

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I

Klinikum Großhadern

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. S. Massberg

**Die Rolle der Sphingosin-1-phosphat Lyase (S1PL) in der Migration von Lymphozyten
innerhalb lymphatischer Organe**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Johannes Beil

aus München

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Steffen Massberg
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Christian Weber Prof. Dr. Mayo Weiss
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. vet. Nicole Urtz
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. R. Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	27.07.2017

Meiner Familie

1. Einleitung	1
1.1 Das menschliche Immunsystem	1
1.1.1 Grundprinzipien des angeborenen und adaptiven Immunsystems	1
1.1.2 Die Zellen des menschlichen Immunsystems	2
1.2 Der T-Lymphozyt	4
1.2.1 Die Entwicklung von T-Lymphozyten	4
1.2.2 Das <i>homing</i> von T-Lymphozyten in sekundäre lymphatische Gewebe	4
1.2.3 Das Knochenmark als Zielgewebe des T-Zell <i>homing</i>	6
1.2.4 Die Funktion der T-Lymphozyten innerhalb des Immunsystems	6
1.3 Sphingosin-1-Phosphat (S1P)	8
1.3.1 Der Botenstoff Sphingosin-1-Phosphat und seine Funktion im Überblick	8
1.3.2 Produktion, Abbau und Transport von Sphingosin-1-Phosphat	9
1.3.3 Der Sphingosin-1-Phosphat Gradient – Hohe S1P Konzentrationen in Blut und Lymphe	12
1.3.4 Der Sphingosin -1-Phosphat Gradient – Niedrige S1P Konzentrationen in lymphatischen und nicht-lymphatischen Geweben	14
1.3.5 Sphingosin-1-Phosphat als Rezeptoragonist und <i>second messenger</i> innerhalb des Immunsystems	15
1.3.6 Die Bedeutung von Sphingosin-1-Phosphat in der Regulation der T-Lymphozyten Migration	16
1.3.7 Die Sphingosin-1-Phosphat regulierte T-Lymphozytenmigration als pharmakologisches <i>target</i>	18
1.4 Zielsetzung	20
2. Materialien und Methoden	23
2.1 Tierversuche	23
2.1.1 Haltung und Zucht	23
2.1.2 Tierstämme	23

2.1.2.1 C57BL/6	24
2.1.2.2 Das Rekombinationssystem Cre/loxP	24
2.1.2.3 Tie2Cre ^{-lox/lox}	25
2.1.2.4 Tie2Cre ⁺ x S1PL ^{flox/flox}	25
2.1.2.5 β -actinCre ⁺	25
2.1.2.6 β -actinCre ⁺ x S1PL ^{flox/flox}	26
2.1.3 Narkose	26
2.1.4 Entnahme von Lymphe	27
2.1.5 Organentnahme und Einzelzellsuspension	28
2.1.6 Kardiale Blutentnahme	29
2.1.7 Venöse Blutentnahme durch Punktion der <i>Vena facialis</i>	29
2.1.8 T-Zell Isolation mittels magnetischer Zellsortierung	30
2.1.9 T-Zellmarkierung für <i>Whole Mount Staining</i> Versuche	31
2.1.10 Schwanzveneninjektion	32
2.2 <i>Whole Mount Staining</i>	32
2.2.1 Präparation des Femurknochens	33
2.2.2 Einbettung der entnommenen Femurknochen	33
2.2.3 Anfertigung von Gefrierschnitten	34
2.2.4 Immunhistochemische Färbung des Knochens	34
2.2.5 2-Photonenmikroskopie des <i>Whole Mount</i> Präparats	35
2.3 Messung der S1P Konzentration in Plasma, Lymphe und lymphatischen Organen mittels Massenspektrometrie	36
2.4 Durchflusszytometrie	37
2.4.1 Prinzip der Durchflusszytometrie	37
2.4.2 Versuchsdurchführung	38
2.5 Statistische Versuchsauswertung	38

3. Ergebnisse	40
3.1 Einfluss der Sphingosin-1-Phosphat-Lyaseaktivität in Tie2Cre-KO Tieren auf S1P Konzentrationen im Blutplasma	40
3.2 Einfluss der Sphingosin-1-Phosphat-Lyaseaktivität in Tie2Cre-KO Tieren auf S1P Konzentrationen in der Lymphe	41
3.3 Einfluss der Sphingosin-1-Phosphat-Lyaseaktivität in Tie2Cre-KO Tieren auf S1P Konzentrationen in Lymphknoten	42
3.4 Einfluss der Sphingosin-1-Phosphat-Lyaseaktivität in Tie2Cre-KO Tieren auf S1P Konzentrationen in Knochenmarkszellen	43
3.5 Einfluss der Sphingosin-1-Phosphat-Lyaseaktivität in Tie2Cre-KO Tieren sowie β-actinCre-KO Tieren auf Leukozytenpopulationen im Blut	44
3.6 Einfluss der Sphingosin-1-Phosphat-Lyaseaktivität in Tie2Cre-KO Tieren sowie β-actinCre-KO Tieren auf Lymphozytenpopulationen im peripheren Blut.	46
3.7 Einfluss der Sphingosin-1-Phosphat-Lyaseaktivität in Tie2Cre-KO Tieren sowie β-actinCre-KO Tieren auf Lymphozytenpopulationen im Lymphknoten	48
3.8 Einfluss der Sphingosin-1-Phosphat-Lyaseaktivität in Tie2Cre-KO Tieren sowie β-actinCre-KO Tieren auf Lymphozytenpopulationen in der Lymphe	50
3.9 Einfluss der Sphingosin-1-Phosphat-Lyaseaktivität in Tie2Cre-KO Tieren sowie β-actinCre-KO Tieren auf Lymphozytenpopulationen im Knochenmark	51
3.10 Einfluss der Sphingosin-1-Phosphat-Lyaseaktivität in Tie2Cre-KO Tieren auf das <i>homing</i> von T-Lymphozyten in das Knochenmark	53

4. Diskussion	54
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	54
4.2 Die endotheliale Sphingosin-1-Phosphat-Lyaseaktivität hat keinen signifikanten Einfluss auf S1P Konzentrationen innerhalb verschiedener Gewebe	54
4.3 Sphingosin-1-Phosphat Lyase knock-out führt zu Leuko- und Lymphopenie im peripheren Blut.	56
4.4 Sphingosin-1-Phosphat Lyase <i>knock-out</i> führt zur Retention von Lymphozyten in sekundären lymphatischen Organen. Tie2Cre-KO Mäuse zeigen keine Retention von Lymphozyten in Lymphknoten.	58
4.5 Normales T-Zell <i>homing</i> in das Knochenmark in Tie2Cre-KO Tieren. β-actinCre-KO Tieren zeigen eine Retention von CD8⁺ Lymphozyten im Knochenmark.	58
5. Zusammenfassung	60
6. Abkürzungsverzeichnis	62
7. Literaturverzeichnis	64
8. Danksagung	74

1. Einleitung

1.1 Das menschliche Immunsystem

1.1.1 Grundprinzipien des angeborenen und adaptiven Immunsystems

Unser Körper hat im Laufe der Evolution ein komplexes Immunsystem entwickelt, welches in der Lage ist, sich selbst vor einer Invasion von Krankheitserregern und anderen schädlichen Substanzen zu schützen. Zur effektiven Bekämpfung der Invasoren erfüllt das Immunsystem drei Hauptaufgaben: Das schädliche Agens muss als solches erkannt, durch Effektormechanismen zerstört, und eine potenziell schädliche, überschießende Reaktion durch Immunregulation verhindert werden.¹

Unterschieden wird zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem. Das phylogenetisch enorm alte angeborene Immunsystem findet sich in nahezu jeder Pflanze und jedem Tier.² Der Mensch verfügt zudem über das adaptive Immunsystem.³

Unterteilt werden die beiden Systeme zusätzlich in einen humoralen und einen zellulären Arm.

Das angeborene Immunsystem umfasst vor allem Makrophagen, Neutrophile und Dendritische Zellen. Diese erkennen durch so genannte Pattern recognition receptors (PRRs) häufige molekulare Strukturen, sogenannte Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), auf Mikroorganismen. Durch Phagozytose werden die Invasoren zerstört, und durch Sezernierung von Zyto- und Chemokinen eine Entzündung des Gewebes hervorgerufen.¹

Auf humoraler Ebene gehört zum angeborenen Immunsystem beispielsweise das Komplementsystem, welches in der Lage ist, durch Antikörper gebundene Erreger im Blutplasma zu lysieren.¹

Das angeborene Immunsystem ist auf Grund oben genannter Mechanismen in der Lage, unmittelbar (innerhalb von Minuten) auf ein Pathogen zu reagieren, und ist somit als erste Abwehrreihe des Körpers zu verstehen. Auf Grund der relativ unspezifischen Erkennung über PRRs können Pathogene das angeborene Immunsystem aber überwinden. Zudem kann auf dieser Ebene kein immunologisches Gedächtnis ausgebildet werden.¹

Das spezifischere adaptive Immunsystem basiert auf der klonalen Selektion seiner Effektorzellen – der Lymphozyten.⁴ Aus einer einzelnen Vorläuferzelle gehen eine große Anzahl Lymphozyten hervor, wovon jeder mit einem einzigartigen, hochspezifischen Rezeptor ausgestattet ist.

Autoreaktive Lymphozyten werden durch klonale Deletion entfernt und es entsteht ein riesiges Reservoir an naiven Lymphozyten.¹

Sobald ein Antigen in Kontakt mit dem Rezeptor eines solchen naiven Lymphozyten kommt, wird der Lymphozyt aktiviert. Durch klonale Expansion entsteht eine Vielzahl von identischen Effektorzellen die das Antigen eliminieren.¹

Das adaptive Immunsystem ist somit in der Lage jedwedes Antigen zu erkennen und effektiv zu bekämpfen. Eine Antwort erfolgt allerdings auf Grund der Latenz oben genannter Prozesse unter Umständen erst nach mehreren Tagen. Nach initialem Antigenkontakt werden spezielle Gedächtniszellen rekrutiert, die ein immunologisches Gedächtnis ausbilden, und bei sekundärem Kontakt zu einer wesentlich stärkeren und schnelleren Immunantwort des Körpers führen.¹

1.1.2 Die Zellen des menschlichen Immunsystems

Die reifen Zellen des Immunsystems werden entsprechend ihrer Vorläuferzellen der lymphatischen oder myeloischen Zellreihe zugeordnet.

Zur myeloischen Reihe rechnet man Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen, sowie Megakaryozyten und Erythrozyten. Auf diese Zellpopulationen wird in dieser Arbeit nicht näher eingegangen.

Makrophagen sind die reife, gewebständige Form der im Blut zirkulierenden ebenfalls phagozytotischen Monozyten. Ihre Aufgabe besteht in der Phagozytose von Mikroorganismen, toter Zellen, Zellüberresten sowie der Induzierung von Entzündungen.¹

Zu den, im Gegensatz zum Makrophagen, relativ kurzlebigen Granulozyten werden Neutrophile, Basophile und Eosinophile gezählt, die das Blut verlassen können um in entzündetes Gewebe einzuwandern.¹

Neutrophile zerstören eindringende Mikroorganismen durch Phagozytose und sind, allein durch ihre enorme Anzahl, von entscheidender Bedeutung für das angeborene Immunsystem des Menschen.¹

Basophile und Eosinophile sind weniger häufig. Man geht davon aus, dass sie eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Parasiten spielen.¹

Mastzellen sind bekannt durch Ihre Rolle bei der Typ-1 allergischen Reaktion. Ihre Rolle bei Infektionen konnte in Modellen zur bakteriellen Peritonitis gezeigt werden^{5,6}. Außerdem scheinen sie eine Rolle bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis zu spielen.⁷

Dendritische Zellen (DZs) bilden eine entscheidende Brücke zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem. Durch Makropinozytose nehmen sie im Gewebe große Mengen an extrazellulärer Flüssigkeit und Pathogenen auf. Die DZ präsentiert dem T-Lymphozyten dann Teile der aufgenommenen Pathogene als Antigen. Der T-Lymphozyt wird dadurch aktiviert.^{1,8}

Zur lymphatischen Reihe rechnet man Natürliche Killerzellen (NKZ), B- und T-Lymphozyten.

NKZs sind in der Lage, maligne und durch Viren infiltrierte Zellen abzutöten.¹

NKZs wurden traditionell dem angeborenen Immunsystem zugerechnet. In letzter Zeit wird diese Zuordnung allerdings in Frage gestellt.⁹

B-Lymphozyten bilden zusammen mit T-Lymphozyten das Rückrad des adaptiven Immunsystems. Nach Antigenkontakt des B-Zell-Rezeptors proliferiert und differenziert der B-Lymphozyt zu sogenannten Plasmazellen. Plasmazellen produzieren Antikörper, die wiederum das entsprechende Antigen attackieren.¹

Naive CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Lymphozyten proliferieren nach Antigenkontakt zu unterschiedlichen Subtypen mit Effektorfunktion.¹

CD8⁺ zytotoxische T-Zellen töten Pathogene und durch Viren befallene Zellen. CD4⁺ T-Helferzellen wirken bei der Immunantwort unterstützend, z.B. durch Ausschüttung von Zytokinen wie TNF- α oder IL-2, was wiederum die Aktivierung und Differenzierung von Makrophagen fördert.¹

1.2 Der T-Lymphozyt

1.2.1 Die Entwicklung von T-Lymphozyten

Alle hämatopoetischen Zellen gehen aus einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle (HSZ) im Knochenmark hervor.¹⁰ Während manche Autoren eine gemeinsame lymphatische Progenitorzelle (CLP) beschreiben, die aus der HSZ hervorgeht, und sich ausschließlich zu B- und T-Lymphozyten sowie DCs und NKCs differenzieren kann, beschreiben andere Autoren eine myeloisch-lymphatische Progenitorzelle (CMLP), welche zusätzlich myeloisch differenzieren kann.¹¹⁻¹⁴

Nach der Differenzierung aus einer HSZ verlässt die T-Lymphozyten Vorläuferzelle das Knochenmark und wandert in den Thymus ein. Dort erfolgt in einer Reihe von Schritten, die Differenzierung von der unreifen $CD34^+CD38^{lo}$ Zelle zur reifen einfach-positiven $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ Zelle.^{10,15}

Die Differenzierung wird dabei durch die Wirkung bestimmter Cytokine wie IL-7 und Signalwege wie den Notch-1 Signalweg entscheidend gesteuert.^{16,17} Die unterschiedlichen Stadien der Differenzierung lassen sich anhand der Expression spezifischer Oberflächenproteine nachvollziehen.

Entscheidende Schritte auf dem Weg zum reifen T-Lymphozyten sind die Ausbildung eines T-Zell-Rezeptors durch V(D)J-Rekombination sowie die positive und negative Selektion unreifer T-Zell Vorläufer.¹

Die entscheidende Rolle der zellulären Architektur des Thymus für diese Schritte der T-Zell Entwicklung wird dadurch unterstrichen, dass eine Thymusaplasie, welche z.B. in ca. 80% der Kinder mit dem seltenen Di-George Syndrom auftritt, zu erniedrigten T-Zell Zahlen führt.¹⁸ Die Transplantation von kultiviertem, postnatalem Gewebe konnte bei einigen Patienten wiederum zu einem Anstieg der T-Zell Zahlen im peripheren Blut führen.¹⁹

1.2.2 Das *homing* von T-Lymphozyten in sekundäre lymphatische Gewebe

Nach der vollständigen Reifung verlassen naive T-Lymphozyten den Thymus und gehen in die Blutzirkulation über. Da sie erst nach DZ-vermitteltem Antigenkontakt innerhalb lymphatischer Organe die Fähigkeit erlangen ein spezifisches Antigen erfolgreich zu bekämpfen, müssen T-

Lymphozyten aktiv aus dem Blut in sekundäre lymphatische Organe (SLOs) einwandern. Dieser Prozess wird als *homing* bezeichnet.²⁰

Der kaskadenartig verlaufende Prozess des T-Zell *homings* findet in allen SLOs außer der Milz in spezialisierten postkapillären Venolen, sogenannten *high endothelial venules* (HEV) statt.²¹⁻²³

Zuerst werden hoch-stabile Verbindungen zwischen dem auf T-Lymphozyten exprimierten Zelladhäsionsmolekül L-Selektin und seinem auf HEVs exprimierten Liganden hergestellt.

In Lymphknoten (LN) bindet L-Selektin an peripheral-node addressin (PNAD). In Peyer Plaques ist zusätzlich eine Bindung eines $\alpha_4\beta_7$ Integrins an mucosal addressin-cell adhesion molecule 1 (MAdCAM1) notwendig.^{24,25}

Da diese Verbindungen den Scherkräften des vorbeiströmenden Blutes nicht dauerhaft widerstehen können, kommt es gleichzeitig zur Dissoziation von Verbindungen stromaufwärts, sowie zur Neubildung stromabwärts. Die Zelle beginnt entlang des Endothels zu Rollen.

Das Rollen wird durch Ausbildung sekundärer Verbindungen mittels Zelladhäsionsmolekülen aus der Gruppe der Integrine gestoppt. Während die oben genannten Selektine grundsätzlich aktiv sind, müssen Integrine aktiviert werden um Zelladhäsion zu vermitteln.

In den HEVs des Lymphknoten aktiviert der naive, rollende T-Lymphozyt integrin leukocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) und bindet damit an endothelial exprimiertes intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) und intercellular adhesion molecule 2 (ICAM-2).²⁶⁻³⁰

Diese Aktivierung wird durch CC-chemokine ligand 21 (CCL21) vermittelt, welches in Mäusen von Endothelzellen und fibroblastischen Retikulumzellen (FRZs) produziert wird, und an den CC-chemokine receptor 7 (CCR7) des T-Lymphozyten bindet.^{31,32} Im Menschen wird CCL21 nur von FRZs produziert.³²

Der CCR7 Ligand CC-chemokine ligand 19 (CCL19), der in Mäusen wie Menschen ebenfalls in FRZs produziert wird, trägt ebenfalls zur Integrin vermittelten Zelladhäsion bei.^{33,34}

Auf diese Reihe von Schritten folgt die Transmigration der T-Lymphozyten in den Lymphknoten. Dies kann entweder transzellulär, also durch eine Endothelzelle hindurch, oder durch interendotheliale Zwischenräume erfolgen, was als *Diapedese* bezeichnet wird.^{23,35}

1.2.3 Das Knochenmark als Zielgewebe des T-Zell *homing*

Bis vor wenigen Jahren wurde diese relativ strikte Form der „Arbeitsteilung“ zwischen primären lymphatischen Organen (Ort der Genese der T-Zellen), und sekundären lymphatischen Organen (Ort des *homing* und *priming*) allgemein akzeptiert. Es wurde davon ausgegangen, dass das einzigartige Mikromilieu der perivaskulären T-Zell-Zonen innerhalb der SLOs die Voraussetzung für eine primäre T-Zell-Antwort darstellt.³⁶

Feuerer und Kollegen konnten jedoch zeigen, dass auch das Knochenmark ein Zielgewebe des T-Zell *homing* ist. Dort ansässige DCs sind unter bestimmten Umständen in der Lage über Prozessierung und Präsentation Blut-gebundener Antigene eine primäre T-Zell-Antwort in Stellung zu bringen.³⁷

Vor allem für bestimmte Subpopulationen der T-Lymphozyten wie CD8⁺ zentrale Gedächtnis-T-Zellen (T_{CM}) scheint das Knochenmark ein wichtiges Reservoir zu sein.³⁸ Andere Subpopulationen wie die der naiven CD8⁺ T-Lymphozyten sowie der Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (T_{EM}) sind zwar im Knochenmark vorhanden, allerdings in wesentlich geringerer Menge als in SLOs bzw. Lunge, Leber oder Milz.³⁹

1.2.4 Die Funktion der T-Lymphozyten innerhalb des Immunsystems

Seine Funktion als entscheidender Effektor der adaptiven Immunantwort erlangt der naive T-Lymphozyt in den lymphatischen Organen. Nach Antigenpräsentation durch DCs wird die T-Zelle gegenüber zellbasierten Antigenen und intrazellulären Pathogenen *geprimed*.^{40,41}

Antigene gelangen über afferente Lymphbahnen in den LN. Hierbei können zwei verschiedene Wege unterschieden werden.⁴² Entweder geraten Antigene in die drainierende Lymphe und werden im LN von den DCs aufgenommen, oder sie werden noch im peripheren Gewebe von den DCs aufgebracht und konsekutiv in den drainierenden LN transportiert.²³

Der Kontakt eines DCs mit einem Antigen führt dann, unter anderem über Toll-like-Rezeptoren (TLRs), zu einer beschleunigten Antigenprozessierung und zur Präsentation des Antigenpeptids über den MHC-Klasse II Komplex.¹ Dabei sind DCs aus mesenterialen LNs und Peyer Plaques sogar in der Lage, in T-Lymphozyten die Expression spezieller darmspezifischer *Homingrezeptoren* zu induzieren, und damit der T-Zelle einen Hinweis auf die anatomische Lokalisation des Antigens zu geben.²³

Die naive T-Zelle erkennt den präsentierten Antigenkomplex über ihren T-Zell-Rezeptor (TZR), wird aber nur bei zusätzlicher Präsentation eines B7 Moleküls, welches über die Oberflächenstruktur CD28 erkannt wird, aktiviert.¹ Aktivierte, naive T-Zelle proliferieren und differenzieren IL-2 abhängig zu Effektorzellen.¹ Nun befindet sich die Effektorzelle an einem Scheideweg, da nachfolgend unterschiedliche Zytokinkombinationen eine Regulierung der Ausdifferenzierung in spezielle Effektorzellsubtypen (siehe 1.1.2) reguliert.¹

Ausdifferenzierte Effektor-T-Zellen binden ihre Ziele durch transiente, antigenunspezifische Adhäsionsmoleküle. Die Effektorfunktion wird dabei nur ausgelöst wenn über den TZR ein körperfremdes Peptid am MHC-Klasse-I-Komplex der Zielzelle erkannt wird.¹

Die unterschiedlichen Effektor-T-Lymphozyten greifen ihre Zielstruktur über verschiedene Mechanismen an. Die Kombination ausgeschütteter Zytokine, bzw. membran-assoziiierter Effektormoleküle und dem zytotoxischen Effekt der CD8⁺ Zellen bewirken den Großteil der Effektorfunktion der T-Lymphozyten.¹

CD8⁺ T-Lymphozyten speichern Zytotoxine in speziellen zytotoxischen Granula die fokussiert an der Kontaktstelle von T-Zelle und Antigen ausgeschüttet werden, und somit zur Abtötung der Zielzelle führen.

