nath P & Chung KF (2004)**

Resolution of allergic airways inflammation but persistence of airway smooth muscle proliferation after repeated allergen exposures.

Clin Exp Allergy, 34: 213-220

**Linden A (2001)**

Role of interleukin-17 and the neutrophil in asthma.

Int Arch Allerg Immunol, 126: 179-184

**Liu CH, Thangada S, Lee M-J, Van Brocklyn JR, Spiegel S & Hla T (1999)**

Ligand-induced trafficking of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1.

Mol Cell Biol, 10: 1179-1190

**Liu F, Verin AD, Wang P, Day R, Wersto RP, Chrest FJ, English DK & Garcia JG (2001)**

Differential regulation of sphingosine-1-phosphate- and VEGF-induced endothelial cell chemotaxis. Involvement of G(alpha 2)-linked Rho kinase activity.

Am J Respir Cell Mol Biol, 24: 711-719

**Liu H, Sugiura M, Nava VE, Edsall LC, Kono K, Poulton S, Milstien S, Kohama T & Spiegel S (2000)**

Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform.

J Biol Chem, 275: 19513-19520

**Lockmann K, Hinson JS, Medlin MD, Morris D, Taylor JM & Mack CP (2004)**

Sphingosine 1-phosphate stimulates smooth muscle cell differentiation and proliferation by activating separate serum factor co-factors.

J Biol Chem, 279: 42422-42430

**Lukacs NW, Strieter RM & Kunkel SL (1995)**

Leukocyte infiltration in allergic airway inflammation.

Am J Respir Cell Mol Biol, 13: 1-6

**Lyons JM & Karin NJ (2001)**

A role for G protein-coupled lysophospholipid receptors in sphingolipid-induced Ca<sup>2+</sup> signaling in MC3T3-E1 osteoblastic cells.

J Bone Miner Res, 16: 2035-2042

**Maceyka M, Payne SG, Milstien S & Spiegel S (2002)**

Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis.

Biochim Biophys Acta, 1585: 193-201

**MacKinnon AC, Buckley A, Chilvers ER, Rossi AG, Haslett C & Sethi T (2002)**

Sphingosine kinase: a point of convergence in the action of diverse neutrophil priming agents.

J Immunol, 169: 6394-6400

**MacLennan AJ, Browe CS, Gaskin AA, Lado DC & Shaw G (1994)**

Cloning and characterization of a putative G-protein-coupled receptor potentially involved in development.

Mol Cell Neurosci, 5: 201-209

**Mandala S, Hajdu R, Bergstrom J, Quackenbush E, Xie J, Milligan J, Thornton R, Shei GJ, Card D, Keohane CA, Rosenbach M, Hale J, Lynch CL, Rupprecht K, Parsons W & Rosen H (2002)**

Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists.

Science, 296: 346-349

**Mandala SM, Thornton R, Tu Z, Kurtz M, Nickels B, Broach J, Menzeleev R & Spiegel S (1998)**

Sphingoid base 1-phosphate phosphatase: a key regulator of sphingolipid metabolism and stress response.

Proc Natl Acad Sci USA, 95: 150-155

**Marchesini N, Osta W, Bielawski J, Luberto C, Obeid LM & Hannun YA (2004)**

Role for mammalian neutral sphingomyelinase 2 in confluence-induced growth arrest of MCF7 cells.

J Biol Chem, 279: 25101-25111

**Mathes C, Fleig A & Penner R (1998)**

Calcium release-activated calcium current (ICRAC) is a direct target for sphingosine.

J Biol Chem, 273: 25020-25030

**Matsubara S, Nakata A, Kikuchi M, Kikkawa H, Ikezawa K & Naito K (1997)**

Strain-related differences in sephadex bead-induced airway hyperresponsiveness and inflammation in rats.

Inflamm Res, 46: 299-305

**Matsushita K, Morrell CN & Lowenstein CJ (2004)**

Sphingosine 1-phosphate activates Weibel-Palade body exocytosis.

Proc Natl Acad Sci, 101: 11483-11487

**Mattie M, Brooker G & Spiegel S (1994)**

Sphingosine-1-phosphate, a putative second messenger, mobilizes calcium from internal stores via an inositol trisphosphate-independent pathway.

J Biol Chem, 269: 3181-3188

**Mazurek N, Megidish T, Hakomori S & Igarashi Y (1994)**

Regulatory effect of phorbol esters on sphingosine kinase in BALB/C 3T3 fibroblasts (variant A 31): demonstration of cell-type specific response—a preliminary note.

Biochem Biophys Res Commun, 198: 1-9

**McVerry BJ & Garcia JG (2005)**

In vitro and in vivo modulation of vascular barrier integrity by sphingosine 1-phosphate: mechanistic insights.

Cell Signal, 17: 131-139

**Melendez A, Andres Floto R, Gillooly DJ, Harnett MM & Allen JM (1998)**

Fc $\gamma$ RI coupling to phospholipase D initiates sphingosine kinase-mediated calcium mobilization and vesicular trafficking.

J Biol Chem, 273: 9393-9402

**Melendez A, Carlos-Dias E, Gosink M, Allen JM & Takacs L (2000)**

Human sphingosine kinase: molecular cloning, functional characterization and tissue distribution.

Gene, 251: 19-26

**Melendez AJ & Ibrahim FB (2004)**

Antisense knockdown of sphingosine kinase 1 in human macrophages inhibits C5a-receptor-dependent signal transduction, Ca<sup>2+</sup>-signaling, enzyme release, cytokine production, and chemotaxis.

J Immunol, 173: 1596-1603

**Melendez AJ & Khaw AK (2002)**

Dichotomy of Ca<sup>2+</sup>-signals triggered by different phospholipid pathways in antigen stimulation of human mast cells.

J Biol Chem, 277: 17255-17262

**Menard G & Bissonnette EY (2000)**

Priming of alveolar macrophages by leukotriene D(4): potentiation of inflammation.

Am J Crit Care Med, 23: 572-577

**Meyer zu Heringdorf D, Lass H, Alemany R, Laser KT, Neumann E, Zhang C, Schmidt M, Rauen U, Jakobs KH & van Koppen CJ (1998)**

Sphingosine kinase-mediated Ca<sup>2+</sup>-signaling by G-protein-coupled receptors.

EMBO J, 17: 2830-2837



**Meyer zu Heringdorf D, Lass H & Kuchar I (1999)**

Role of sphingosine kinase in Ca<sup>2+</sup>-signaling by epidermal growth factor receptor.

FEBS Lett, 461: 217-222

**Meyer zu Heringdorf D, Lass H, Kuchar I, Lipinski M, Alemany R, Rümenapp U & Jakobs KH (2001)**

Stimulation of intracellular sphingosine-1-phosphate production by G-protein-coupled sphingosine-1-phosphate-receptors.

Eur J Pharmacol, 414: 145-154

**Morita Y, Perez GI, Paris F, Miranda SR, Ehleiter D, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Xie Z, Reed JC, Schuchman EH, Kolesnick RN & Tilly JL (2000)**

Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy.

Nat Med, 6: 1109-1114

**Munro S (2003)**

Lipid rafts: elusive or illusive?

Cell, 115: 377-388

**Murate T, Banno Y, Watanabe K, Mori N, Wada A, Igarashi Y, Takagi A, Kojima T, Asano H, Akao Y, Yoshida S, Saito H & Nozawa Y (2001)**

Cell type-specific localization of sphingosine kinase 1a in human tissues.

J Histochem Cytochem, 49: 845-855

**Nava VE, Hobson JP, Murthy S, Milstien S & Spiegel S (2002)**

Sphingosine kinase type 1 promotes estrogen-dependent tumorigenesis of breast cancer MCF-7 cells.

Exp Cell Res, 281: 115-127

**Niedernberg A, Scherer CR, Busch AE & Kostenis E (2002)**

Comparative analysis of human and rat S1P<sub>5</sub>(edg8): differential expression profiles and sensitivities to antagonists.