T_H1 Zellen aktivieren Makrophagen und produzieren Zytokine die den Klassenwechsel von Antikörpern bewirken.

T_H2 Zellen produzieren ebenfalls Zytokine die Klassenwechsel von Antikörpern bewirken. Diese Zytokine bewirken jedoch vor allem eine anti-parasitäre sowie allergische Antwort.

Kommt der T-Lymphozyt während seines Transits durch den LN nicht in Kontakt mit einem Antigen, verlässt er den LN durch efferente Lymphbahnen.²³ Der Mechanismus, welcher den Lymphozytenegress aus den LNs reguliert, war lange Zeit nicht geklärt. Erst mit der Entdeckung von FTY720 ergaben sich erste Hinweise hinsichtlich der Physiologie der Lymphozytenauswanderung aus den LNs. Diese werden in den folgenden Kapiteln dargelegt.

1.3 Sphingosin-1-Phosphat (S1P)

1.3.1 Der Botenstoff Sphingosin-1-Phosphat und seine Funktion im Überblick

Sphingolipide sind in allen eukaryonten Zellmembranen Bestandteil der für die Integrität der Zelle entscheidenden Lipiddoppelschicht und entstehen aus dem gemeinsamen Baustein Sphingosin.⁴³

Verstärktes wissenschaftliches Interesse an Eigenschaften und Funktion von S1P als Botenstoff entstand in den 1980er-90er Jahren, als Arbeiten den Einfluss von Sphingosin bzw. S1P auf die Proteinkinase C und den Zellzyklus zeigten.⁴⁴⁻⁴⁶

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) ist ein Lipid aus der Gruppe der Sphingolipide (s.Abb. 1). Es hat in seiner Funktion als Agonist an fünf verschiedenen G-Protein gekoppelten Rezeptoren (S1PR₁₋₅), sowie *second messenger* einen starken Einfluss auf eine Vielzahl von Prozessen wie z.B. Zellmigration, Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Koagulation, Angiogenese und Atherosklerose.^{47,48}

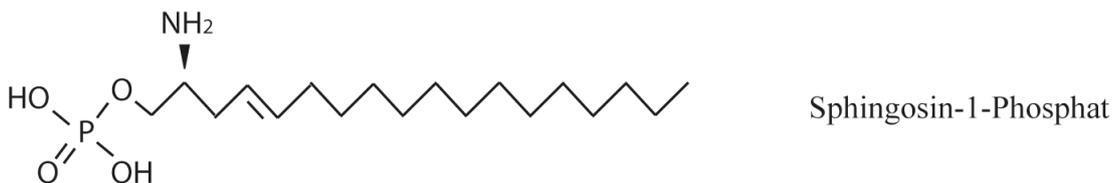


Abbildung 1: Sphingosin-1-Phosphat Strukturformel (nach Obinata und Hla 2012)

S1P kann durch zwei unterschiedliche Enzyme, sogenannte Sphingosinkinasen, intrazellulär von verschiedenen Zellpopulationen produziert werden. Abgebaut wird es in einem reversiblen Schritt durch Phosphatasen, sowie in einem irreversiblen Schritt durch die S1P-Lyase (S1PL). Durch die heterogene Aktivität dieser Enzyme in speziellen Geweben entsteht ein Gradient zwischen Geweben mit hoher S1P-Konzentration, und solchen mit niedriger S1P-Konzentration.

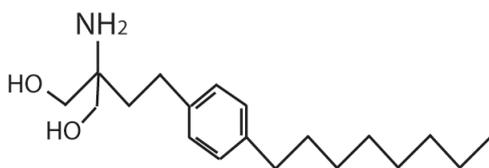
Dieser Gradient stellt für eine Reihe von (Immun-) Zellen und ihren S1P-Rezeptoren (S1PRs) einen „Handlauf“ dar, entlang dessen sie sich zwischen unterschiedlichen Geweben hin- und herbewegen können.

Da die Bindung von S1P an die verschiedenen S1PRs zur Aktivierung unterschiedlicher intrazellulärer Signalwege führt und Ihre Expression auf den Körperzellen nicht homogen ist, ist das jeweilige Expressionsmuster einer Zelle entscheidend für die schlussendliche Wirkung des S1P.

Die wohl bekannteste Funktion von S1P besteht in der Regulation des Egress von Lymphozyten aus lymphatischen Organen wie Lymphknoten und Thymus.^{49,50}

Die Erkenntnis, dass der Wirkstoff Fingolimod (s.Abb.2) über Modulation des S1P₁ Rezeptors die Auswanderung von T-Zellen aus Lymphknoten verhindert, und somit einen Einfluss auf die von S1P gesteuerte Migration und T-Zell vermittelte Zerstörung von zentralnervösen Myelinscheiden hat, führte 2011 zur Zulassung von Fingolimod für die Therapie der schubförmig-remittierenden Form der multiplen Sklerose (MS).^{51,52}

Die vorliegende Arbeit wird sich vor allem mit der S1P vermittelten Regulation der Immunzellmigration beschäftigen.



FTY720 (Fingolimod)

Abbildung 2: FTY720 Strukturformel (nach Obinata und Hla 2012)

1.3.2 Produktion, Abbau und Transport von Sphingosin-1-Phosphat

S1P entsteht hauptsächlich an subzellulären Strukturen wie der Plasmamembran, dem Golgi-Apparat oder dem Nukleus. Aus Sphingomyelin wird in einer Reihe von enzymatischen Reaktionen Sphingosin, welches wiederum durch die beiden Kinasen Sphingosinkinase 1 (SphK1) und Sphingosinkinase 2 (SphK2) zu S1P phosphoryliert wird (s.Abb. 3).^{47,53,54}

Da einige Enzyme dieser Reaktionskaskade, wie Sphingomyelinase⁵⁵ und Sphk1⁵⁴, auch in den extrazellulären Raum sezerniert werden können, ist eine S1P Produktion auch außerhalb der Zelle möglich.⁴⁷

Die Eigenschaften und Funktion der beiden Sphingosinkinasen sind weitestgehend redundant.⁴⁷ Für eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren wie platelet-derived growth factor (PDGF)⁵⁶, vascular endothelial growth factor (VEGF)⁵⁷, Insulin⁵⁸ und Insulin-like growth factor-1⁵⁹ wurde ein positiver Einfluss auf die Aktivität der Sphk1 beschrieben. Die Bedeutung dieses aktivierenden Effekts ist nicht zufriedenstellend geklärt.

Ein Abbau von S1P kann intrazellulär durch zwei unterschiedliche Arten erfolgen.

Die Familie der Lipid-Phosphat Phosphatasen (LPP1-3) auf der Zelloberfläche und die S1P spezifischen Phosphatasen SPP1 und SPP2 am Endoplasmatischen Retikulum (ER) dephosphorylieren S1P reversibel zu Sphingosin.

Die am ER lokalisierte S1PL baut S1P in einem irreversiblen Schritt zu Phosphoethanolamin und Hexadecenal ab (siehe Abb. 3).⁴⁷

Intrazellulär

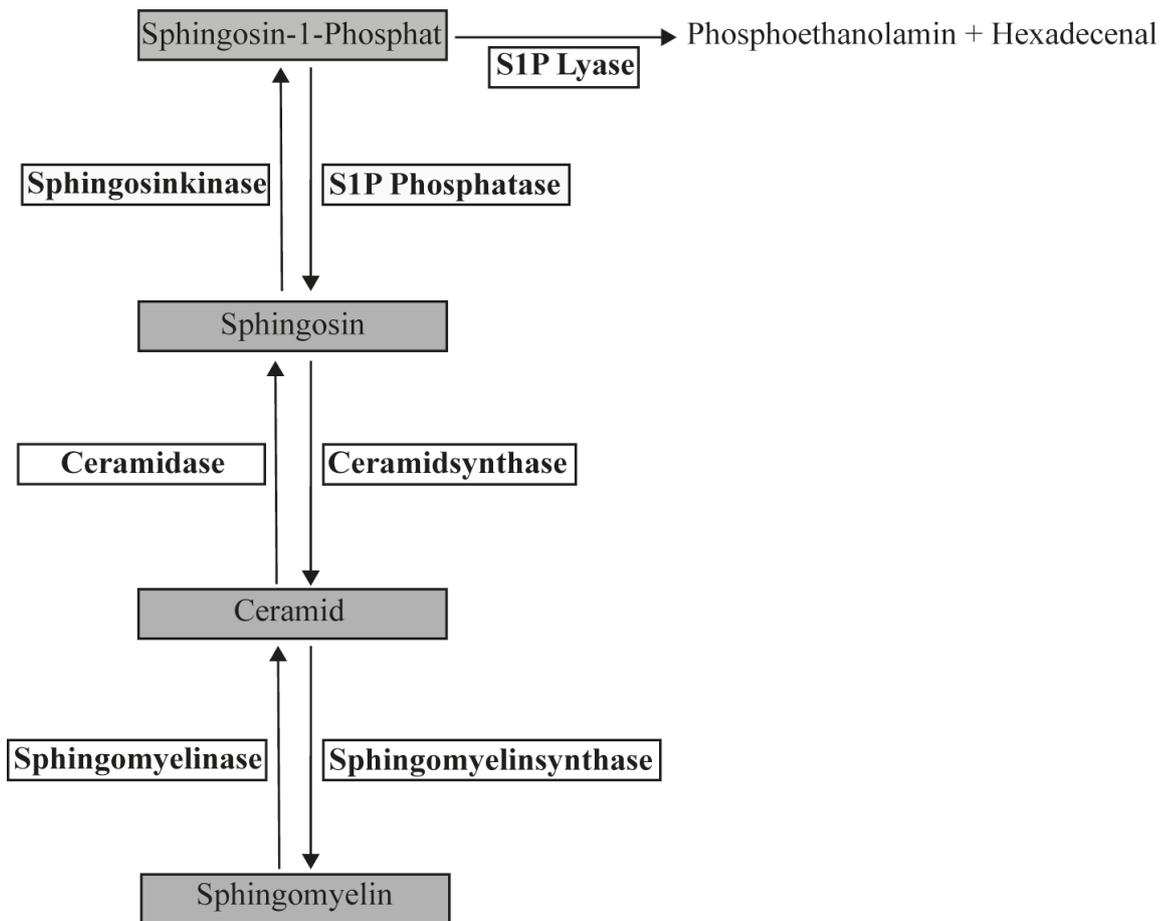


Abbildung 3: Stoffwechselweg der Sphingomyeline (nach Obinata & Hla 2012)

Um seiner Funktion als Botenstoff nachzukommen, muss das intrazellulär produzierte S1P durch Transporterproteine in der Plasmamembran nach extrazellulär exportiert werden. Einige Mitglieder der ATP-binding cassette (ABC) transporter Familie wie ABCA1⁶⁰, ABCA7⁶¹ oder ABCC1⁶² sind dazu in der Lage. Ihr tatsächlicher Beitrag zum Transport von S1P scheint aber unbedeutend zu sein.⁶³

Das Transporterprotein Spinster 2 (Spns2) wurde kürzlich im Zebrafischmodell als entscheidender S1P Transporter während der Herzentwicklung indentifiziert.⁶⁴ Experimente *in vitro* bestärken die Vermutung, dass Spns2 eine physiologische Rolle beim Transport von S1P spielt.^{47,65}

1.3.3 Der Sphingosin-1-Phosphat Gradient – Hohe S1P Konzentrationen in Blut und Lymphe

S1P ist in den unterschiedlichen Geweben unseres Körpers nicht gleichmäßig konzentriert. Es existiert ein Gradient zwischen Blut/Lymphe - wo es in Konzentrationen im μM Bereich vorliegt - und interstitieller Flüssigkeit, in der die Konzentration im nM Bereich liegt.^{66,67}

Dieser Gradient scheint durch unterschiedlich starke Aktivität sowohl der Sphingosinkinasen (SphKs), als auch der S1PL in den entsprechenden Geweben zu entstehen.

Da S1P wie andere Phospholipide amphophil ist, liegt es im Blut zu einem großen Teil gebunden an Transportvehikel wie Albumin, High Density Lipoprotein (HDL) und Low Density Lipoprotein (LDL) vor.⁴⁷

Die Halbwertszeit von an Albumin gebundenem S1P im Blutplasma beträgt allerdings nur wenige Minuten, sodass davon ausgegangen wird, dass S1P kontinuierlich produziert und ins Blut sezerniert wird.^{47,68}

Die relativ hohen S1P-Konzentrationen im Blut entstehen durch die SphK-Aktivität unterschiedlicher hämatopoetischer sowie nicht-hämatopoetischer Zellpopulationen.

Thrombozyten galten lange als Ursprung der hohen Blutplasmakonzentrationen weil sie, wahrscheinlich begünstigt durch eine fehlende S1PL-Aktivität, große Mengen an S1P produzieren, speichern und während der Blutgerinnung bzw. bei Aktivierung sezernieren können.^{66,69}

Experimente in Mäusen, in denen eine Thrombopenie entweder durch *knockout* des Transkriptionsfaktors Nuclear factor erythroid-derived 2 (NFE2), oder durch die Gabe eines monoklonalen Antikörper gegen Glykoprotein GPIba induziert wurde, konnten dies allerdings nicht bestätigen. In diesen Tieren wurden normale S1P Konzentrationen nachgewiesen.^{68,70} Aus Thrombozyten stammendes S1P scheint somit eher einen lokalen Effekt im Kontext eines akuten thrombotischen Geschehens zu haben.⁴⁷

Wir konnten anhand von SphK2^{-/-} bzw. SphK1^{-/-} *knockout* Mäusen *in vivo* zeigen, dass SphK2 die entscheidende Isoform für die S1P-Produktion innerhalb von Thrombozyten ist. Der Verlust von SphK2 hat jedoch keinen entscheidenden Effekt auf S1P-Konzentrationen im Blutplasma.

Des Weiteren hatten Obinata und Hla die Hypothese aufgestellt, dass thrombozytäres S1P einen intrinsischen Effekt auf die Funktion der Blutplättchen während der Gerinnung haben könnte.⁴⁷

Diese Hypothese konnten wir insofern bestätigen, als dass SphK2^{-/-} *knockout* Mäuse eine verminderte Aggregation *in vitro*, als auch eine geringer ausgeprägte arterielle Thrombose im Thrombosemodell *in vivo* zeigen. Einen Effekt auf die Thrombozytenadhäsion konnten wir in SphK2 *knockout* Mäusen weder *in vitro*, noch *in vivo* zeigen.⁷¹

Hanel und Kollegen zeigten, dass Erythrozyten S1P ausschütten, dieses jedoch nicht aktiv produzieren.⁷² Die Herkunft des erythrozytären S1P blieb ungeklärt.

Wir konnten zeigen, dass in Erythrozyten die SphK1 das entscheidende Isoenzym für die S1P Produktion darstellt. Sphk1^{-/-} *knockout* Mäuse zeigen signifikant erniedrigte S1P Konzentrationen im Plasma. Dies deutet darauf hin, dass Erythrozyten S1P nicht nur einlagern und transportieren, sondern auch sezernieren um den hohen S1P Spiegel im Plasma aufrechtzuerhalten.⁷¹

Neben den Daten die einen hämatopoetischen Ursprung der Blutplasma S1P Spiegel nahelegen existieren Arbeiten, welche einen zusätzlichen, nicht-hämatopoetischen Ursprung der hohen S1P Spiegel im Blutplasma beschreiben.

Venkataraman und Kollegen beobachteten, dass die Transplantation von Knochenmark aus SphK1^{-/-} SphK2^{+/-} *knockout* Tieren in bestrahlte Wildtypiere zu keiner signifikanten S1P Erniedrigung führte. Dies deutet auf einen nicht-hämatopoetischen Ursprung des S1P im Blutplasma hin. Sie konnten außerdem *in vitro* zeigen, dass vaskuläre Endothelzellen ein zusätzlicher Ursprung des S1P im Plasma sind.⁶⁸ Dabei zeigte sich, dass sich experimentelle Veränderungen der endothelialen S1PL Expression z.B. mittels *small interfering RNA* auf die S1P Sekretion auswirken, was nahelegte, dass die S1PL ein entscheidendes Enzyme der endothelialen S1P Produktion darstellt.⁶⁸

Zusammenfassend existieren scheinen Thrombozyten als Produktionsort der Plasma-S1P-Spiegel eine untergeordnete Rolle zu spielen. Rote Blutkörperchen und Endothelzellen sind Produktionsort des S1P im Blutplasma. Die SphK1^{-/-} Aktivität in Erythrozyten hat einen signifikanten Einfluss auf die Plasma-S1P-Spiegel. Zusätzlich legen *in vitro* Daten nahe, dass die

S1PL Aktivität in vaskulären Endothelzellen durch irreversiblen Abbau von S1P den S1P Spiegel im Plasma beeinflussen kann (siehe Abb.4).