Biochem Pharmacol, 64: 1243-1250

**Nikolova-Karakashian M, Morgan ET, Alexander C, Liotta DC & Merrill AH Jr. (1997)**

Bimodal regulation of ceramidase by interleukin-1beta. Implications for the regulation of cytochrome p450 2C11.

J Biol Chem 272: 18718-18724

**Niwa M, Kozawa O, Matsuno H, Kanamori Y, Hara A & Uematsu T (2000)**

Tumor necrosis factor-alpha-mediated signal transduction in human neutrophils: involvement of sphingomyelin metabolites in the priming effect of TNF-alpha on the fMLP-stimulated superoxide production.

Life Sci, 66: 2452-56

**Ohtsuka R, Doi K & Itagaki S (1997)**

Histological characteristics of respiratory system in brown norway rat.

Exp Anim, 1997: 127-133

**Ozaki H, Hla T & Lee MJ (2003)**

Sphingosine-1-phosphate signaling in endothelial activation.

J Atheroscler Thromb, 10: 125-131

**Okazaki H, Ishizaka N., Sakurai T, Kurokawa K, Goto K, Kumada M & Takuwa Y (1993)**

Molecular cloning of a novel putative G protein-coupled receptor expressed in the cardiovascular system.

Biochim Biophys Res Commun, 190: 1104-1109

**Olivera A, Kohama T, Edsall L, Nava V, Cuvillier O, Poulton S & Spiegel S (1999)**

Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival.

J Cell Biol, 147: 545-557

**Olivera A & Spiegel S (1993)**

Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens.

Nature, 365: 557-560

**Olivera A & Spiegel S (2001)**

Sphingosine kinase: a mediator of vital cellular functions.

Prostaglandins, 64: 123-134

**Olivera A, Kohama T, Tu Z, Milstien S & Spiegel S (1998)**

Purification and characterization of rat kidney sphingosine kinase.

J Biol Chem, 273: 12576-12583

**Olivera A, Rosenfeldt HM, Bektas M, Wang F, Ishii I, Chun J, Milstien S & Spiegel S (2003)**

Sphingosine kinase type 1 induces G<sub>12/13</sub>-mediated stress fiber formation, yet promotes growth and survival independent of G-protein-coupled receptors.

J Biol Chem, 278: 46452-46464

**Olivera A, Rosenthal J & Spiegel S (1994)**

Sphingosine kinase from Swiss 3T3 fibroblasts: a convenient assay for the measurement of free sphingoid bases.

Anal Biochem, 223: 306-312

**Okajima F, Tomura H, Sho K, Kimura T, Sato K, Im DS, Akbar M & Kondo Y (1997)**

Sphingosine 1-phosphate stimulates hydrogen peroxide generation through activation of phospholipase-C-Ca<sup>2+</sup> system in FRTL-5 thyroid cells: possible involvement of guanosine triphosphate-binding proteins in the lipid signaling.

Endocrinology, 138: 220-229

**Ozaki H, Hla T & Lee M-J (2003)**

Sphingosine-1-phosphate signaling in endothelial activation.

J Atheroscler Thromb, 10: 125-131

**Pacheco YM, Abia R, Olivera A, Spiegel S, Ruiz-Gutierrez V & Muriana FJ (2003)**

Sphingosine-1-phosphate signal survival and mitogenesis are mediated by lipid-stereospecific binding of triacylglycerol-rich lipoproteins.

Cell Mol Life Sci, 60: 2757-2766

**Paris F, Perez GI, Fuks Z, Haimovitz-Friedman A, Nguyen H, Bose M, Ilagan A, Hunt PA, Morgan WF, Tilly JL & Kolesnick R (2002)**

Sphingosine 1-phosphate preserves fertility in irradiated female mice without propagating genomic damage in offspring.

Nat Med, 6: 1109-1114

**Paugh SW, Payne SG, Barbour SE, Milstien S & Spiegel S (2003)**

The immunosuppressant FTY720 is phosphorylated by sphingosine kinase type 2.