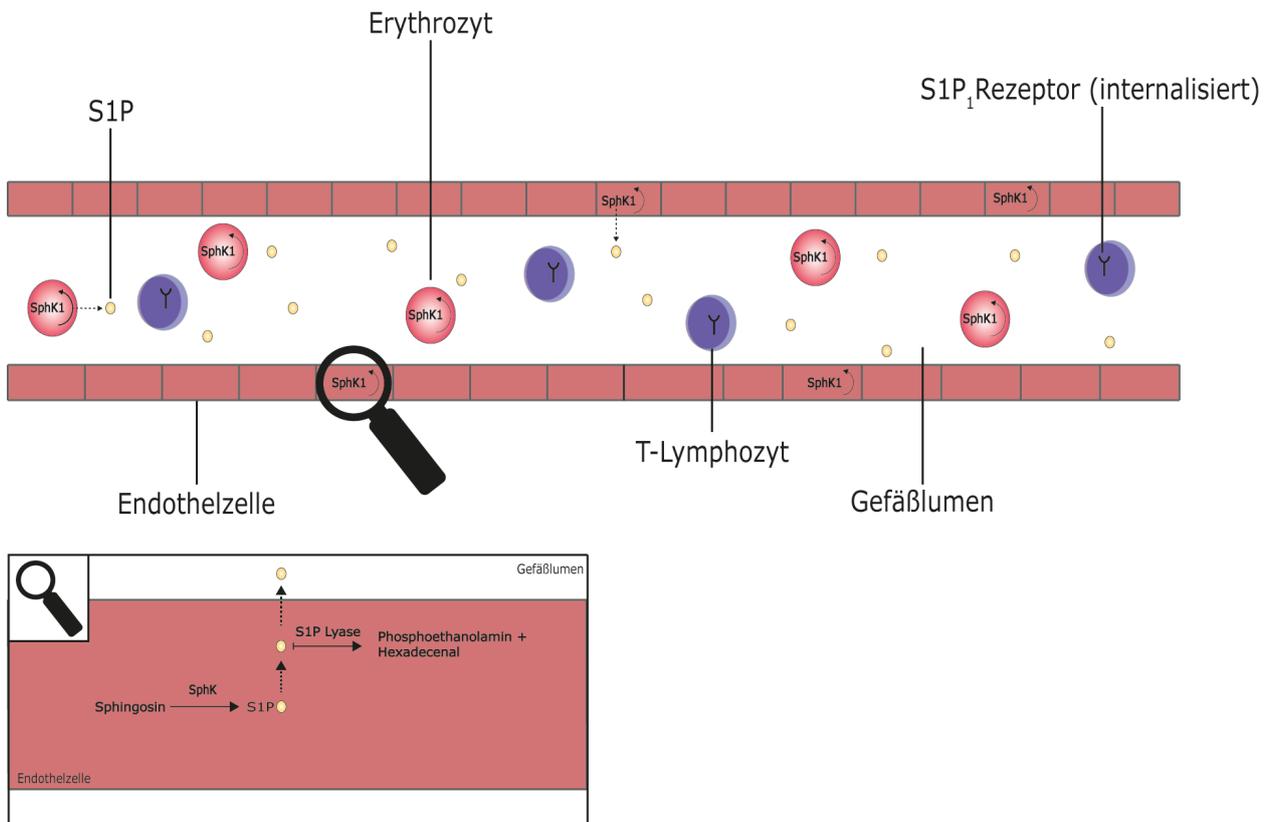


Abbildung 4: Etablierung hoher S1P Spiegel im Blutplasma. Durch die SphK1-Aktivität wird in Erythrozyten S1P produziert und mittels Spns2 Transporter in das Gefäßblumen abgegeben. Durch die S1PL-Aktivität in Endothelzellen wird die endotheliale S1P Produktion reguliert (siehe Vergrößerung).

Die relativ hohen S1P-Konzentrationen in der Lymphe sind Produkt der SphK1- und SphK2-Aktivität der lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1 (LYVE-1)⁺ Zellpopulation, die das Endothel der lymphatischen Gefäße auskleidet.⁷³

1.3.4 Der Sphingosin-1-Phosphat Gradient – Niedrige S1P Konzentrationen in lymphatischen und nicht-lymphatischen Geweben

Die relativ niedrigen S1P Konzentrationen in lymphatischen und nicht-lymphatischen Geweben wie Thymus, Lymphknoten, Milz, Lunge, Nieren, Epidermis und Kolon kommt durch die hohe S1PL-Aktivität der Zellen in diesen Geweben zustande. Dies konnte von Billich und weitere Kollegen, *in vivo* gezeigt werden.^{74,75}

1.3.5 Sphingosin-1-Phosphat als Rezeptoragonist und *second messenger* innerhalb des Immunsystems.

S1P kann als Agonist an fünf verschiedene G-Protein gekoppelte Rezeptoren binden, die als Sphingosin-1-Phosphat Rezeptoren 1-5 (S1PR₁₋₅) bezeichnet werden.

Die Expression von S1PR₁₋₃ erstreckt sich über eine Vielzahl von Geweben mit besonders starker Expression in kardiovaskulären und lymphatischen Geweben.⁴⁷ S1PR₄ und S1PR₅ sind generell weniger stark exprimiert, wobei die Expression vor allem im lymphatischen Gewebe⁷⁶ und auf glatten Muskelzellen des Respirationstrakts⁷⁷ bzw. dem zentralen Nervensystem⁷⁸ konzentriert ist.⁴⁷

Das individuelle Expressionsmuster der S1PRs auf der Zelloberfläche entscheidet über den tatsächlichen Effekt, welchen S1P auf eine bestimmte Zelle haben kann.

Während der S1PR₁ im weiteren Verlauf der Signaltransduktion ausschließlich an die G_{i/o} α -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine koppelt, koppeln S1PR₂ und S1PR₃ an G_{i/o}, G_q und G_{12/13}. S1PR₄ und S1PR₅ koppeln an die Untereinheiten G_{i/o} und G_{12/13} (siehe Tabelle 1).⁴⁷

S1P Rezeptor G-Protein Untereinheit

S1PR ₁	G _{i/o}
S1PR ₂	G _{i/o} , G _q , G _{12/13}
S1PR ₃	G _{i/o} , G _q , G _{12/13}
S1PR ₄	G _{i/o} , G _{12/13}
S1PR ₅	G _{i/o} , G _{12/13}

Tabelle 1: S1P Rezeptoren und ihre Kopplung an verschiedene G-Protein Untereinheiten

Allgemein führt die Signaltransduktion durch G_{i/o} Untereinheiten zur Aktivierung des Ras/ERK-, (proliferationsfördernd) PI3K/Akt- (apoptosehemmend) und PI3K/Rac Signalweges (migrationsfördernd), sowie zur Aktivierung der Phospholipase C.⁴⁷

Signaltransduktion durch die G_q Untereinheit aktiviert den Phospholipase C Signalweg.

Die G_{12/13} Untereinheit aktiviert Rho welches Rac und somit Migration inhibiert (siehe Tabellen 2 und 3).⁴⁷

G-Protein Untereinheit	Aktivierter Signalweg
Gi/o	Ras/ERK, PI3K/Akt, PI3K/RAC, Phospholipase C
Gq	Phospholipase C
G12/13	Rho

Tabelle 2: G-Protein Untereinheiten und die durch sie aktivierten Signalwege

Aktivierter Signalweg	Effekt auf Zielzelle
Ras/ERK	Proliferationsfördernd
PI3K/Akt	Apoptosehemmend
PI3K/RAC	Migrationsfördernd
Phospholipase C	Reduzierte cAMP Produktion
Rho	Migrationshemmend

Tabelle 3: Durch S1PR aktivierte Signalwege und ihr Effekt auf die Zielzelle

Diese Erkenntnisse verdeutlichen, wie die unterschiedliche Expression von S1P-Rezeptoren zu unterschiedlicher Signaltransduktion und entsprechend andersartigem Effekt auf die Zelle führt.

Als Beispiel sei hier der kompetitive Effekt der S1PR₁ und S1PR₂ genannt.

S1PR₁ führt zu Rac-Aktivierung und der Begünstigung von Migration⁷⁹. S1PR₂ unterdrückt die durch Rac vermittelte Migration durch Aktivierung von Rho.⁸⁰

1.3.6 Die Bedeutung von Sphingosin-1-Phosphat in der Regulation der T-Lymphozyten Migration

Seit 15 Jahren ist bekannt, dass S1P die Migration von Zellen beeinflussen kann.⁸¹ In den letzten Jahren wurde in einer Reihe von Arbeiten gezeigt, dass S1P sowohl im physiologischen, als auch pathophysiologischen Kontext die Migration von T- und B-Lymphozyten, NKZs, DZs,

Makrophagen, Neutrophilen, hämatopoetischen Progenitorzellen, Mastzellen und Osteoklasten reguliert.⁸²⁻⁸⁹

Hier soll speziell auf den Effekt von S1P auf die Migration der T-Zellen eingegangen werden.

Haben unreife T-Lymphocyten die negative Selektion innerhalb des Thymus überlebt, regulieren sie die Expression des Transkriptionsfaktors Krüppel-like-factor (KLF2) und seines Zielgens S1PR₁ herauf.⁸²

Spezielle perivaskuläre Zellen welche den Thymus umgeben sezernieren S1P, welches an den S1PR₁ der T-Lymphocyten bindet, und durch seinen pro-migratorischen Effekt zu deren Auswanderung aus dem Thymus in die Blutbahn führt. Dies geschieht im Mikromilieu der kortiko-medullären Übergangszone des Thymus.⁸²

Im Umkehrschluss entwickeln sich T-Zellen, in welchen S1PR₁ durch konditionellen *knock-out* fehlt normal, können den Thymus jedoch nicht verlassen.^{50,90} Zusätzlich scheint die S1PL-Aktivität dendritischer Zellen einen Einfluss auf den S1P Gradienten im Bereich des Thymus zu haben, und somit die Auswanderung von T-Zellen zu beeinflussen.⁹¹

Im Blut reguliert der naive T-Lymphocyte seine S1PR₁ Expression an der Zelloberfläche als Reaktion auf die hohen S1P Konzentration herunter und wandert schlussendlich durch den unter 1.2.2 beschriebenen Prozess, in den LN ein.

Wird dem T-Lymphocyten innerhalb des LNs kein Antigen durch eine Antigen präsentierende Zelle präsentiert, wird er in dem S1P niedrigen Mileau S1PR₁ re-exprimieren, und den LN nach ca. 12 Stunden verlassen.^{48,92} *Signaling* durch den S1PR₁ scheint dabei den retenierenden Effekt der CCL21-CCR7 Achse zu überwältigen.^{93,94}

Für die erfolgreiche Auswanderung von T-Zellen aus LNs wurde folgender Ablauf von Grigороva und Kollegen an Hand der 2-Photonen Mikroskopie *in vivo* postuliert:⁹⁵

T-Zellen sondieren die Oberfläche LYVE-1⁺ kortikaler Sinus des LN. Diese Sinus befinden sich in den T-Zell-Regionen, in unmittelbarer Nachbarschaft der B-Zell Follikel.

Die Sondierung erfolgt durch das Ausfahren eines Fortsatzes, durch die LYVE-1⁺ Zellen hindurch, in das Lumen des Sinus. Die T-Zelle zieht dann den Fortsatz ein, um sich entweder

von dem Sinus zu entfernen, oder durch das Endothel in das Lumen einzuwandern, was Cyster und Kollegen als „*cellular decision making*“ beschreiben.

Bei S1PR₁ defizienten T-Zellen beobachteten die Autoren den Vorgang des Sondierens ebenfalls, eine Transmigration in das Lumen erfolgte aber signifikant seltener.

Im Lumen werden die T-Zellen vom Fluss der Lymphe aufgegriffen und nach Passage der medullären Sinus in den subkapsulären Raum und das efferente Lymphgefäß gespült.

Wird der T-Lymphozyt im LN allerdings durch Bindung eines Antigens an den TCR aktiviert, führt dies zu einer vermehrten Expression von CD69, welches nach Bindung an den S1PR₁, zu Internalisation und Abbau des S1PR₁ führt.⁹⁶

Somit wird verhindert, dass der T-Lymphozyt den LN wieder verlässt, ohne zuvor auf den lokalen inflammatorischen Prozess einwirken zu können.

Um einen systemischen Effekt der T-Zelle auf das Antigen zu ermöglichen, re-exprimieren ihre Tochterzellen nach 3-4 Teilungen den S1PR₁, und können somit den LN wieder verlassen, um zum Herd der Entzündung zu wandern.^{94,96}

1.3.7 Die Sphingosin-1-Phosphat regulierte T-Lymphozytenmigration als pharmakologisches *target*

Da Sphingosin-1-Phosphat wie oben beschrieben ein potenter Regulator der T-Lymphozytenmigration ist, liegt es auf der Hand, dass eine pharmakologische Beeinflussung dieser Regulationsachse ein potentieller Angriffspunkt in der Therapie immunvermittelter Erkrankungen sein könnte.

Als erstes Pharmakon welches die S1P regulierte T-Lymphozytenmigration beeinflusst sei der Wirkstoff FTY720 genannt.

FTY720 (Fingolimod) wurde 1995 durch chemische Derivatisation aus dem natürlichen Wirkstoff Myriocin synthetisiert.⁵¹ Myriocin stammt wiederum aus dem Pilz *Isaria sinclairii*.⁹⁷ Studien am Tiermodell sowie am Menschen zeigten wenige Jahre später, dass die Gabe von FTY720 die Lymphozytenzahl im peripheren Blut verringert.^{98,99}

Damals wurde vermutet, dass FTY720 zu T-Zell Apoptose¹⁰⁰, beschleunigtem T-Zell homing^{98,101}, oder zur Inhibierung der S1PL führt.¹⁰²

FTY720, welches S1P strukturell sehr ähnlich ist, wird im Körper hauptsächlich durch die SphK2 in seine bioaktive Form – FTY720-phosphat (FTY720-P)- umgewandelt.^{103,104} FTY720-P selbst ist ähnlich wie S1P ein Agonist an S1PR_{1,3,4,5}.^{49,104}

Die Bindung von FTY720-P an S1PR₁ führt zur Internalisierung des S1PR₁, was als funktioneller Antagonismus bezeichnet wird. FTY720-P dockt zwar als Agonist am S1PR₁ an, führt aber auf lange Sicht zu dessen Internalisierung.^{51,105}

Die Gabe von FTY720 führt somit zur Internalisierung von S1PR₁. Dadurch überwiegt der retenierende Effekt der CCL21-CCR7 Achse und es kommt zur Akkumulation von T-Lymphozyten innerhalb des LN.⁵¹

Ergänzend sei noch erwähnt, dass sich der Effekt von FTY720 nicht auf alle Lymphozyten Subpopulationen homogen auswirkt. Da nur naive T-Zellen und zentrale Gedächtniszellen, jedoch nicht Effektor Gedächtniszellen CCR7 exprimieren, werden auch nur naive und zentrale Gedächtniszellen unter FTY720 Therapie im LN zurückgehalten.^{52,106,107}

Im peripheren Blut der mit FTY720 behandelten Patienten repräsentieren Effektor Gedächtniszellen nun die dominierende T-Zell Population. Diese zirkulierende Population könnte zusätzlich eine immunsuppressive Wirkung haben.¹⁰⁸

Somit wird angenommen, dass FTY720 nicht nur durch die Inkarzierung auto-reaktiver T-Zellen im LN wirkt, sondern auch durch eine Verbesserung der Funktionalität zirkulierender, regulatorischer T-Zellen.⁵²

FTY720 wurde 2011 als erstes oral verfügbares Therapeutikum zur Behandlung der MS zugelassen. Seitdem wird es als *second-line* Therapeutikum in der Behandlung der schubförmig-remittierenden Form der MS verwendet.⁵²

Die Wirksamkeit von Fingolimod wurde in zwei randomisierten, Phase 3- Doppelblindstudien untersucht. Während die FREEDOMS-Studie Fingolimod mit Placebo verglich, wurde in der TRANSFORMS-Studie Fingolimod mit *i.m.* appliziertem Interferon β 1a verglichen. Beide Studien konnten für Fingolimod eine Reduktion der auf das Jahr umgerechneten Rückfallquote, sowie einen verlangsamten Krankheitsprogress in der kranialen Magnetresonanztomografie zeigen.^{109,110}

Ein Tiermodell der Knochenmarkstransplantation zeigt die Effektivität von FTY720 hinsichtlich der Verhinderung einer *graft-versus-host disease*.¹¹¹

Auf Basis dieser Beobachtungen wurde FTY720 zuerst als mögliche Alternative zu gängigen Immunsuppressiva, wie dem ebenfalls natürlich vorkommenden Rapamycin, Ciclosporin oder Mycophenolat-Mofetil für die Prävention von Abstoßungsreaktionen bei Nierentransplantation getestet.⁵¹ Klinische Phase II und Phase III Studien konnten aber keinen gesteigerten *benefit* einer Immunsuppression mit FTY720 nach einer Nierentransplantation nachweisen.¹¹²

Ein zweiter potentieller Angriffspunkt zur pharmakologischen Beeinflussung der S1P vermittelten T-Zellmigration ist die S1P-Lyase.

Inhibition der S1P-Lyase führt zu einer Erhöhung intrazellulärer S1P Konzentrationen, was seinerseits zu einer Herunterregulation von S1PR₁ Rezeptoren auf der Zellmembran von T-Lymphozyten führen würde.⁷⁵ T-Lymphozyten werden somit in den peripheren Lymphknoten festgehalten.¹¹³

Eine Studie konnten bereits zeigen, dass am murinen Model ein induzierbarer *knock-out* durch partielle S1PL Inhibition zu einer peripheren Lymphopenie führt, was wiederum im Model der experimentellen Autoimmunenzephalomyelitis (EAE) die Einwanderung von T-Zellen in das zentrale Nervensystem signifikant vermindert, und somit zumindest temporär vor klinischen Zeichen einer Autoimmunenzephalomyelitis schützt.⁷⁴ Im Hochdurchsatz-Screening konnte zudem ein im Tierversuch oral anwendbarer und im EAE Model effektiver Inhibitor der S1PL identifiziert werden.¹¹⁴

Die pharmakologische Beeinflussung des durch den S1P Gradienten ermöglichten T-Zellegresses aus peripheren Lymphknoten, sei es durch Modulation des S1PR₁, oder durch Inhibierung der S1PL stellt somit ein schon teilweise in der Klinik etabliertes Konzept zur Behandlung immunvermittelter Erkrankungen dar, und ist auch weiterhin Gegenstand aktiver Forschung.

1.4 Zielsetzung

Aufbauend auf die einleitend zusammengefassten wissenschaftlichen Grundlagen lassen sich folgende Grundkonzepte zusammenfassen:

- 1.) Sphingosin-1-Phosphat ist ein potenter Mediator der Lymphozytenmigration und insbesondere des Lymphozytenegress aus Lymphknoten. S1P entfaltet seine Wirkung über die S1P-S1PR₁ Achse.
- 2.) Grundvoraussetzung für die S1P-S1PR₁ Achse gesteuerte Lymphozytenmigration ist ein intakter S1P Gradient zwischen Blut/Lymphe (μM) und Geweben (nM).
- 3.) Die relativ hohen S1P-Konzentrationen in der Lymphe sind Produkt der SphK1 und SphK2 Aktivität der LYVE-1⁺ Zellpopulation. Die relativ niedrigen S1P Konzentrationen in Geweben wie Lymphknoten oder Lunge entstehen durch die hohe S1PL-Aktivität der Zellen in diesen Geweben.
- 4.) Die hohen S1P Spiegel im Plasma sind nicht vollständig geklärt. Einerseits scheint die hohe Aktivität der erythrozytären SphK1 an der Aufrechterhaltung der Plasma S1P Spiegel beteiligt zu sein, andererseits gibt es Daten welche die endotheliale S1PL als Ursprung der hohen S1P Spiegel im Plasma nahelegen.
- 5.) Der Wirkstoff FTY720-P agiert am S1PR₁ als Agonist. Dies führt zur Internalisierung des S1PR₁, verhindert eine Auswanderung der Lymphozyten aus dem Lymphknoten, und wird pharmakologisch bei der Therapie der multiplen Sklerose ausgenutzt.

Ziel dieser Arbeit soll es sein, folgende Fragestellungen zu bearbeiten:

- 1.) Ist die endotheliale S1PL entscheidend für die Aufrechterhaltung des S1P Gradienten zwischen Blut/Lymphe und Geweben?
- 2.) Welche Auswirkungen haben Veränderungen der endothelialen S1PL Aktivität auf Entwicklung und Migration der T-Lymphozyten insb. bezüglich des *homing* in lymphatische Organe?
- 3.) Welche Auswirkungen haben im Vergleich dazu Veränderungen der zellunspezifischen S1PL Aktivität auf Entwicklung und Migration der T-Lymphozyten insb. bezüglich des *homing* in lymphatische Organe?

Aus internistisch/kardiologischer Sicht sind diese Fragestellungen vor allem im Hinblick auf die Entstehung der Atherosklerose und der koronarer Herzerkrankung (KHK) von Bedeutung. Arteriosklerose bzw. die KHK entsteht durch das Zusammenspiel klassischer kardiovaskulärer Risikofaktoren wie der Dyslipoproteinämie und einer Inflammation der (koronaren) Gefäßwand.¹¹⁵ An den Entzündungsprozessen sind dabei Teile des angeborenen und adaptiven Immunsystems beteiligt.¹¹⁵ T-Lymphozyten nehmen bei der Atherogenese eine Schlüsselrolle ein.¹¹⁶

Innerhalb der atherosklerotischen Plaques finden sich vor allem CD4⁺ Effektor-Gedächtnis-T-Zellen die den $\alpha\beta$ T-Zell Antigenrezeptor exprimieren; außerdem finden sich CD8⁺ Zellen.¹¹⁷ In humanen wie murinen atherosklerotischen Plaques findet eine klonale Expansion von T-Zellen statt, was darauf hindeutet, dass eine antigenspezifische Reaktion innerhalb dieser Plaques stattfindet.¹¹⁸ Werden ApoE^{-/-} Mäuse mit gleichzeitig vorliegendem schweren kombinierten Immundefekt mittels CD4⁺ T-Lymphozyten aus ApoE^{-/-} Mäusen rekonstituiert, beschleunigt sich der atherosklerotische Prozess; es findet ein T-Zell „*homing*“ in atherosklerotische Plaques statt.¹¹⁹

Besonders entscheidend für die Atherogenese ist außerdem die über Typ1-T-Helferzellen (T_{H1}) vermittelte Immunantwort mittels Interferon γ .¹²⁰⁻¹²² Regulatorische T-Zellen (T_{reg} Zellen) haben vermutlich einen protektiven Effekt.^{121,123}

Aktuelle Studien konnten zeigen, dass FTY720 eine atheroprotektive Wirkung in verschiedenen Mausmodellen zeigt. S1P *signalling* ist durch erheblichen Einfluss auf verschiedene zelluläre Komponenten des Immunsystems vermutlich bei der Pathogenese der Arteriosklerose beteiligt.¹²⁴⁻¹²⁶ Vor allem *signalling* durch S1PR₂ und S1PR₃ scheint für die Regulation inflammatorischer Prozesse im Kontext der Atherosklerose von Bedeutung zu sein; Rezeptordefizite haben einen protektiven Effekt.^{127,128}

Bot und Kollegen konnten darüber hinaus in Mäusen mit LDL-Rezeptor *knockout* und zusätzlichem Defizit hämatopoetischer S1PL eine verminderte Entwicklung atherosklerotischer Plaques beobachten.¹²⁶ Diese Beobachtung führten sie allerdings nicht nur auf den durch S1PL *knockout* gestörten S1P Gradienten mit konsekutiver Lymphozytendysfunktion zurück, sondern auch auf Beeinträchtigung der Monozytenfreisetzung und Makrophagendifferenzierung.

2. Materialien und Methoden

2.1 Tierversuche

2.1.1 Haltung und Zucht

Die Zucht erfolgte bei allen verwendeten Stämmen in polygamer Verpaarung, wobei ein bis zwei Weibchen zusammen mit einem Männchen gehalten wurden. Nach einer vierwöchigen Aufzuchtphase wurden die Weibchen erneut verpaart.

Die Tierhaltung erfolgte sowohl am Deutschen Herzzentrum München als auch am Klinikum der Universität München in einer spezifiziert pathogenfreien Haltung. Die Haltung nach Tierstamm von je zwei bis sechs Tieren erfolgte in durchsichtigen, leicht reinig- und sterilisierbaren Käfigen (Makrolonkäfig Typ II, Ehret GmbH, Emmendingen). Den Tieren standen somit min. 2-3 cm³/g Körpermasse zur Verfügung.¹²⁹ Als Einstreu wurde entkeimtes, entstaubtes Weichholzgranulat (Weichholzgranulat - Tiereinstreu „Faser“, Firma Altromin, Lage) verwendet, das sich durch besondere Saugfähigkeit und weiche Beschaffenheit auszeichnet. Zellstoff diente als Spiel- und Nestbaumaterial was zur Steigerung des Wohlbefindens der Tiere beiträgt. Als Rückzugsmöglichkeit dienten transparente Maushäuser (*Enrichment*) aus Polycarbonat (Maushaus, Ehret HmbH, Emmendingen). Das „Mikroklima“ innerhalb der Käfige wurde gemäß den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Versuchstierkunde bei einer Temperatur von 20-24°C und einer Luftfeuchtigkeit von 60-70% gehalten.¹²⁹ Die Beleuchtungsanlage wurde für die nachtaktiven, stressanfälligen Tiere auf einen geregelten zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus eingestellt. Den Tieren stand zu jeder Zeit ausreichend sterilisiertes Leitungswasser und pelletiertes, artgerechtes Futter (Futter - Nr.1324 Ratte/Maus-Haltungsdiät 10mm vierkant, Fa. Altromin, Lage) zur Verfügung.

2.1.2 Tierstämme

Für die Anfertigung dieser Dissertation wurden folgende Mausstämme verwendet:

- C57BL/6

- Tie2Cre^{-lox/lox}
- Tie2Cre⁺ x S1PL^{flox/flox}
- β -actinCre⁺
- β -actinCre⁺ x S1PL^{flox/flox}

Einer der Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob die endotheliale S1PL einen Einfluss auf den S1P Gradienten zwischen Blut/Lympe und Geweben wie z.B. den SLOs hat. Dazu wurden Tiere mit Endothelzellspezifischem *knock-out* der S1PL generiert, und mit Tieren verglichen, bei welchen ein induzierbarer ubiquitärer *knock-out* der S1PL vorliegt.

2.1.2.1 C57BL/6

Mäuse des Tierstamms C57BL/6 wurden bei Charles River (Sulzfeld, Deutschland) gekauft. Dieser Wildtypstamm ist der am häufigsten verwendete Inzuchtstamm. Durch spezielle Verpaarungsverfahren wird sichergestellt, dass jeder Stamm genetisch identisch ist, was einer erhöhten Varianz der Versuchsergebnisse vorbeugt. C57BL/6 fanden in unseren Versuchen als T-Zell Spender Verwendung.

2.1.2.2 Das Rekombinationssystem Cre/loxP

Das Rekombinationssystem Cre/loxP ermöglicht die gezielte Exzision definierter DNS Abschnitte *in vivo*. Die Rekombinase Cre (*cyclization recombination* oder *causes recombination*) des Bakteriophagen P1 exzidiert DNS, welche im Genom von zwei lox/P Basensequenzen flankiert ist, und verbindet die unterbrochene DNS Sequenz neu.^{130,131}

Soll aus einem DNS Strang ein spezifisches Gen exzidiert werden, wird die lox/P Erkennungssequenz vor und hinter dieses Gen gesetzt, was auch „*floxen*“ genannt wird. Cre erkennt die Basensequenzen und schneidet das von ihnen umgebene Gen aus dem DNS Strang. Die entfernte DNS wird an beiden Erkennungssequenzen zusammengefügt. Das exzidierte Zielgen bildet einen ringförmigen DNS Abschnitt der abgebaut wird.

Wird das Cre-Gen unter die Kontrolle eines Zell-spezifischen oder induzierbaren Promoters gestellt, kann definiert werden, in welcher Zellpopulation das gefloxt Gen exzidiert wird bzw. zu welchem Zeitpunkt.¹³²

2.1.2.3 Tie2Cre^{-lox/lox}

Bei diesem Tierstamm steht die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Promoters für das murine Tie2 Gen. Tie2 kodiert einen Angiopoetin Rezeptor aus der Familie der Tyrosinkinasen, und wird in allen murinen Endothelzellen exprimiert.¹³³⁻¹³⁶ Das transgene Tie2Cre Mausmodell eignet sich somit für ein Endothelzell-spezifisches Zelltargeting und wurde 2001 von Kisanuki und Kollegen erstmals beschrieben.¹³⁷ B6.Cg-Tg(Tek-cre)1Ywa/J transgene Tiere wurden von Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) erworben.

Diese Cre-negativen Tiere wurden in den Experimenten als Kontrollgruppe zu Cre-positiven Tieren benutzt, und sollen nachfolgend als „Tie2Cre-Wildtyp“ Stamm („Tie2Cre-WT“) bezeichnet werden.

2.1.2.4 Tie2Cre⁺ x S1PL^{flox/flox}

Dieser Tierstamm diene als Versuchsgruppe und soll nachfolgend als „Tie2Cre-Knock-out“ Stamm („Tie2Cre-KO“) bezeichnet werden. Mäuse des Genotyps Tie2Cre⁺ wurden mit Tieren mit *gefloxter* S1PL verpaart. Aus der Verpaarung gingen Tiere mit konditionalem *knock-out* der S1PL in vaskulären Endothelzellen hervor.

2.1.2.5 β -actinCre⁺

Verglichen wurden die Ergebnisse aus oben genannten Tieren mit Endothelzellspezifischem S1PL *knock-out*, mit Ergebnissen aus Tieren mit induzierbarem ubiquitären *knock-out*.

Versuchstiere mit angeborenem ubiquitären *knock-out* der S1PL zeigen neben anderen Defekten eine ausgeprägte Fehlfunktion des angeborenen Immunsystems, und sterben nach wenigen Wochen.¹³⁸ Diese Tiere eignen sich somit nicht für die Beantwortung unserer Fragestellung. Um dieses Problem zu umgehen, kreuzten Billich und Kollegen Mäuse mit gefloxter S1PL mit einer B6.C actb- CreERT2 *knock-in* Mauslinie.⁷⁴ Hierbei entsteht eine Mauslinie, bei welcher die Cre-

Rekombinase unter der Kontrolle des ubiquitär vorkommenden β -actin steht und mit dem Transkriptionsfaktor des Östrogenrezeptors fusioniert ist. Dadurch besteht die Möglichkeit, den S1PL *knock-out* durch Gabe von Tamoxifen an einem beliebigen Zeitpunkt zu induzieren.¹³⁹ Cre-positive, ungefloxt Tiere dienten in den Experimenten als Kontrollgruppe zu Cre-positiven, gefloxt Tieren und wurden uns von Andreas Billich (Novartis Institute of Biomedical Research, Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Nachfolgend soll dieser Tierstamm als β -actinCre-Wildtyp Stamm („ β -actinCre-WT⁺“) bezeichnet werden.

2.1.2.6 β -actinCre⁺ x S1PL^{flox/flox}

Dieser Tierstamm diene als Versuchsgruppe. Acht Wochen nach Geburt wurde der S1PL *knock-out* durch die Cre-Rekombinase durch 5-tägige Applikation von Tamoxifen (Tamoxifen, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten) induziert. Nach weiteren 14 Tagen ist von einer 60- bis 90%igen Reduktion der S1PL mRNA und Enzymaktivität auszugehen.⁷⁴ Wir führten unsere Versuche 21 Tage nach Start der Tamoxifengabe durch. Nachfolgend soll dieser Tierstamm als β -actinCre-knock-out-Stamm („ β -actinCre-KO⁻“) bezeichnet werden.

2.1.3 Narkose

Zur Entnahme von Blut und Lymphe sowie soliden Organen wurden die Versuchstiere in Allgemeinanästhesie versetzt.

Die Narkose der Versuchstiere wurde mit Isofluran (Isofluran Forene®, Abbot, Wiesbaden) eingeleitet. Dazu wurden die Tiere in eine Narkosekammer aus Plexiglas gesetzt und diese an den Isofluranverdampfer angeschlossen. In der Narkosekammer inhalierten die Tiere ein 3%iges Isofluran-Sauerstoffgemisch. Nach Erlöschen der Stellreflexe wurden die Tiere aus der Kammer entnommen und eine Tripelnarkose (siehe Tabelle 4) intraperitoneal appliziert. Anschließend verblieben die Tiere bis zum Erlöschen des Zwischenzehenreflexes in einer Einschlafbox. Durch die Applikation der Tripelnarkose wurden die Tiere in das chirurgische Toleranzstadium gebracht.

Die Tripelnarkose ist eine Kombination der Wirkstoffe Medetomidin (Dorbenevet 1mg/ml, Pfizer GmbH, Karlsruhe), Fentanyl (Fentanyl 0,5 mg Rotexmedica GmbH, Trittau) und

Midazolam (Midazolam-hameln 5 mg/ml, Hameln Pharmaceuticals GmbH, Hameln). Da keines dieser Pharmaka alleine alle Kriterien der Allgemeinanästhesie (Hypnose, Analgesie und Relaxation) erfüllt, werden sie kombiniert. Ein Vorteil dieses Narkoseverfahrens ist die vollständige Antagonisierbarkeit. Ausserdem kann durch Ausnutzung der additiven Effekte der Einzelsubstanzen eine Reduktion der Einzeldosen der jeweiligen Substanzen erfolgen, was ein vermindertes Nebenwirkungsrisiko bedingt.

Die Tiere erhielten eine Mischung aus 0,5mg/kg Medetomidin, 0,05 mg/kg Fentanyl und 5,0 mg/kg Midazolam. Mit steriler Natriumchloridlösung (NaCl 0,9%, B. Braun, Melsungen) wurde diese Triplenarkose auf ein Gesamtvolumen von 0,35ml verdünnt. Dies führte nach ca. 10-20 Minuten zum Eintritt das gewünschten chirurgischen Toleranzstadiums III2.

Wirkstoff	Konzentration	Dosierung
Medetomidin	1 mg/ml	0,5 mg/kg
Fentanyl	0,5 mg/ml	0,05 mg/kg
Midazolam	5 mg/ml	5,0 mg/kg

Tabelle 4: Dosierung der Triplenarkose bei der Maus

2.1.4 Entnahme von Lymphe

Die Entnahme von Lymphe erfolgte wie in der Literatur beschrieben durch Kannülierung des *Ductus thoracicus* (DT) in Allgemeinanästhesie.^{89,140}

Zur verbesserten Darstellung des *Ductus thoracicus* wurde dem Versuchstier dreißig Minuten vor der Narkose und Operation über eine Sonde 200µl eines handelsüblichen Olivenöls p.o. appliziert. Die Aufnahme, der im Olivenöl enthaltenen Trigylzeride im Dünndarm führt zu einer gesteigerten Sezernierung von Chylomikronen in die Lymphbahn. Der DT erscheint dadurch weißlich und ist makroskopisch *in situ* besser darstellbar.

Das Tier wurde nun auf seine rechte Seite gelegt, und das Abdomen durch eine linksseitige subkostale Inzision eröffnet. Wundhaken (Wundhaken nach Volkmann, Medicon eG, Tutlingen) wurden verwendet um kranial Milz, Leber und Magen sowie kaudal linke Niere und Nebenniere zu mobilisieren. Danach wurde das *Peritoneum parietale* unterhalb des Diaphragmas inzidiert.

Die Aorta wurde von umgebendem Fettgewebe abpräpariert, *Cysterna chyli* und der weißlich erscheinende DT freigelegt. Auch der DT wurde von umgebendem Gewebe so weit wie möglich abpräpariert. Zur Kannülierung des DT wurde ein Katheter aus einem Stück Katheterschlauch (Portex, Polythene Tubing, 0,28 mm ID 0,61 mm OD, Smiths Medical International, Hythe, USA) und einer Kanüle (B. Braun Sterican Kanülen 30G, B. Braun, Melsungen) hergestellt. Der Konus der Kanüle wird von der Nadel getrennt, und die Nadel in eines der Enden des Katheterschlauches gesteckt.

Ein Teil des Katheters wurde von intraabdominell am kostovertebralen Übergang direkt unterhalb der letzten Rippe durch die lumbale Muskulatur geführt und externalisiert. Das externalisierte Ende wurde mittels einer weiteren 30G Kanüle an eine Feindosierungsspritze (Omnifix®-H Feindosierungsspritze, B. Braun, Melsungen) angeschlossen. In der Feindosierungsspritze waren 8,6µl EDTA (UltraPure™ 0,5M EDTA, Life Technologies, Darmstadt) als Antikoagulanzen vorgelegt.

Nun wurde mittels eines Saugtupfers (Sugi® Saugtupfer, Kettenbach, Eschenburg) an der Aorta gezogen, was den DT unter Zug setzte. Der DT wurde dann proximal der transversal verlaufenden *Arteria lumbalis* mittels einer Mikroschere (Micro 2000 standard, Medicon eG, Tutlingen) eröffnet, das intraabdominelle Ende des Katheters in den DT bzw. die *Cysterna chyli* eingeführt, und die Lymphe durch den Kapillareffekt des Katheters angesaugt.

2.1.5 Organentnahme und Einzelzellsuspension

Nach der Entnahme von Lymphe wurden die Mäuse noch unter bestehender Anästhesie durch zervikale Dislokation getötet. Es wurden inguinale Lymphknoten präpariert und entnommen. Danach wurde der Femurknochen der Maus präpariert und entnommen. Die inguinalen Lymphknoten wurden mittels eines Spritzenstempels (2ml Spritze, B. Braun, Melsungen) durch ein Zellsieb (Cell Strainer 70µM, Nylon, BD Biosciences, Heidelberg) in ein 50ml Falconröhrchen (50ml BD Falcontube, BD Biosciences, Heidelberg) gedrückt, und mit MACS Puffer (PBS, pH 7,2; Biochrom AG, Berlin + BSA, 0,5%; Biochrom AG, Berlin + 2mM EDTA; Life Technologies, Darmstadt) in Suspension gebracht.

Zur Präparation der Knochenmarkszellen wurden die Epiphysen der Femurknochen mit einer Schere abgetrennt und der Knochen mit Hilfe des MACS Puffer und einer Spritze mit

aufgesetzter Kanüle (26G) über einem 50ml Falconröhrchen mit angebrachtem Zellsieb (70 μ M) perfundiert. Die Knochenmarkszellen wurden ebenfalls mit MACS Puffer in Suspension gebracht.

Die verschiedenen Falconröhrchen, wurden dann mit einer Zentrifuge (Centrifuge 5804, Eppendorf, Hamburg) bei 527g für 5min pelletiert und in ca. 1ml MACS Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension der Milz wurde in 1ml MACS Puffer resuspendiert.

Die auf diese Art und Weise gewonnenen Einzelzellsuspensionen wurden hierauf mittels Durchflusszytometrie analysiert.

2.1.6 Kardiale Blutentnahme

Die kardiale Punktion ermöglicht die Abnahme eines großen Blutvolumens. Dazu wurde der Brustkorb, des sich in Rückenlage und in tiefer Narkose (siehe 2.2.2.) befindenden Versuchstiers, mit Sprühalkohol desinfiziert und die Haut über dem Sternum von kaudal nach kranial durchtrennt. Die kardiale Punktion erfolgte mittels einer 2ml Spritze (2ml Spritze, B.Braun, Melsungen) mit aufgesteckter 27G Kanüle. Dazu wurde im zweiten Interkostalraum links, im Winkel von ca. 40° von links kranial nach rechts kaudal punktiert und das Blut durch langsame Aspiration entnommen. In der Spritze waren 8,6 μ l EDTA (UltraPure™ 0,5M EDTA, Life Technologies, Darmstadt) als Antikoagulanzen vorgelegt.

Die Bestimmung der Zellzahl hämatopoetischer Zellreihen im durch kardiale Blutentnahme gewonnenen Blut erfolgte mechanisiert in einem Hämatologie-Analyzer (ABX Micros ES 60, Horiba, Kyoto, Japan).

2.1.7 Venöse Blutentnahme durch Punktion der *Vena facialis*

Durch Punktion der *Vena facialis* konnten dem Versuchstier Blutvolumina von circa 100 μ l entnommen werden. Der Vorteil lag darin, dass diese Technik keinen Terminalversuch darstellt. 30 Minuten vor dem Eingriff wurde der Maus 0,1 mg/kg Buprenorphin subkutan injiziert.

Danach wurde die Maus durch Isoflurannarkose betäubt.

Die *Vena facialis* wurde durch Fixierung der Nackenhaut am Halsbereich und das Zurückziehen der Gesichtshaut mit zwei Fingern gestaut. 3-5 mm dorsokaudal des Haarwirbels am Unterkiefer

wurde die Vena facialis mit einer sterilen Lanzette (FEATHER BLOOD LANCET, pfm, Köln) punktiert. Die austretenden Blutropfen wurden mit einem EDTA-Röhrchen (Microvette, Sarstedt, Nümbrecht) aufgefangen. Anschließend wurde die Einstichstelle eine Minute mit einem Wattestäbchen komprimiert.