FEBS Lett, 554: 189-193

**Peng X, Hassoun PM, Sammani S, McVerry BJ, Burne MJ, Rabb H, Pearse D, Tuder RM & Garcia JG (2004)**

Protective effects of sphingosine 1-phosphate in murine endotoxin-induced inflammatory lung injury.

Am J Respir Crit Care Med, 169:1245-1251

**Perez GI, Knudson CM, Leykin L, Korsmeyer SJ & Tilly JL (1997)**

Apoptosis-associated signaling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction.

Nat Med, 3: 1228-1232

**Peters-Golden M (2004)**

The alveolar macrophage- the forgotten cell in asthma.

Am J Respir Cell Mol Biol, 31: 3-7

**Pettus BJ, Bielawski J, Porcelli AM, Reames DL, Johnson KR, Morrow J, Chalfant CE, Obeid LM & Hannun YA (2003)**

The sphingosine kinase 1/ sphingosine-1-phosphate pathway mediates COX-2 induction and PGE<sub>2</sub> production in response to TNF-2 $\alpha$ .

FASEB J, 17:1411-1421

**Pinto WJ, Wells GW & Lester RL (1992)**

Characterization of enzymatic synthesis of sphingolipid long-chain bases in *Saccharomyces cerevisiae*: mutant strains exhibiting long-chain-base auxotrophy are deficient in serine palmitoyltransferase activity.

J Bacteriol, 174: 2575-2581

**Pitson SM, Moretti PAB, Zebol JAM, Lynn HE, Xia P, Vadas MA & Wattenberg BW (2003)**

Activation of sphingosine kinase 1 by ERK1/2-mediated phosphorylation.

EMBO J, 22: 5491-5500

**Pitson SM, Moretti PAB, Zebol JR, Zareie R, Derian CK, Darrow AL, Qi J, D'Andrea RJ, Bagley CJ, Vadas MA & Wattenberg BW (2002)**

The nucleotide-binding-site of human sphingosine kinase 1.

J Biol Chem, 277: 49545-49553

**Pitson SM; Moretti PA, Zebol JR, Xia P, Gamble JR Vadas MA, D'Andrea RJ & Wattenberg BW (2000)**

Expression of a catalytically inactive sphingosine kinase mutant blocks agonist-induced sphingosine kinase activation. A dominant-negative sphingosine kinase.

J Biol Chem, 275: 33945-33950

**Poston RN, Chanez P, Lacoste JY, Litchfield T, Lee TH & Bousquet J (1992)**

Immunohistochemical characterization of the cellular infiltration in asthmatic bronchi.

Am Rev Respir Dis, 145: 918-921

**Poulter LW & Burke CM (1996)**

Macrophages and allergic lung disease.

Immunobiology, 195: 574-587

**Prieschl EE, Csonga R, Novotny V, Kikuchi GE & Baumruker T (1999)**

The balance between sphingosine and sphingosine-1-phosphate is decisive for mast cell activation after FcεReceptor I triggering.

J Exp Med, 190: 1-8

**Pyne S, Chapman J, Steele L & Pyne NJ (1996)**

Sphingomyelin-derived lipids differentially regulate the extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK-2) and c-Jun N-terminal kinase(JNK) signal cascades in airway smooth muscle.

Eur J Biochem, 237: 819-826

**Racké K, Hammermann R & Juergens UR (2000)**

Potential role of EDG receptors and lysophospholipids as their endogenous ligands in the respiratory tract.

Pulm Pharmacol Ther, 13: 99-114

**Radeff-Huang J, Seasholtz TM, Matteo RG & Heller Brown J (2004)**

G-protein mediated signaling pathways in lysophospholipid induced cell proliferation and survival.

J Cell Biochem, 92: 949-966

**Renzi PM, Olivenstein R & Martin JG (1993)**

Inflammatory cell population in the airways and parenchyma after antigen challenge in the rat.