2.1.8 T-Zell Isolation mittels magnetischer Zellsortierung

Für die unter 2.3 beschriebenen Versuche mittels 2-Photonenmikroskopie wurden wie unter 2.2.5 beschrieben Knochenmark, sowie zusätzlich zu den inguinalen Lymphknoten, axilläre, zervikale, popliteale und mesenteriale Lymphknoten entnommen, und in eine Einzelzellsuspension gebracht, und die T-Zellen mittels *negativ sort* isoliert werden. Ebenso wurde die Milz entnommen und wie unter 2.1.5 in Einzelzellsuspension gebracht. Bei einem hohen Gehalt an Erythrozyten in der Milz erfolgte eine Erythrozytenlyse mittels 7ml einfachem Ammoniumchlorids (Ammoniumchlorid 10x pH 7,2: 20g NH₄Cl [1,5M] + 2,5g KHCO₃ [0,1M] + 5ml EDTA [0,5M] alle Inhaltsstoffe von Sigma-Aldrich, Steinheim) für 10min auf Eis. Danach wurde die Suspension mit MACS-Puffer auf 50ml aufgefüllt, erneut pelletiert und mit 10ml MACS resuspendiert. Hierauf erfolgte die T-Zell-Isolation mittels Isolierung (*negative sort*).

Magnetic activated cell sorting (MACS®) mit Hilfe des *Pan T Cell Isolation Kit II* (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) ermöglicht die Isolation von T-Lymphozyten durch Markierung und anschließender Depletion sämtlicher anderer sich in der Suspension befindender Zellpopulationen wie z.B. B-Lymphozyten, NK Zellen, Granulozyten oder Erythrozyten. Dies wird auch als *negativ sort* bezeichnet. Hier wurden alle Non-T-Lymphozyten innerhalb der Zellsuspension mittels eines biotin konjugierten Antikörpercocktails und einem MicroBeads konjugiertem monoklonalen anti-biotin Antikörper indirekt magnetisch markiert. Die Depletion aller Non-T-Lymphozyten innerhalb der Zellsuspension erfolgt anschließend durch Einbringen des Trägergefäßes in das Magnetfeld eines starken Permanentmagneten. Dadurch werden alle mit MicroBeads markierten Zellen reteniert (*negativ sort*).

Gemäß dem Protokoll der Firma Miltenyi Biotech wurden Zellen aus Milz sowie inguinalen, mesenterialen, poplitealen und zervikalen Lymphknoten entnommen, die Zellzahl in der Zählkammer (Zählkammer Neubauer improved, BRAND GmbH + CO KG, Wertheim, Deutschland) ermittelt, und die Zellen dann mit 40µl/10⁷ Zellen MACS Puffer suspendiert.

Darauf folgte die Hinzugabe von $10\mu\text{l}/10^7$ Zellen Biotin-Antikörper Cocktails und eine 10-minütige Inkubation bei $2-8^\circ\text{C}$. Im nächsten Schritt wurden zuerst $30\mu\text{l}/10^7$ Zellen des MACS Puffer hinzugegeben und direkt im Anschluss $20\mu\text{l}/10^7$ Zellen der Anti-Biotin MicroBeads. Erneut wurde im Kühlschrank für 15 Minuten inkubiert.

Im Anschluss wurden die Zellen mit $2\text{ml MACS Puffer}/10^7$ Zellen durch Zentrifugation bei $300g$ für 10 Minuten gewaschen, der Überstand abgesaugt, das Zellpellet mit 2ml MACS Puffer resuspendiert, in ein FACS Röhrchen gegeben und dieses für 10min in einen Permanentmagneten (Permanentmagnet: EasySep™ Magnet, Stemcell Technologies SARL, Köln) gestellt. Danach wurde die Zellsuspension unter Belassung des FACS Röhrchen innerhalb des Magnets in ein zweites FACS Röhrchen gegossen. Die markierten Non-T-Lymphozyten wurden somit durch die magnetische Wirkung des Permanentmagneten im ersten FACS Röhrchen zurückgehalten während die nun T-Zell reiche Suspension in dem zweite FACS Röhrchen aufgefangen wurde. Anschließend erfolgte eine erneute Zellzahlbestimmung im Hämatologie-Analyzer.

2.1.9 T-Zellmarkierung für *Whole Mount Staining*

Die Markierung der isolierten T-Lymphozyten erfolgte mittels des Fluoreszenzfarbstoffes 5-(and-6)-(((4-chloromethyl)benzoyl)amino)tetramethylrhodamine, CMTMR (CellTracker™ Orange CMTMR Dye, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland). Dieser orange Farbstoff mit einem Anregungs-/Emissionsspektrum von $541/565\text{ nm}$ diffundiert ungehindert durch Zellmembranen in die zu markierenden Zellen. Im Zytosol erfolgt die Transformation des CMTMR in ein die Zellmembran nicht länger durchdringendes Reaktionsprodukt. CMTMR hat zudem den Vorteil, dass es über mehrere Folgegenerationen innerhalb der Tochterzellen weiter einbehalten wird, und für ca. 72 Stunden fluoresziert.

Die Färbung erfolgte unter einer Sterilbank (HERAsafe HS 12, Thermo Electron Corporation, Waltham). $1\mu\text{l}$ der 10mM Gebrauchslösung wurde auf 1ml der T-Zellsuspension gegeben und für 25min bei 37°C und $5\% \text{CO}_2$ im Inkubator inkubiert (Modell CB 60, Binder GmbH, Tuttlingen). Es erfolgte die Zentrifugation bei $527g$ für 5 Minuten. Das Zellpellet wurde dann in $4\text{ml RPMI} + 10\% \text{FBS}$ resuspendiert und erneut wie oben beschrieben abzentrifugiert. Es folgte ein Waschschrift mit 3ml NaCl ($\text{NaCl } 0,9\%$, B. Braun, Melsungen) und die erneute Zentrifugation. Im letzten Schritt wurde das Zellpellet in $250\mu\text{l NaCl}$ aufgenommen. Daraus

wurden zur erneuten Zellzahlbestimmung 10µl entnommen, mit 90µl NaCl 1:10 verdünnt, und die Zellzahl im Cellcounter (ABX Micros ES 60, Horiba, Kyoto) bestimmt.

2.1.10 Schwanzveneninjektion

Um die isolierten und gefärbten T-Lymphozyten einer Versuchsm Maus zu injizieren wurde auf die Methodik der Schwanzveneninjektion zurückgegriffen. Prinzipiell kann hierbei jegliche Substanz durch Katheterisierung der beiden lateral verlaufenden Schwanzvenen (*Venae coccygea lateralis*) i.v. appliziert werden. Dazu wurde ein Katheter aus zwei Kanülen (30G, BD Mikrolance, Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA) und einem ca. 10 cm langen Polyethylenschlauch (Portex, Polythene Tubing, 0,28 mm ID 0,61 mm OD, Smiths Medical International, Hythe, USA) hergestellt. Von einer der Kanülen wurde der Konus entfernt, und die Nadel auf ein Ende des Polyethylenschlauchs gesteckt. Auf das andere Ende wurde die zweite Kanüle gesteckt. Nun wurde eine 1ml Spritze (B. Braun, Melsungen) aufgesteckt, und der Katheter mit NaCl gespült.

Zur Injektion wird die Maus in einer Fixationsvorrichtung (Restrainer für Maus, GT-Labortechnik, Arnstein) platziert bei welcher der Schwanz frei zugänglich zum liegen kommt. Der Schwanz wird nun an der Basis mit Zeige- und Mittelfinger gefasst und die Vene gestaut. Die Injektionsstelle wird mit Octeniderm® (Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt) desinfiziert und der Katheter mittels eines Nadelhalters platziert. Nun kann die gewünschte Substanz injiziert werden.

2.2. Whole Mount Staining

In dieser Versuchsreihe wurde dem Versuchstier CMTMR gefärbten T-Lymphozyten aus C57BL/6 Tieren durch Schwanzveneninjektion gespritzt. Wir möchten analysieren, inwiefern diese T-Lymphozyten nach Schwanzveneninjektion im Versuchstier in das Knochenmark einwandern können. Dazu sollen nach erfolgreicher Schwanzveneninjektion ganze Femurknochen entnommen und geschnitten werden. Anschließend soll durch immunhistochemische Färbung die intramedullären Blutgefäße mit einem Antikörper gegen VE-Cadherin (CD144 Antikörper) sichtbar gemacht werden. Analysiert werden sollen diese angefertigten Schnitte des Femurknochens mittels 2-Photonenmikroskopie.

Diese Technik ermöglicht eine dreidimensionale Darstellung von Strukturen wie Gefäßen und Zellen, direkt im Knochenmark.

2.2.1 Präparation des Femurknochens

Zwei Stunden nach i.v. Injektion der T-Lymphozyten in das Versuchstier wurde das Versuchstier wie unter 2.1.3 mittels Isofluran narkotisiert. Nach dem Erlöschen der Stellreflexe wurde das Tier aus der Narkosekammer genommen. Die Tötung des Tiers erfolgte durch Inhalation von purem Isofluran wobei der Kopf des Tiers in ein mit Isofluran gefülltes Falconröhrchen gelegt wurde.

Es folgte die mediane Sternotomie in Rückenlage, sowie Rippenteilresektion zur Freilegung des Herzens. Der rechte Herzvorhof wurde eröffnet und das Tier durch Injektion von 3ml NaCl in den linken Ventrikel vollständig entblutet. Im Anschluss erfolgte ein Fixationsschritt bei welchem 3ml 4%ige Paraformaldehydlösung (Microcos GmbH, Garching) ebenfalls linksventrikulär injiziert wurde. Danach wurden die beiden Femurknochen entnommen und von umgebenden Muskel- und Bindegewebe freipräpariert.

2.2.2 Einbettung der entnommenen Femurknochen

Im ersten Schritt der Aufbereitung der entnommenen Knochen für das nachfolgende *Whole Mount Staining* wurden die entnommenen Femora zur Fixation 30min in ein Eppendorfhütchen mit 4% Paraformaldehyd gegeben. Zur Protektion der Knochen vor Gefrierschäden wurden die Femora nachfolgend zuerst für zwei Stunden in einer 15%igen und danach über Nacht bei 4°C in einer 30%igen Sukroselösung inkubiert.

In Vorbereitung der Einbettung wurden die Knochen jeweils einzeln in einem Cryomold® Einbettschälchen (Tissue-Tek® Cryomold® Standard, Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande) mit Einbettmedium (Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound, Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande) bedeckt. Zur Einbettung selbst wurde ein 500ml Becherglas (Duran® Becherglas 500ml, DURAN Group GmbH, Wertheim/Main) mit iso-Pentane (iso-Pentane, VWR Chemicals, Ismaning) befüllt, der Glasbecher in einem schalenförmiges Aluminiumgefäß (Dewargefäß in Schalenform Typ Sch-Cal, KGW Isotherm, Karlsruhe) gegeben und das Iso-Pentan dort im Kältebad mittels flüssigem Stickstoff auf -20° heruntergekühlt. Die Einbettschälchen wurden für 3min in das gekühlte Iso-Pentan gegeben.

Abschließend wurden die Einbetttschälchen für weitere 20min bei -80°C im Gefrierschrank eingebettet.

2.2.3 Anfertigung von Gefrierschnitten

Der Femurknochen wurde nach der Einbettung im Gefrierschritt aus dem Einbetttschälchen genommen und mit dem Kryotom (CryoStar™ NX50, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten) in koronarer Schnitfführung ein Frontalschnitt des ganzen Knochen angefertigt. Durch diese Wahl der Schnitfführung sollte gewährleistet werden, dass ein möglichst großer Teil der Knochenmarkshöhle entlang des Knochens eröffnet wird.

2.2.4 Immunhistochemische Färbung des Knochens

Der geschnittene Knochen wurde aus dem Einbettmedium herausgelöst und in ein Eppendorfhütchen gegeben.

Zur Verhinderung einer unspezifischen Bindung des Fc-Anteils des Antikörpers erfolgt die Inkubierung der Knochen im Eppendorfhütchen mittels 1ml 10%igem Ziegenserums (10% Normal Goat Serum, Life Technologies, Frederick, U.S.A.) über 2 Stunden im Kühlschrank. Danach wurde der Knochen aus dem Eppendorfhütchen entnommen, und in ein PBS gefülltes Becherglas (Duran® Becherglas 10ml, DURAN Group GmbH, Wertheim/Main) gegeben; durch Schwenken des Glases wurde überschüssiges Ziegenserum vom Knochen gewaschen. Im Anschluss erfolgt die Färbung. Der Knochen wurde in ein Eppendorfhütchen gegeben in welchem der Primärantikörper (Anti Mouse CD144, eBioscience, San Diego, U.S.A) in einem Verhältnis von 1:100 mit PBS verdünnt vorliegt. Die Inkubation erfolgt über Nacht im Kühlschrank.

Im nächsten Schritt wurde erneut mit PBS gewaschen und der Alexa Fluor gekoppelte Zweitantikörper aufgetragen. Der Zweitantikörper (Alexa Fluor 488 goat anti-rat IgG, Life Technologies, Carlsbad, U.S.A) wird ebenfalls im Verhältnis 1:100 wie oben beschrieben im Eppendorfhütchen aufgetragen. Es erfolgte die Inkubation für 2 Stunden im Kühlschrank.

2.2.5 2-Photonenmikroskopie des *Whole Mount* Präparats

Ein 2-Photonenmikroskop ist ein spezielles Lichtmikroskop aus der Gruppe der Laser-Scanning-Mikroskope, welches eine Kombination aus Multiphotonentechnik und Intravitalmikroskopie darstellt. Es ermöglicht die 3D *in vivo* Darstellung diverser Gewebe über einen längeren Zeitraum von bis zu mehreren Stunden. Prinzipiell ähnelt seine Funktionsweise der eines konvokalen Laser-Scanning-Mikroskops. Auch die konvokale Mikroskopie erlaubt die serielle Aquisition optischer Schnitte entlang der z-Achse mit ansteigender Eindringtiefe, und ermöglicht somit eine spätere 3D Rekonstruktion des untersuchten Präparateabschnitts am Computer.¹⁴¹ Durch Streustrahlung, welche den Fokus des Laserlichts, sowie das vom Gewebe emittierte Licht abschwächt wird die Eindringtiefe im Gewebe limitiert. Dies ist insbesondere der Fall, wenn über einen längeren Zeitraum gemessen wird.¹⁴¹ Die hohe Phototoxizität und Fotobleichen angrenzenden Gewebes ist eine weitere Limitation.¹⁴¹

Sowohl bei der 2-Photonenmikroskopie, als auch bei der konvokalen Mikroskopie, wird das Phänomen der Fluoreszenz zur Darstellung unterschiedlicher Gewebe/Zellpopulationen ausgenutzt. Ganz allgemein wird bei der Fluoreszenzmikroskopie ein Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) mittels einer Lichtquelle (üblicherweise ein Laser) einer bestimmten Wellenlänge erregt. Das Fluorochrom nimmt dabei Energie der von der Lichtquelle emittierten Photonen auf, und wird wenige Nanosekunden später einen Teil dieser aufgenommenen Energie als Photon re-emittieren.¹⁴¹ Dieses abgestrahlte Licht kann dann untersucht werden. Da die Energie eines Photons reziprok proportional zu seiner Wellenlänge ist, hat bei der konventionellen Fluoreszenzanregung mittels nur eines Photons das emittierte Photon eine längere Wellenlänge, und somit weniger Energie, als das anregende Photon.¹⁴¹

Bei der 2-Photonenmikroskopie kommt ein Puls laser zum Einsatz, der hochfrequente, hochenergetische Impulse mit Frequenzen im picosekunden Bereich bei gleichzeitig niedriger durchschnittlicher Gesamtlaserenergie erzeugt. Somit lässt sich durch Fokussierung im Objektiv nahezu ausschließlich im Brennpunkt eine hohe Energiedichte erzielen. Durch die fast gleichzeitige Absorption mehrerer Photonen, welche durch den gepulsten Laser entsendet werden, kann die notwendige Anregungsenergie auf zwei langwellige, und somit weniger energiereiche Photonen verteilt werden.

Durch die energieärmere Anregung wird die Phototoxizität verringert; die Bündelung im Brennpunkt verhindert ausgeprägtes Fotobleichen in anliegenden Bereichen der Probe. Durch die geringe Streustrahlung ist im Gegensatz zur konvokalen Mikroskopie keine Lochblende

notwendig; Schnittbilder des Gewebes mit hohem Kontrast und hoher Auflösung können mit hoher Eindringtiefe (bis zu 1000 μ M) *in vivo* angefertigt werden. Ein weiterer nützlicher Nebeneffekt ist die Frequenzverdopplung des eingestrahnten Lichts (*second harmonic generation*). Streuung von Photonen wird an Strukturproteinen reflektiert und diese dadurch zur Darstellung gebracht.

Das in dieser vorliegenden Arbeit verwendete 2-Photonenmikroskop (LaVision Biotech, Bielefeld) besteht aus einem Ti:Sa (Titan:Saphir) Laser (MaiTai, Spectra Physics, Darmstadt), der das Wellenlängenspektrum von 700-1000 nm abdeckt. Mit einem sogenannten optisch-parametrischen Oszillator (OPO) kann die Anregungswellenlänge im Infrarotbereich (1100-1600nm) erweitert werden. Dies ermöglicht die gleichzeitige Darstellung von Fluorophoren mit weitgehend unterschiedlichen Anregungs- und Emissions-Spektren.

Bei einer Anregungswellenlänge von 800nm wurden 552x552 μ m bzw. 533x533 μ m große Bildausschnitte mit einer Pixelzahl von 515x515 bzw. 512x512 gewählt.

2.3 Messung der S1P Konzentration in Plasma, Lymphe und lymphatischen Organen Massenspektrometrie

Das mittels kardialer Punktion gewonnene Vollblut wurde durch 15 minütige Zentrifugation mit 1500g bei 4°C und Abnahme des Überstandes gewonnen.

Die Konzentration von S1P in Plasma, Lymphe, Lymphknoten und Knochenmark wurde mittels High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) und anschließender Tandem-Massenspektrometrie bestimmt.¹⁴² Als interne Kontrolle der Messungen wurde C17-S1P verwendet. Zuerst erfolgte die Extraktion der Lipide innerhalb der Probe mittels Chloroform/Methanol bei saurem pH. Die gewonnenen Extrakte wurden für 20min bei 40°C in Pyridin mit Acetanhydrid acetyliert.¹⁴³ Die Lösungsmittel wurden verdampft und die Proben in Methanol sowie 2%iger Ameisensäure gelöst. Danach erfolgte unter einer Flussrate von 0,5ml/min bei 40°C die Injektion der Probe in eine Eclipse XDB C₈ Säule. Es folgte eine Gradiententrennung, wobei die Konzentration von Eluent B gegenüber Eluent A im Verlauf von 70 auf 100% gesteigert wurde. Die Detektion erfolgte mittels "Negative Ion Electrosprayionization Liquid Chromatography with Mass Spectroscopy" (LC-MS/MS) unter Verwendung eines API 4000 QTrap Instruments.¹⁴³ Die optimale Kollisionsenergie des derivatisierten S1P war -28V, des C17-S1Ps -26V. Es wurden jeweils die Übergänge im Bereich

der Massen-Ladungs-Verhältnisse m/z 462/402 (S1P) und m/z 448/388 (C17-S1P) mittels „Multiple Reaction Monitorings“ (MRM) beobachtet.

Die Bestimmung der S1P Konzentrationen erfolgte in Kooperation mit Christian Beerli, am Novartis Institutes of Biomedical Research in Basel (Schweiz).