Am Rev Respir Dis, 147: 967-974

**Robinson D, Hamid Q, Bentley A, Ying S, Kay AB & Durham SR (1993)**

Activation of CD4+ T cells, increased TH2-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma.

J Allergy Clin Immunol, 92: 313-324

**Rosenfeldt HM, Amrani Y, Watterson KR, Murthy KS, Panettieri RM jun & Spiegel S (2003)**

Sphingosine-1-phosphate stimulates contraction of human airway smooth muscle cells.

FASEB J, 17: 1789-1799

**Rosenfeldt HM, Hobson JP, Maceyka M, Olivera A, Nava VE; Milstien S & Spiegel S (2001)**

EDG-1 links the PDGF receptor to Src and focal adhesion kinase activation leading to lamellipodia formation and cell migration.

FASEB J, 15: 2649-2659

**Rosenfeldt HM, Hobson JP, Milstien S & Spiegel S (2001)**

The sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 is essential for platelet-derived growth factor-induced cell motility.

Biochem Soc Trans, 29: 836-839

**Roviezzo F, Del Galdo F, Abbate G, Bucci M, D'Agostino B, Antunes E, De Dominics G, Parente L, Rossi F, Cirino G & De Palma R (2004)**

Human eosinophil chemotaxis and selective in vivo recruitment by sphingosine 1-phosphate.

PNAS, 101: 11170-11175

**Ryan AJ, McCoy DM, McGowan SE, Salome RG & Mallampalli RK (2003)**

Alveolar sphingolipids generated in response to TNF-alpha modify surfactant biophysical activity.

J Appl Physiol, 94: 253-258

**Sampson (2000)**

The role of eosinophils and neutrophils in inflammation.

Clin Exp Allerg, 30: 22-27

**Sawicka E, Zuany-Amorim C, Manlius C, Trifilieff A, Brinkmann V, Kemeny D & Walker C (2003)**

Inhibition of Th-1 and Th-2-mediated airway inflammation by the sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720.

J Immunol, 171: 6206-6214

**Schneider T, van Velzen D, Moqbel R & Issekutz AC (1997)**

Kinetics and quantitation of eosinophil and neutrophil recruitment to allergic lung inflammation in a brown norway rat model.

Am J Respir Cell Mol Biol, 17: 702-712

**Schuster M, Tschernig T, Krug N & Pabst R (2000)**

Lymphocytes migrate from the blood into the bronchoalveolar lavage and lung parenchyma in the asthma model of the brown norway rat.

Am J Respir Crit Care Med, 161: 558-566

**Shi HZ (2004)**

Eosinophils function as antigen-presenting cells.

J Leucoc Biol, 76: 520-527

**Shin Y, Daly JW & Choi OH (2000)**

Diverse effects of sphingosine on calcium mobilization and influx in differentiated HL-60 cells.

Cell Calcium, 27: 269-280

**Shu X, Wu W, Mosteller RD & Broek D (2002)**

Sphingosine kinase mediates vascular endothelial-growth factor-induced activation of ras and mitogen-activated protein kinases.

Mol Cell Biol, 22: 7758-7768

**Sibille Y & Reynolds HY (1990)**

Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury.

Am Rev Respir Dis, 141: 471-501

**Singh P, Daniels M, Winsett DW, Richards J, Doerfler D, Hatch G, Adler KB & Gilmour MI (2002)**

Phenotypic comparison of allergic airway responses to house dust mite in three rat strains.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 284: 588-598

**Sirois J & Bissonette EY (2001)**

Alveolar macrophages of allergic resistant and susceptible strains of rats show distinct cytokine profiles.

Clin Exp Immunol, 126: 9-15

**Spiegel S & Milstien S (1995)**

Sphingolipid metabolites: members of a new class of lipid second messengers.

J Membr Biol, 146: 225-237

**Spiegel S & Milstien S (2000)**

Sphingosine-1-phosphate: signaling inside and out.

FEBS Letters, 476: 55-57

**Spiegel S & Milstien S (2002)**

Sphingosine-1-phosphate, a key cell signaling molecule.

J Biol Chem, 277: 25851-25854

**Spiegel S & Milstien S (2003a)**

Exogenous and intracellularly generated sphingosine-1-phosphate can regulate cellular processes by divergent pathways.

Biochemical Society Transactions, 31: 1216-1219

**Spiegel S & Milstien S (2003b)**

Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signaling lipid.

Nature Rev, 4: 397-407



**Spiegel S, Cuvillier O, Edsall L, Kohama T, Menzeleev R, Olivera A, Thomas D, Tu Z, Van Brocklyn J & Wang F (1998)**

Roles of sphingosine-1-phosphate in cell growth, differentiation, and death.

Biochemistry, 63: 69-73

**Spiegel S, English D & Milstien S (2002)**

Sphingosine 1-phosphate signaling: providing cells with a sense of direction.

Trends Cell Biol, 12: 236-242

**Teufelhofer O, Weiss RM, Parzefall W, Schulte-Hermann R, Micksche M, Berger W & Eibling L (2003)**

Promyelocytic HL60 cells express NADPH oxidase and are excellent targets in a rapid spectrophotometric microplate assay for extracellular superoxide.

Toxicol Sci, 76: 376-383

**Tillie-Leblond I, Gosset P & Tonnel A-B (2005)**

Inflammatory events in severe acute asthma.

Allergy, 60: 23-29

**Tokura Y, Wakita H, Yagi H, Nishimura K, Furukawa F & Takigawa M (1996)**

Th2 suppressor cells are more susceptible to sphingosine than Th1 cells in murine contact photosensitivity.

J Invest Dermatol, 107: 34-40

**Urtz N, Olivera A, Bofill-Cardona E, Csonga R, Billich A, Mechtcheriakowa D, Bornancin F, Woisetschläger M, Rivera J & Baumruker T (2004)**

Early activation of sphingosine kinase in mast cells and recruitment to Fc $\epsilon$ RI are mediated by its interaction with lyn kinase.

Mol Cell Biol, 24: 8765-8777

**Van Brocklyn JR, Lee MJ, Menzeleev R, Olivera A, Edsall L, Cuvillier O, Thomas DM, Coopman PJP, Thangada S, Liu CH, Hla T & Spiegel S (1998)**

Dual actions of sphingosine-1-phosphate: extracellular through the G $_i$ -coupled receptor EDG-1 and Intracellular to regulate proliferation and survival.

J Cell Biol, 142: 229-240

**Van der Brugge-Gammelkoorn GJ, Dijkstra CD & Sminia T (1985)**

Characterization of pulmonary macrophages and bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) macrophages in the rat. An enzyme-cytochemical and immunocytochemical study. Immunobiology, 169: 553-562

**Van Koppen CJ, Meyer zu Heringdorf D, Alemany R & Jakobs KH (2001)**

Sphingosine kinase-mediated calcium signaling by muscarinic acetylcholine receptors. Life Sciences, 68: 2535-2540

**Van Maanen HJ, Kraan YM, Roos D & Otto C (2005)**

Single-cell raman and fluorescence microscopy reveal the association of lipid bodies with phagosomes in leucocytes. Proc Natl Acad Sci USA, 102: 10159-10164

**Vignola AM, Chanez P, Paul-Lacoste P, Paul-Eugene N, Godard P & Bousquet J (1994)**

Phenotype and functional modulation of normal human alveolar macrophages by histamine. Am J Respir Cell Mol Biol, 11: 456-463

**Viksman MY, Liu MC, Bickel CA, Schleimer RP & Bochner BS (1997)**

Phenotypic analysis of alveolar macrophages and monocytes in allergic airway inflammation. 1. Evidence for activation of alveolar macrophages, but not peripheral blood monocytes, in subjects with allergic rhinitis and asthma. Am J Crit Care Med, 155: 858-863

**Wang F, Van Brocklyn JR, Hobson JP, Movafagh S, Zukowska-Grojec Z, Milstien S & Spiegel S (1999)**

Sphingosine 1-phosphate stimulates cell migration through a G-coupled cell surface receptor. J Biol Chem, 174: 35343-35350

**Watanabe M, Kitano T, Kondo T, Yabu T, Taguchi Y, Tashima M, Umehara H, Domae N, Uchiyama T & Okazaki T (2004)**

Increase of nuclear ceramide through caspase-3-dependent regulation of the "sphingomyelin cycle" in Fas-induced apoptosis. Cancer Res, 64: 1000-1007

**Watterson K, Sankala H, Milstien S & Spiegel S (2003)**

Pleiotropic actions of sphingosine-1-phosphate.