2.4 Durchflusszytometrie

2.4.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, insb. das Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS), ist ein in Grundlagenforschung und Medizin verbreitetes Verfahren zur semiquantitativen Charakterisierung von Zellpopulationen primär hinsichtlich ihrer Größe und Granularität. Zellen werden in Einzelzellsuspension vorbereitet, und die zu untersuchende Subpopulation mittels Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Antikörper gegen Oberflächenantigene markiert. Die Zellsuspension wird vom Zytometer aufgenommen und die Zellen einzeln und nacheinander in einem laminaren Probenstrom an einem Laser vorbeigeleitet. Das vom Laser ausgesandte monochromatische Licht trifft in der Messküvette auf die (ggf. markierten) Zellen und wird beim Auftreffen gestreut bzw. absorbiert. Strahlen welche nach vorne abgelenkt werden, werden als Vorwärtsstreulicht bzw. Forwardscatter (FSC) bezeichnet. Die Menge des FSC korreliert mit der relativen Größe der gemessenen Zelle. Strahlen welche im 90°- Winkel abgestrahlt werden bezeichnet man als Seitwärtsstreulicht bzw. Sidescatter (SSC). Sie korrelieren mit der Zellgranularität.

Sind die Zellen mittels eines fluoreszenzgekoppelten Antikörpers markiert, wird das monochromatische Licht durch das Fluorochrom absorbiert und Fluoreszenzlicht emittiert. Das optische System des Durchflusszytometers, bestehend aus einer Reihe von Linsen, Spiegeln und Filtern, trennt das emittierte Licht anhand seiner Wellenlänge und führt es zu unterschiedlichen Detektoren. Dies ermöglicht die gleichzeitige Analyse unterschiedlicher Fluorochrome.

Da sich die emittierten Wellenlängen eines Fluorochroms über einen weiten Wellenlängenbereich erstrecken, kommt es vor, dass sich die Wellenlängenbereiche zweier Farbstoffe überlappen. Dadurch wird die Fluoreszenz eines Farbstoffes durch den „falschen“ Detektor gemessen was zu falsch positiven Messungen führt. Dies muss durch Kompensation korrigiert werden. Hierzu werden Einzelfärbungen jedes Farbstoffes angelegt. Wird nun

emittiertes Licht eines einzelnen Fluorochroms durch einen nicht dafür zuständigen Detektor registriert, wird dies durch mathematische Subtraktion kompensiert. Die errechnete Kompensation wird auf alle Mehrfachfärbungen angewandt.¹⁴⁴

2.4.2 Versuchsdurchführung

Für die FACS-Analyse wurden ein spezieller FACS-Puffer (PBS, pH 7,2; Biochrom AG, Berlin + 2mM EDTA; Life Technologies, Darmstadt + 5% FBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten) hergestellt.

Tabelle 5 gibt einen Überblick über die verwendeten fluoreszenzkonjugierten Antikörper.

Antikörper	Fluoreszenzfarbstoff	Klon	Hersteller
CD4	FITC	RM4-5	Biolegend, San Diego, Kalifornien, U.S.A.
CD8	APC	53-6.7	Biolegend, San Diego, Kalifornien, U.S.A.
CD19	PE	1D3	eBioscience, Santa Clara, Kalifornien, U.S.A.

Tabelle 5: Verwendete fluoreszenzkonjugierte Antikörper

90µl der Einzelzellsuspension im FACS-Puffer wurden in einem FACS Röhrchen zu 10µl einer 1:10 Verdünnung des entsprechenden fluoreszenzmarkierten Farbstoffes gegeben und für 20 Minuten auf Eis im Kühlschrank inkubiert. Danach wurde in einem Waschschrift das FACS-Röhrchen mit FACS-Puffer aufgefüllt und für 5min bei 4°C und 300g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet mit 500µl des FACS Puffers resuspendiert. In einer Zählkammer nach Neubauer wurde der Zellgehalt der Suspension bestimmt. Anschließend erfolgt die Analyse mittels Durchflusszytometrie.

2.5 Statistische Versuchsauswertung

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche erfolgte mit der Statistiksoftware *SigmaPlot* von *Systat Software*. Für die Analyse der Versuchsergebnisse wurden die Versuchsgruppen mit dem *students* t-Test verglichen. Waren die Einzelergebnisse innerhalb der zu vergleichenden Gruppen nicht normalverteilt, wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet. Die Abweichung wird durch die Standardabweichung angegeben. In den Abbildungen sind signifikante Unterschiede, die einem p-Wert ($p < 0,05$, $p <$

0,01 und $p < 0,001$ entsprechen (*, ** und ***) gekennzeichnet; nicht signifikante Unterschiede sind als ns gekennzeichnet. Die Abbildungen wurden mittels *Adobe Illustrator* von *Adobe Systems* bearbeitet.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss der Sphingosin-1-Phosphat-Lyaseaktivität in Tie2Cre-KO Tieren auf die S1P Konzentrationen im Blutplasma

Neben der erythrozytären SphK1 Aktivität, deren *knock-out in vivo* zu signifikant erniedrigten S1P Konzentrationen im Blutplasma führt, hat auch die endotheliale S1PL Aktivität *in vitro* einen signifikanten Einfluss auf die Homöostase der Plasma S1P Konzentrationen, und damit auf die Aufrechterhaltung des S1P Gradienten.^{68,71}

Diese Arbeit beschäftigt sich unter anderem mit der Frage, ob die endotheliale S1PL Aktivität auch *in vivo* einen Einfluss auf die Plasma-S1P-Spiegel hat.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde Blutplasma aus Tie2Cre-KO sowie Tie2Cre-WT Tieren gewonnen und die entsprechenden Plasma-S1P-Spiegel mittels High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) mit anschließender Tandem-Massenspektrometrie analysiert. Tie2Cre-KO Tiere zeigen dabei eine ca. 1,5-fache Erhöhung der Plasma-S1P-Spiegel. Ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu Kontrolltieren besteht nicht.

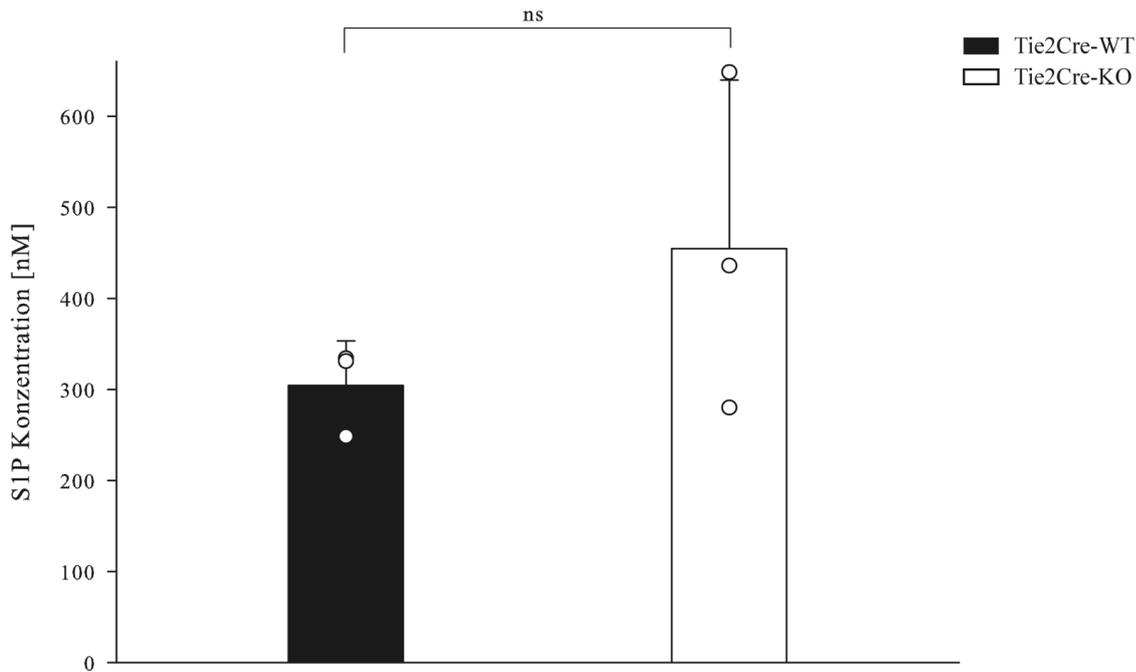


Abbildung 5: S1P-Plasmaspiegel in Tie2Cre-KO Tieren.

Die Analyse der Blutplasmen mittels Massenspektrometrie zeigt eine nicht signifikante Erhöhung der Plasma-S1P-Spiegel in Tie2Cre-KO Tieren (schwarz: Tie2Cre-WT, weiß: Tie2Cre-KO). Dargestellt sind Einzelwerte und der Standardfehler unabhängiger Experimente. n=3; ns=nicht signifikant.

3.2. Einfluss der Sphingosin-1-Phosphat-Lyaseaktivität in Tie2Cre-KO Tieren auf S1P Konzentrationen in der Lymphe

Die Aktivitäten der SphK1 und SphK2 in LYVE-1⁺ lymphatischen Endothelzellen halten die hohen S1P Spiegel in lymphatischen Gefäßen aufrecht.⁷³ Um zu ermitteln, ob ein Tie2Cre spezifischer *knock-out* der S1PL die S1P Konzentration in der Lymphe verändert, wurde aus Tie2Cre-KO Tieren Lymphe entnommen und diese mittels High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) und anschließender Tandem-Massenspektrometrie bestimmt. Tie2Cre-KO Tiere zeigen im Vergleich zur Kontrollgruppe ca. eine Verdoppelung der gemessenen S1P Konzentration in der Lymphe. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant.

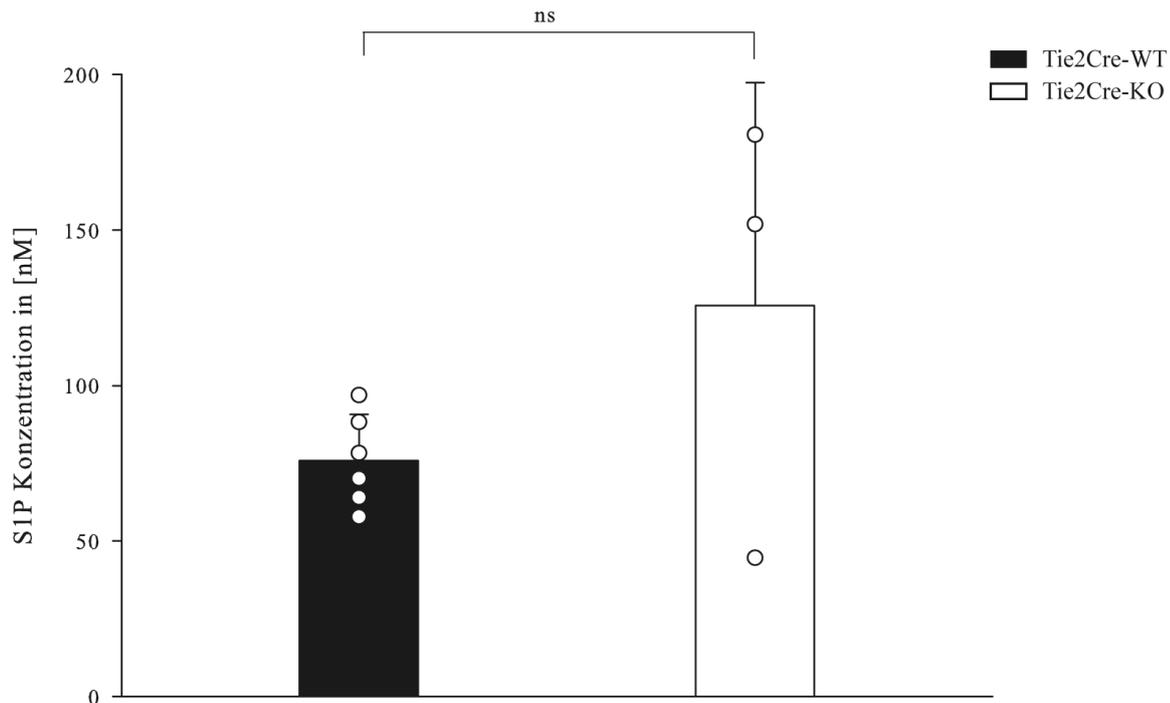


Abbildung 6: S1P Spiegel in der Lymphe von Tie2Cre-KO Tieren.

Die Analyse der Blutplasmen mittels Massenspektrometrie zeigt eine nicht signifikante Erhöhung der Lymphe-S1P-Spiegel in Tie2Cre-KO Tieren (schwarz: Tie2Cre-WT, weiß: Tie2Cre-KO). Dargestellt sind Einzelwerte und der Standardfehler unabhängiger Experimente.

n-Zahlen in der Tie2Cre-WT Gruppe: n = 6

n-Zahlen in der Tie2Cre-KO Gruppe: n=3

ns=nicht signifikant.

3.3 Einfluss der Sphingosin-1-Phosphat-Lyaseaktivität auf S1P Konzentrationen in Lymphknoten von Tie2Cre-KO Tieren

Der S1P Gradient zwischen Blut/Lymphe und SLOs wie den Lymphknoten wird durch die S1PL-Aktivität der SLOs aufrecht erhalten.⁷⁵ Somit stellte sich uns die Frage, in wie fern die S1P Konzentrationen im Lymphknoten durch unser transgenes Tie2Cre Mausmodell beeinflusst werden. Dazu wurden Tie2Cre-KO Tieren mesenteriale Lymphknoten entnommen und mittels massenspektrometrischen Verfahren analysiert.

Hier sehen wir eine massive Erhöhung der S1P Konzentration innerhalb der Lymphknoten in Tie2Cre-KO Tieren. Dieser Trend ist jedoch, auf Grund der ausgeprägten Streuung der Werte in der Tie2Cre-KO Gruppe nicht signifikant.

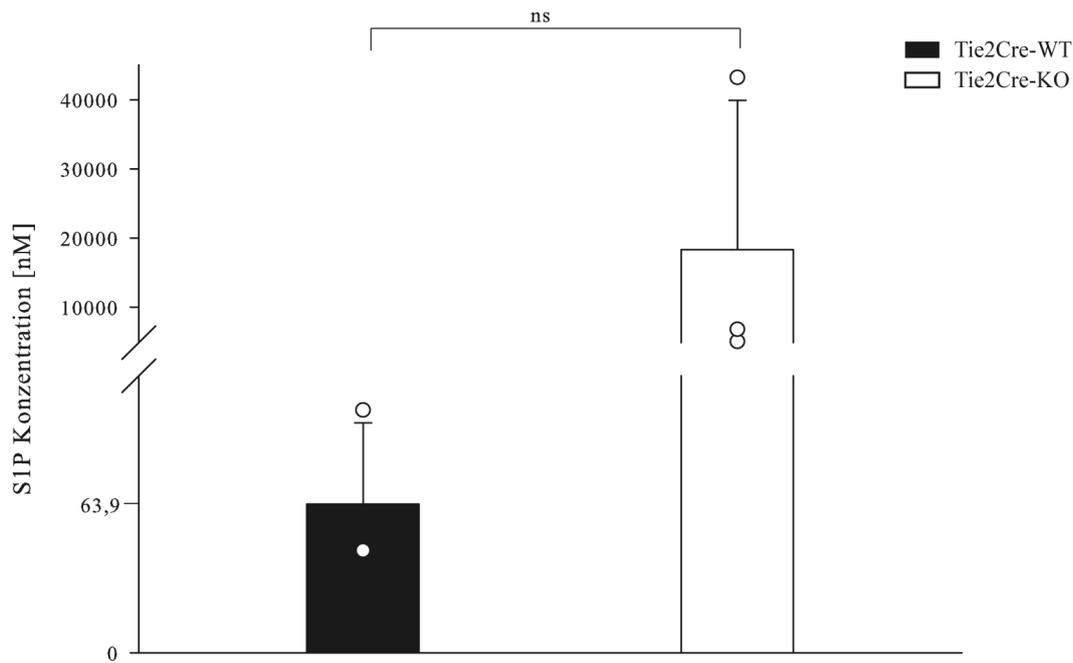


Abbildung 7: S1P-Spiegel in Lymphknoten von Tie2Cre-KO Tieren.

Die Analyse von Lymphknoten mittels Massenspektrometrie zeigt eine nicht signifikante Erhöhung der S1P-Spiegel in Lymphknoten in Tie2Cre-KO Tieren (schwarz: Tie2Cre-WT, weiß: Tie2Cre-KO). Dargestellt sind Einzelwerte und der Standardfehler unabhängiger Experimente. n=3; ns=nicht signifikant.

3.4 Einfluss der Sphingosin-1-Phosphat-Lyaseaktivität auf S1P

Konzentrationen in Knochenmarkszellen von Tie2Cre-KO Tieren

In einer weiteren Versuchsreihe wollten wir klären, ob sich in unserem Tie2Cre Modell auch eine Veränderung der S1P Aktivität in Knochenmarkszellen nachweisen lässt. Hierzu wurde den Versuchstieren (Tie2Cre-KO) das Knochenmark entnommen, und mit kombinierter HPLC und Massenspektrometrie auf seinen S1P Gehalt analysiert.

Hier sehen wir in den KO-Tieren eine Erhöhung der intrazellulären S1P Konzentration. Auch dieser Trend ist jedoch auf Grund der Streuung der Einzelwerte in der Versuchsgruppe nicht signifikant.

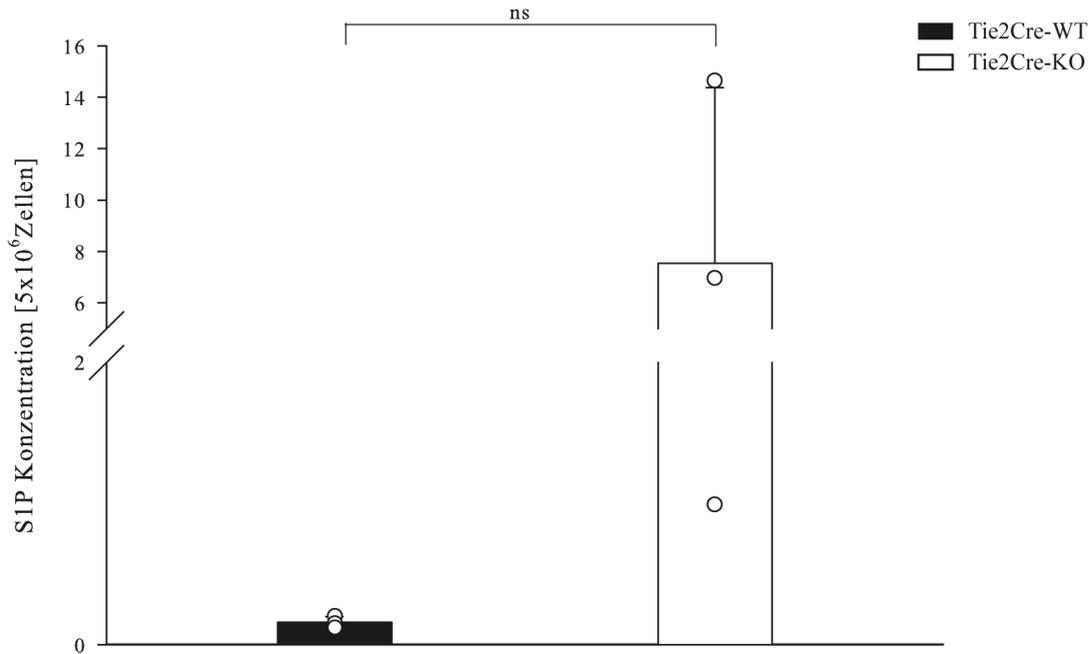


Abbildung 8: S1P-Spiegel in Knochenmarkszellen von Tie2Cre-KO Tieren.

Die Analyse der S1P-Spiegel in Knochenmarkszellen mittels Massenspektrometrie zeigt eine nicht signifikante Erhöhung der S1P-Spiegel in Knochenmarkszellen in Tie2Cre-KO Tieren (schwarz: Tie2Cre-WT, weiß: Tie2Cre-KO).

Dargestellt sind Einzelwerte und der Standardfehler unabhängiger Experimente. n=3; ns=nicht signifikant.

3.5 Einfluss der Sphingosin-1-Phosphat-Lyaseaktivität in Tie2Cre-KO sowie β -actinCre-KO Tieren auf Leukozytenpopulationen im Blut

Obwohl die oben dargestellten Ergebnisse hinsichtlich der S1P Konzentrationen in Plasma, Lymphe, Lymphknoten und Knochenmark keinen signifikanten Unterschied in Tie2Cre-KO Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten, wollten wir, angesichts des sich abzeichnenden Trends, eine evtl. vorliegende Auswirkung der reduzierten S1PL Aktivität in Tie2⁺ Zellpopulationen auf Leukozyten- und Lymphozytenpopulationen im peripheren Blut analysieren.