Prog Lipid Res, 42: 344-357

**Watterson KR, Ratz PH & Spiegel S (2005)**

The role of sphingosine-1-phosphate in smooth muscle contraction.

Cell Signal, 17: 289-298

**Wenzel S (2003)**

Mechanisms of severe asthma.

Clin Exp Allergy, 33: 1622-1628

**Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, Halliday JL, Trudeau JB Gibbs RL & Chu HW (1999)**

Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiological and clinical characteristics.

Am J Crit Care Med, 160: 1001-1008

**Wu J, Spiegel S, & Sturgill TW (1995)**

Sphingosine-1-phosphate rapidly activates the mitogen-activated protein kinase pathway by a G protein-dependent mechanism.

J Biol Chem, 270: 11484-11488

**Wu W, Mosteller RD & Broek D (2004)**

Sphingosine kinase protects lipopolysaccharide-activated macrophages from apoptosis.

Mol Cell Biol, 24: 7359-7369

**Xia P, Gamble JR, Rye KA, Wang L, Hii CS, Cockerill P, Khew-Goodall Y, Bert AG, Barter PJ & Vadas MA (1998)**

Tumor necrosis factor-alpha induces adhesion molecule expression through the sphingosine kinase pathway.

Proc Natl Acad Sci, 95: 14196-141201

**Xia P, Wang L, Gamble JR & Vadas MA (1999)**

Activation of sphingosine kinase by tumor necrosis factor-alpha inhibits apoptosis in human endothelial cells.

J Biol Chem, 274: 34499-34505

**Xia P, Wang L, Moretti PA, Albanese N, Chai F, Pitson SM, D`Andrea RJ, Gamble JR & Vadas MA (2002)**

Sphingosine kinase interacts with TRAF2 and dissects tumor necrosis factor-alpha signaling.  
J Biol Chem, 277: 7996-8003

**Xie JH, Nomura N, Koprak SL, Quackenbush EJ, Forrest MJ & Rosen H (2002)**

Sphingosine-1-phosphate receptor agonism impairs the efficiency of the local Immune response by altering trafficking of naïve and antigen-activated CD4<sup>+</sup> T cells.  
J Immunol, 170: 3662-3670

**Yagyu K, Steinhoff G, Schafers HJ, Dammenhayn L, Haverich A & Borst HG (1990)**

Comparison of mononuclear cell subpopulations in bronchoalveolar lavage fluid in acute rejection after lung transplantation and mycoplasma infection in rats.  
J Heart Transplant, 9: 516-524

**Yamaguchi F, Tokuda M, Hatase O & Brenner S (1996)**

Molecular cloning of the novel human G protein-coupled receptor (GPCR) gene mapped on chromosome 9.  
Biochim Biophys Res Commun, 227: 608-614

**Yamanaka M, Shegogue D, Pei H, Bu S, Bielawska A, Bielawski J, Pettus B, Hannun YA, Obeid L & Trojanowska M (2004)**

Sphingosine kinase (SPHK1) is induced by TGF- $\beta$  and mediates TIMP-1 upregulation.  
J Biol Chem, 279: 53994-54001

**Yamashita T, Wada R, Sasaki T, Deng C, Bierfreund U, Sandhoff K & Proia RL (1999)**

A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation.  
Proc Natl Acad Sci, 96: 9142-9147

**Yatomi Y, Ozaki Y, Ohmori T & Igarashi Y (2001)**

Sphingosine 1-phosphate: synthesis and release.  
Prostaglandins, 64: 107-122

**Yatomi Y, Ruan F, Ohta J, Welch RJ, Hakomori S & Igarashi Y (1995)**

Quantitative measurement of sphingosine 1-phosphate in biological samples by acylation with radioactive acetic anhydride.  
Anal Biochem, 230: 315-320

**Yatomi Y, Welch RJ & Igarashi Y (1997)**

Distribution of sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid, in rat tissues.  
FEBS Lett, 404: 173-174

**Young KW & Nahorski SR (2002)**

Sphingosine 1-phosphate: a Ca<sup>2+</sup>-release mediator in the balance.  
Cell Calcium, 32: 335-341

**Young KW, Willets JM, Parkinson MJ, Bartlett P, Spiegel S, Nahorski SR & Challiss RA (2003)**

Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent translocation of sphingosine kinase: role in plasma membrane relocation but not activation.  
Cell Calcium, 33: 119-128

**Yu W, Xu L, Martin JG & Powell WS (1995)**

Cellular infiltration and eicosanoid synthesis in brown norway rat lungs after allergen challenge.  
Am J Respir Cell Mol Biol, 13: 477-486

**Zeibecoglou K, Ying S, Meng Q, Poulter LW, Robinson DS & Kay BA (2000)**

Macrophage subpopulations and macrophage-derived cytokines in sputum of atopic and nonatopic asthmatic subjects and atopic and normal control subjects.  
J Allerg Clin Immunol, 106: 697-704

**Zhang H, Desai NN, Olivera A, Seki T, Brooker G & Spiegel S (1991)**

Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation.  
J Cell Biol, 114: 155-167

**Zhou H & Murthy KS (2003)**

Distinctive G-protein-dependent signaling in smooth muscle by sphingosine 1-phosphate receptors S1P<sub>1</sub> and S1P<sub>2</sub>  
Am J Cell Physiol, 286: 1130-1138

**Zhou J & Saba JD (1998)**

Identification of the first mammalian sphingosine phosphate lyase gene and its functional expression in yeast.  
Biochim Biophys Res Commun, 242: 502-507

## Veröffentlichung

„Das Sphingosin-1-Phosphat generierende Enzym Sphingosinkinase 1. Hinweise auf eine transiente Expression in immunkompetenten Zellen im Brown-Norway Asthramodell“

N. Isenberg, A. Lührmann\*, T. Tschernig\*, W. Kummer, R.V. Haberberger  
Institut für Anatomie und Zellbiologie; Justus-Liebig-Universität Gießen; Medizinische  
Hochschule Hannover \*

Kongressbeitrag anlässlich des Treffens der Deutschen Pulmonologischen Gesellschaft  
Sektion Zellbiologie im Oktober 2004 in Marburg

# Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Nina Isenberg

# Danksagung

Ich danke

dem Institut für Funktionelle und Angewandte Anatomie der Medizinischen Hochschule Hannover für die Bereitstellung der benötigten Tiere; insbesondere Anke Lührmann für Ihre Hilfsbereitschaft

Herrn Doktor Vollerthun für seine Hilfe als „Retter in der Not“

Herrn Professor Oehmke für die schnelle und uneigennützig Übernahm der Betreuung

Rainer Haberberger für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung während des praktischen Teils der Arbeit

Martin Bodenbenner für seinen unerschütterlichen Humor und seine Geduld bei allen kleineren und größeren Schwierigkeiten

Petra Hartmann und Silke Wiegand für die technische Unterstützung

ganz besonders meinem Bruder Kai für die professionelle Unterstützung im Umgang mit Word und Power Point und alle weiteren fundierten und wertvollen Ratschläge von Anfang bis Ende

(Vielleicht hätte ich ohne Dich einen handgeschriebenen Blätterstapel abgeben müssen!?)

und

meinen einzigartigen Eltern. Hier wäre ein kurzer Satz nicht ausreichend.



**édition scientifique**  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
ST AU FEN BER GRING 15  
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5217-X



9 78 3 8 3 5 19 5 2 1 7 1