Dazu wurde dem KO-Stamm mittels venöser Blutentnahme Blut aus der *V. facialis* entnommen. Die Blutanalyse erfolgte mechanisiert. Zusätzlich wurden dieselben Versuche auf einem β -actinCre Hintergrund durchgeführt.

Tie2Cre-KO Tiere zeigten eine signifikante Verminderung sowohl der Leukozyten als auch der Lymphozyten im peripheren Blut. Zum Vergleich zeigten Mäuse mit induzierbarem S1PL Defekt (β -actinCre-KO) - wie bereits bekannt - eine Verminderung der Lymphozyten.⁷⁴

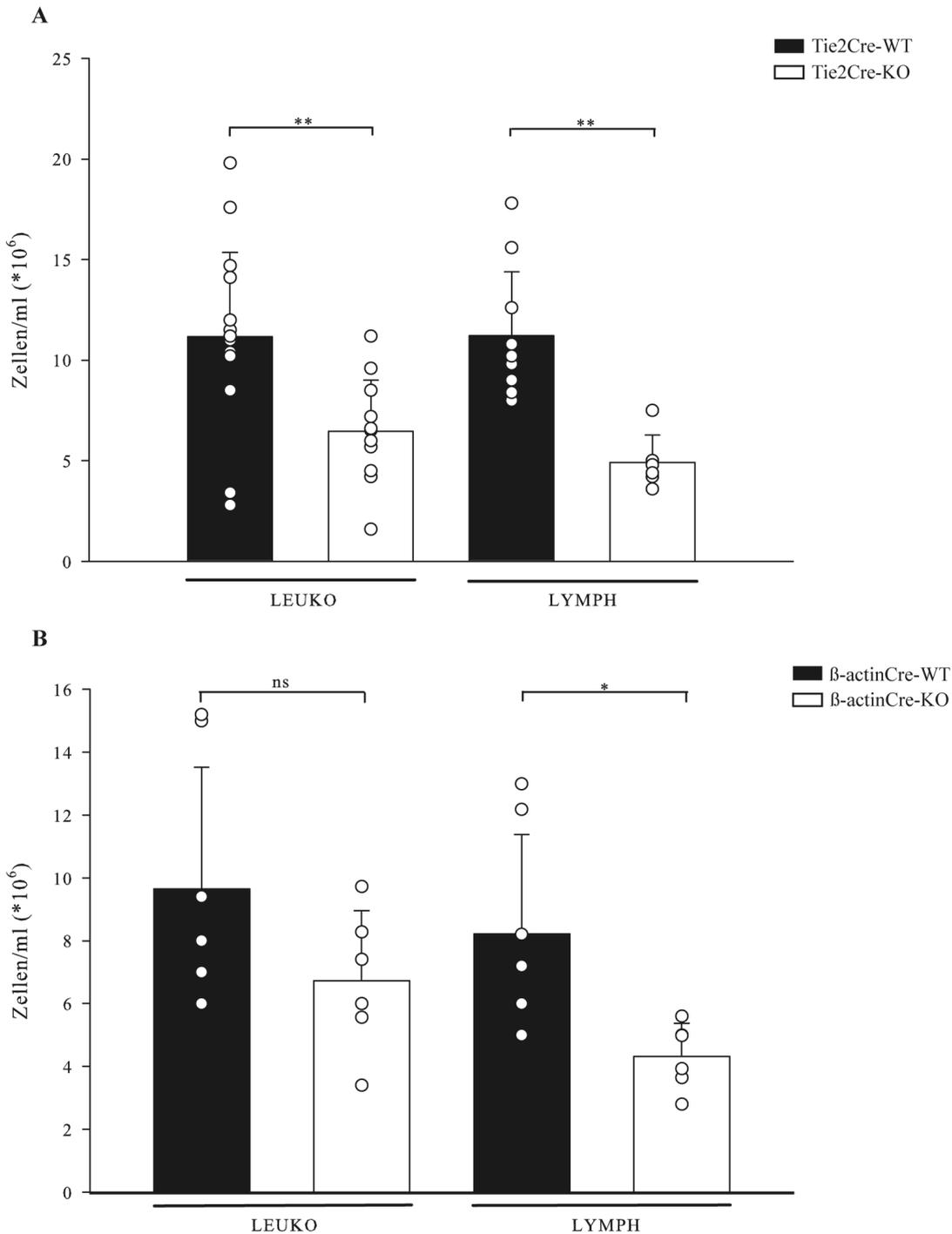


Abbildung 9: Zellzahlen im peripheren Blut von Tie2Cre-KO Mäusen sowie von β-actinCre-KO Tieren

A: Tie2Cre-KO Tiere haben reduzierte absolute Leukozyten- (LEUKO) und Lymphozytenzahlen (LYMPH) im peripheren Blut (schwarz: Tie2Cre-WT, weiß: Tie2Cre-KO).

n-Zahlen in der Leukozytengruppe: n = 17 (Tie2Cre-WT), n = 12 (Tie2Cre-KO)

n-Zahlen in der Lymphozytengruppe: n = 13 (Tie2Cre-WT), n = 6 (Tie2Cre-KO)

B: β-actinCre-KO Tiere haben reduzierte Lymphozytenzahlen im peripheren Blut (schwarz: β-actinCre-WT, weiß: β-actinCre-KO)

n-Zahlen in der Leukozytengruppe: n = 7 (β-actinCre-WT), n = 6 (β-actinCre-KO)

n-Zahlen in der Lymphozytengruppe: n = 7 (β-actinCre-WT), n = 6 (β-actinCre-KO)

Dargestellt sind Einzelwerte und der Standardfehler unabhängiger Experimente

ns bezeichnet nicht signifikant, * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

3.6 Einfluss der Sphingosin-1-Phosphat-Lyaseaktivität in Tie2Cre-KO sowie β -actinCre-KO Tieren auf T-Lymphozytenpopulationen im peripheren Blut.

Um zu evaluieren, welche T-Lymphozytensubpopulationen bei Tie2Cre-KO bzw. β -actinCre-KO Tieren im peripheren Blut vermindert sind wurden dieses mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Tie2Cre-KO Tiere zeigten eine hochsignifikante Reduktion $CD4^+$ und $CD8^+$ Lymphozytenzahlen im Blut. Wir sehen keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich $Gr1^+$ neutrophiler Zellen im Blut in Tie2Cre-KO Tieren.

Zum Vergleich zeigten β -actinCre-KO Mäuse - wie bereits publiziert - eine Verminderung der $CD4^+$ und $CD8^+$ Lymphozyten.⁷⁴

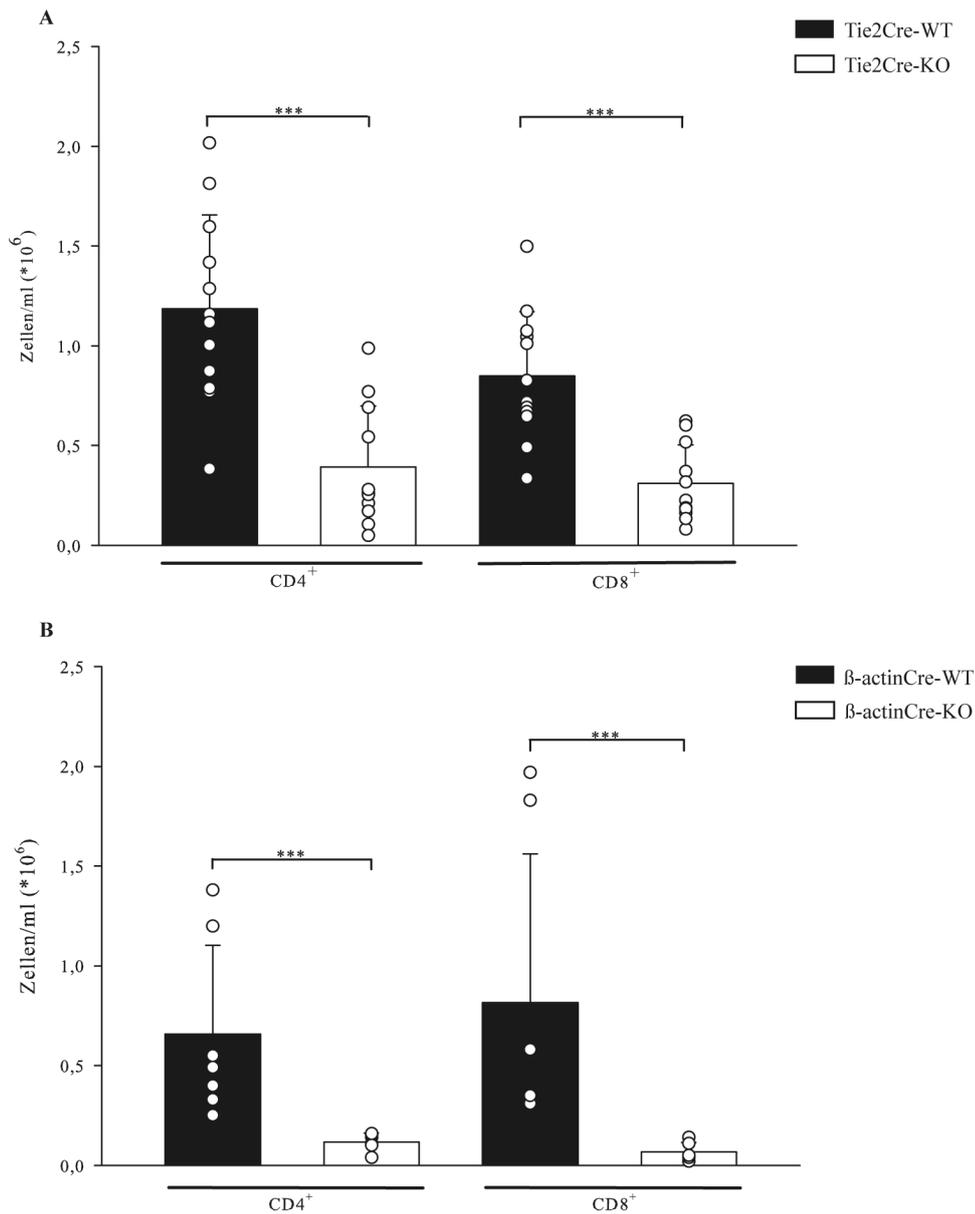


Abbildung 10: T-Lymphozyten im peripheren Blut von Tie2Cre-KO Mäusen sowie von beta-actinCre-KO Tieren

A: Tie2Cre-KO Tiere haben reduzierte absolute CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozytenzahlen im peripheren Blut (schwarz: Tie2Cre-WT, weiß: Tie2Cre-KO).

n-Zahlen in der CD4⁺ und CD8⁺ Gruppe: n =12 (Tie2Cre-WT), n=11 (Tie2Cre-KO)

B: beta-actinCre-KO Tiere haben reduzierte absolute CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozytenzahlen im peripheren Blut (schwarz: beta-actinCre-WT, weiß: beta-actinCre-KO)

n-Zahlen in der Leukozytengruppe: n=7 (beta-actinCre-WT), n=6 (beta-actinCre-KO)

*** = p < 0,001

3.7 Einfluss der Sphingosin-1-Phosphat-Lyaseaktivität in Tie2Cre-KO sowie β -actinCre-KO Tieren auf Lymphozytenpopulationen im Lymphknoten

Die unter 3.6 dargestellten Ergebnisse legen den Verdacht nahe, dass obwohl der S1P Gradient durch zellspezifischen *knock-out* der S1PL in Tie2Cre-KO nicht signifikant beeinflusst scheint, es doch zu Veränderungen der S1P Homöostase gekommen ist. Diese Veränderung scheint einen spezifischen Einfluss auf die Lymphozytenpopulationen im Organismus der Maus zu haben.

In β -actinCre-KO Tieren kommt es durch den ubiquitären *knock-out* der S1PL zu einer Retention der Lymphozyten im Lymphknoten.⁷⁴ Diese Ergebnisse konnten wir in unseren Versuchen reproduzieren.

Um zu evaluieren, ob auch in Tie2Cre-KO Tieren eine Retention der Lymphozyten in Lymphknoten stattfindet, wurden diesen Tieren inguinale Lymphknoten entnommen, und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Die Lymphknoten aus Tie2Cre-KO Tieren zeigen unveränderte CD4⁺, CD8⁺ und CD19/B220⁺ Lymphozytenpopulationen innerhalb der Lymphknoten.

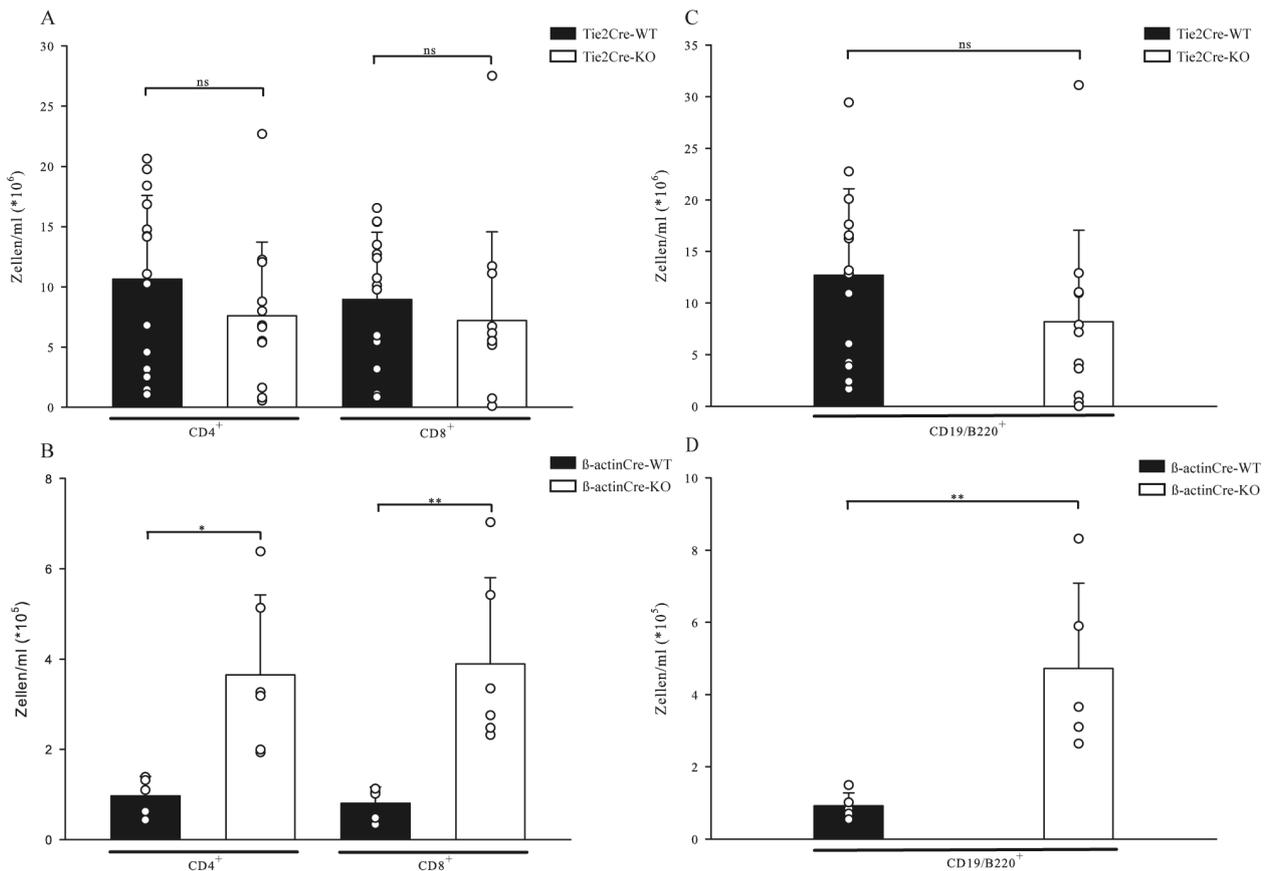


Abbildung 11: T-Lymphozyten im Lymphknoten von Tie2Cre-KO und β-actin-KO Tieren.

A: Tie2Cre-KO Tiere zeigen unveränderte CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozytenzahlen in Lymphknoten (schwarz: Tie2Cre-WT, weiß: Tie2Cre-KO).

n-Zahlen in der CD4⁺ und CD8⁺ Gruppe: n=15 (Tie2Cre-WT), n=12 (Tie2Cre-KO)

B: β-actinCre-KO Tiere zeigen erhöhte CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozytenzahlen in Lymphknoten (schwarz: β-actinCre-WT, weiß: β-actinCre-KO).

n-Zahlen in der CD4⁺ und CD8⁺ Gruppe : n=5 (β-actinCre-WT), n=6 (β-actinCre-KO)

C: Tie2Cre-KO Tiere zeigen unveränderte CD19/B220⁺ Lymphozytenzahlen in Lymphknoten (schwarz: Tie2Cre-WT, weiß: Tie2Cre-KO).

n-Zahlen in der CD19/B220⁺ Gruppe: n=14 (Tie2Cre-WT), n=11 (Tie2Cre-KO)

D: β-actinCre-KO Tiere zeigen erhöhte CD19/B220⁺ Lymphozytenzahlen in Lymphknoten (schwarz: β-actinCre-WT, weiß: β-actinCre-KO).

n-Zahlen in der CD19/B220⁺ Gruppe: n=5 (β-actinCre-WT), n=6 (β-actinCre-KO)

Dargestellt sind Einzelwerte und der Standardfehler unabhängiger Experimente

ns bezeichnet nicht signifikant; * = p < 0,05; ** = p < 0,01

3.8 Einfluss der Sphingosin-1-Phosphat-Lyaseaktivität in Tie2Cre-KO sowie β -actinCre-KO Tieren auf Lymphozytenpopulationen in der Lymphe

Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob in Tie2Cre-KO Mäusen ein regelhafter Lymphozytenegress aus dem Lymphknoten in die Lymphe entlang des S1P Gradienten

stattfinden kann. Von β -actinCre-KO Tieren ist bekannt, dass Lymphozyten im Lymphknoten festgehalten werden.⁷⁴

Tie2Cre-KO sowie β -actinCre-KO Tieren wurde Lymphe entnommen, und mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich der Lymphozytenpopulationen untersucht.

Wir vermuteten, dass die Durchflusszytometrie der Lymphe aus den KO-Tieren stark verringerte Lymphozytenzahlen zeigen würde.

In Tie2Cre-KO Tieren zeigte die FACS-Analyse der Lymphe unveränderte CD4⁺, CD8⁺ und CD19/B220⁺ Lymphozytenpopulationen.

In β -actinCre-KO Mäuse zeigten sich, wie erwartet, signifikant erniedrigte CD4⁺, CD8⁺ und CD19/B220⁺ Lymphozytenpopulationen in der Lymphe.

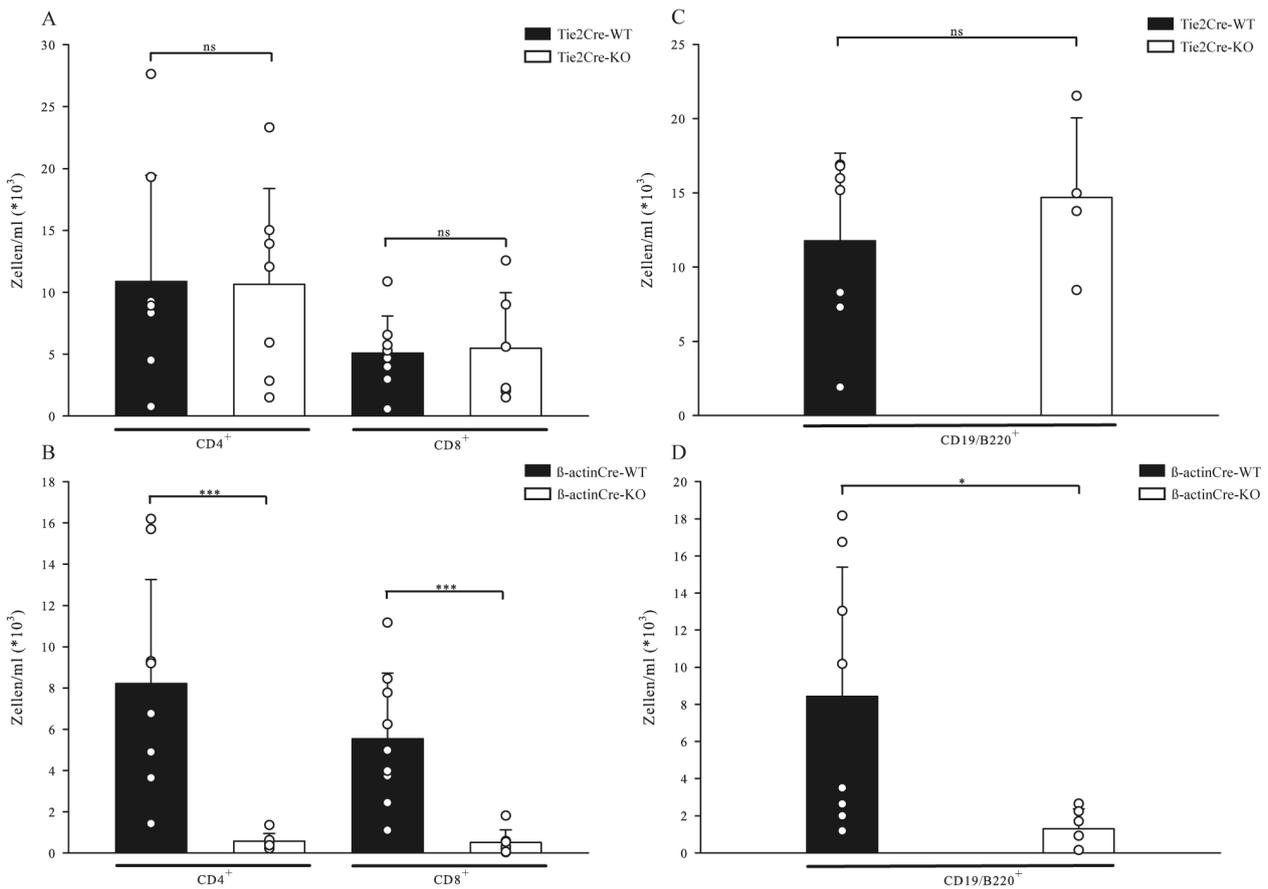


Abbildung 12: Lymphozyten in der Lymphe von Tie2Cre-KO Mäusen sowie von beta-actinCre-KO Tieren.

A: Tie2Cre-KO Tiere zeigen unveränderte CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozytenzahlen in der Lymphe (schwarz: Tie2Cre-WT, weiß: Tie2Cre-KO).

n-Zahlen in der CD4⁺ Gruppe: n = 8 (Tie2Cre-WT), n=7 (Tie2Cre-KO)

n-Zahlen in der CD8⁺ Gruppe: n = 8 (Tie2Cre-WT), n=6 (Tie2Cre-KO).

B: beta-actinCre-KO Tiere zeigen reduzierte CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozytenzahlen in der Lymphe (schwarz: beta-actinCre-WT, weiß: beta-actinCre-KO).

n-Zahlen in der CD4⁺ Gruppe und CD8⁺ Gruppe: n=9 (beta-actinCre-WT), n=7 (beta-actinCre-KO).

C: Tie2Cre-KO Tiere zeigen unveränderte CD19/B220⁺ Lymphozytenzahlen in der Lymphe (schwarz: Tie2Cre-WT, weiß: Tie2Cre-KO).

n-Zahlen in der CD19/B220⁺ Gruppe: n=7 (Tie2Cre-WT), n=4 (Tie2Cre-KO).

D: beta-actinCre-KO Tiere zeigen reduzierte CD19/B220⁺ Lymphozytenzahlen in der Lymphe (schwarz: beta-actinCre-WT, weiß: beta-actinCre-KO).

n-Zahlen in der CD19/B220⁺ Gruppe: n=8 (beta-actinCre-WT), n=6 (beta-actinCre-KO).

Dargestellt sind Einzelwerte und der Standardfehler unabhängiger Experimente.

ns bezeichnet nicht signifikant; * = p < 0,05; *** = p < 0,001

3.9 Einfluss der Sphingosin-1-Phosphat-Lyaseaktivität in Tie2Cre-KO sowie beta-actinCre-KO Tieren auf Lymphozytenpopulationen im Knochenmark

Um zu beurteilen, ob sich durch die Veränderungen der S1P Konzentrationen in Geweben in unserem transgenen Mausmodell der T- und B-Zellgehalt des Knochenmarks verändert, wurden

β -actinCre-KO Mäusen das Knochenmark aus dem Femurknochen entnommen und mittels Durchflusszytometrie auf seinen Lymphozytensubpopulationen analysiert. Hier zeigte sich in Tie2Cre-KO Mäusen kein Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe. β -actinCre-KO Mäuse zeigten eine hoch-signifikante Verringerung der CD8⁺ Lymphozyten im Knochenmark.

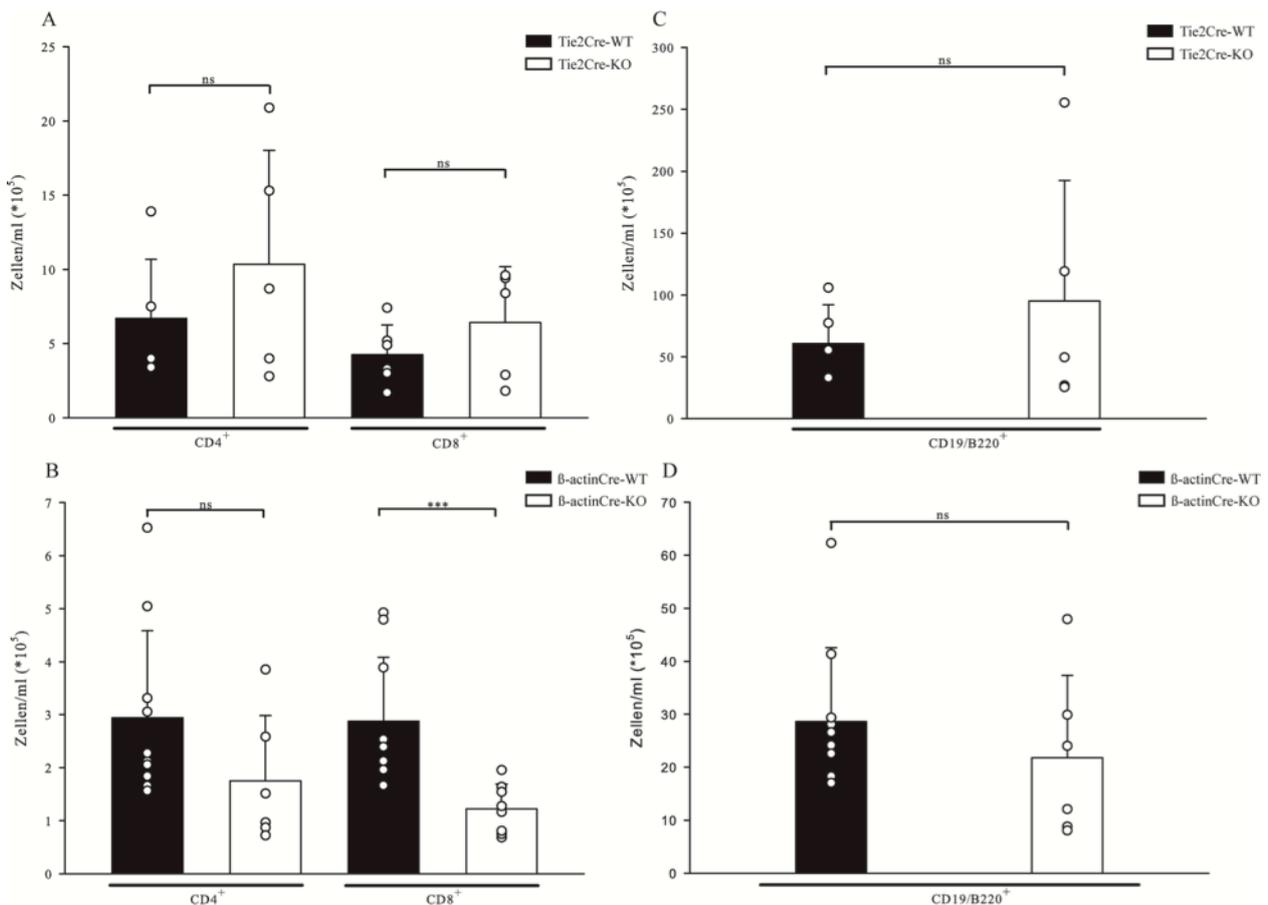


Abbildung 13: Lymphozyten im Knochenmark von Tie2Cre-KO und β -actinCre-KO Tieren.

A: Tie2Cre-KO Tiere zeigen unveränderte T-Lymphozytenzahlen im Knochenmark (schwarz: Tie2Cre-WT, weiß: Tie2Cre-KO).

n-Zahlen in der CD4⁺ und CD8⁺ Gruppe: n =6 (Tie2Cre-WT), n=5 (Tie2Cre-KO)

B: β -actinCre-KO Tiere zeigen erniedrigte CD8⁺ Lymphozytenzahlen im Knochenmark (schwarz: β -actinCre-WT, weiß: β -actinCre-KO)

n-Zahlen in der CD4⁺ Gruppe: n=10 (β -actinCre-WT), n=6 (β -actinCre-KO)

n-Zahlen in der CD8⁺ Gruppe: n=10 (β -actinCre-WT), n=8 (β -actinCre-KO)

C: Tie2Cre-KO Tiere zeigen unveränderte CD19/B220⁺ Lymphozytenzahlen im Knochenmark (schwarz: Tie2Cre-WT, weiß: Tie2Cre-KO).

n-Zahlen in der CD19/B220⁺ Gruppe: n=5 (Tie2Cre-WT), n=5 (Tie2Cre-KO)

D: β -actinCre-KO Tiere zeigen unveränderte CD19/B220⁺ Lymphozytenzahlen im Knochenmark (schwarz: β -actinCre-WT, weiß: β -actinCre-KO)

n-Zahlen in der CD19/B220⁺ Gruppe: n=10 (β -actinCre-WT), n=6 (β -actinCre-KO)

Dargestellt sind Einzelwerte und der Standardfehler unabhängiger Experimente

ns bezeichnet nicht signifikant; *** = p < 0,001

3.10 Einfluss der Sphingosin-1-Phosphat-Lyaseaktivität in Tie2Cre-KO Tieren auf das *homing* von T-Lymphozyten in das Knochenmark

Um zu klären, ob sich durch die Veränderungen der S1P Konzentrationen in Geweben in unserem transgenen Mausmodell ein Defekt des T-Lymphozytenhomings in das Knochenmark nachweisen lässt, wurden Tie2Cre-KO und Tie2Cre-KO-WT Tieren isolierte und markierte T-Lymphozyten aus C57BL/6 Tieren injiziert. Nach zweistündiger Inkubationszeit *in vivo* wurden die Versuchstiere getötet, die Femurknochen entnommen, gefärbt und mittels 2-Photonenmikroskopie untersucht.

Hier zeigte sich in Tie2Cre-KO Versuchstieren im Vergleich zur Kontrollgruppe ein, soweit visuell beurteilbar, uneingeschränktes *homing* von T-Lymphozyten in das Knochenmark.

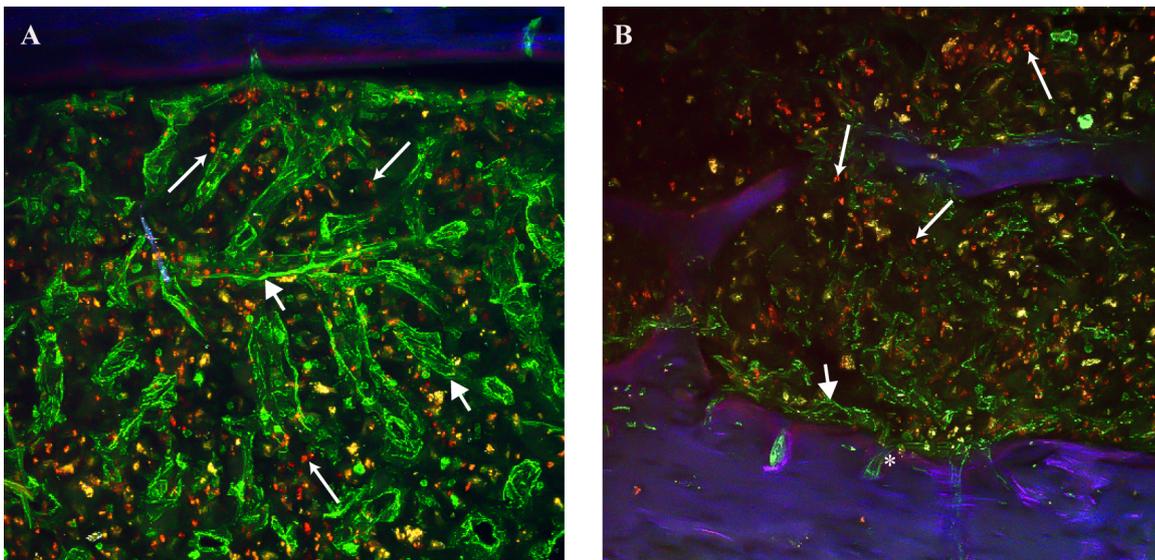


Abbildung 14: Erfolgreiches *homing* von wildtyp T-Lymphozyten in das Knochenmark

Wildtyp T-Lymphozyten aus C57BL/6 Tieren (in rot; CMTMR) innerhalb der Knochenmarkshöhle (Pfeile). CD144⁺ vaskuläre Endothelzellen (in grün; Alexa Fluor 488; Pfeilspitzen). Femurknochen in purpur.

A: *Whole Mount Stain* eines Femurknochens eines Tie2Cre-WT Tier.

B: *Whole Mount Stain* eines Femurknochens eines Tie2Cre-KO Tier. Das Sternchen zeigt einen Gefäßeintritt in die Markhöhle.

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In unseren Experimenten sehen wir keinen signifikanten Unterschied zwischen den S1P Spiegeln in Blut, Lymphe, Knochenmark und Lymphknoten in Tie2Cre-KO Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe. In Tie2Cre-KO Tieren lässt sich im Blut eine Lymphopenie mit signifikanter Verringerung der CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozytenpopulationen nachweisen.

Der T-Zell Egress aus dem Lymphknoten sowie das *homing* in das Knochenmark scheinen ungestört. β -actinCre-KO Tiere zeigen den in der Literatur bereits beschriebenen Phänotyp.

4.2 Die endotheliale Sphingosin-1-Phosphat-Lyaseaktivität hat keinen signifikanten Einfluss auf S1P Konzentrationen innerhalb verschiedener Gewebe.

In *in vitro* Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die S1PL-Aktivität vaskulärer Endothelzellen einen Beitrag zur Aufrechterhaltung hoher Plasma-S1P-Spiegel leistet.⁶⁸

Um zu evaluieren ob diese Beobachtung auch *in vivo* reproduzierbar ist, wurden Mäuse mit *knock-out* der S1PL in vaskulären Endothelzellen produziert, der Blutplasma-S1P-Spiegel dieser Tiere bestimmt und mit Wildtyptieren verglichen. Die Bestimmung der S1P Spiegel in den unterschiedlichen Geweben erfolgte mittels High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) und anschließender Tandem-Massenspektrometrie. Diese Methodik stellt aktuell die Methode der Wahl bei der Analyse von S1P in Geweben dar.

Tie2Cre-KO Tiere zeigen eine ca. 1,5-fache Erhöhung der Plasma-S1P-Spiegel im Vergleich zu Wildtyptieren. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant, was vermutlich auch an der hohen Varianz der Versuchsergebnisse liegt.

Eine wesentliche Limitation ist das gewählte Mausmodell. Tie2 besitzt zwar hinsichtlich der Expression in vaskulären Endothelzellen eine gewisse Spezifität, jedoch konnte in den Jahren seit Erstbeschreibung des Tie2Cre Mausmodells nachgewiesen werden, dass Tie2 auch in anderen Zellpopulationen exprimiert wird. Die Mehrheit adulter Blutzellen z.B. stammt von Tie2⁺ Vorläuferzellen ab, was die Validität eines Tie2Cre Mausmodells in Hinblick auf seine Endothelzellspezifität erheblich beeinträchtigt.¹⁴⁵

Der oben beschriebene Trend einer 1,5-fachen Erhöhung der Plasma-S1P-Spiegel in den Versuchstieren könnte somit auch durch S1PL *knock-out* in anderen Zellpopulationen bedingt sein.

Trotzdem wäre eine Wiederholung des Versuchsassays nötig, um diesen Trend gegebenenfalls auch statistisch belegen zu können.

Bis jetzt wurde davon ausgegangen, dass die hohen S1P Konzentrationen in der Lymphe Produkt der SphK1 und SphK2 Aktivität der LYVE-1⁺ Zellpopulation, welche das Endothel der lymphatischen Gefäße auskleiden sind.⁷³

Die Analyse der S1P Konzentrationen in der Lymphe der Tie2Cre-KO Tiere erbrachte das Ergebnis einer um den Faktor 2 erhöhten S1P Konzentration, was bis jetzt nicht bekannt ist. Dieser Trend war jedoch nicht statistisch signifikant. Auch hier lag bei den Versuchstieren eine hohe Varianz der Ergebnisse vor. Somit könnte durch Versuchswiederholung ggf. eine Signifikanz der Ergebnisse erzielt werden.

Erklären lässt sich dieser Befund durch die Tatsache, dass Tie2 auch in lymphatischen Endothelien exprimiert wird.¹⁴⁶ Somit könnte die S1PL Aktivität in lymphatischen Endothelien neben der bekannten SphK1 und SphK2 Aktivität einen wichtigen Beitrag zur S1P Homöostase in der Lymphe leisten.

Die vergleichsweise niedrigen S1P Konzentrationen im Lymphknoten werden durch die hohe S1PL Aktivität im Lymphknoten selbst etabliert.⁷⁵ In unseren Experimenten konnten wir zeigen, dass dies durch die endotheliale S1PL Aktivität reguliert sein könnte. Die S1P Konzentration im Lymphknoten der Versuchstiere ist im Vergleich zur Kontrollgruppe enorm erhöht. Auch diese Resultate sind nicht zuletzt auf Grund einer ausgeprägten Varianz der Einzelergebnisse nicht signifikant. Eine Wiederholung der Versuche könnte hier ebenfalls zur definitiven Klärung beitragen.

Die Analyse der S1P Konzentration im Knochenmark zeigt eine Erhöhung in den Versuchstieren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch hier zeigte sich eine ausgeprägte Varianz der Resultate in der Versuchsgruppe, welche eine Einschätzung der Ergebnisse hinsichtlich ihrer Signifikanz nicht zulässt. Da Tie2 in einer Mehrheit der Vorläuferzellen von adulten Blutzellen exprimiert wird, müssen wir davon ausgehen, dass unsere Ergebnisse sich nicht alleine durch

einen S1PL *knock-out* der Endothelzellen der im Knochenmark verlaufenden Blutgefäße erklären lassen.

Als weiterer Diskussionspunkt sei hinzugefügt, dass sich mit der von uns angewandten Methodik der S1P Konzentrationsbestimmung in oben genannten Geweben nur ein Rückschluss auf die durchschnittlich im gesamten Gewebe vorliegende S1P Konzentration ziehen lässt. Über die S1P Konzentration im Mikromilieu der Grenzzone zwischen verschiedenen Geweben, in welchem der Übertritt von Immunzellen wie den T-Lymphozyten stattfindet, lässt sich keine Aussage treffen.

In Zusammenschau der oben diskutierten Ergebnisse lassen sich jedoch folgende Schlüsse ziehen:

1.) Das transgene Tie2Cre Mausmodell eignet sich auf Grund seiner ungenügenden Endothelzellspezifität nur bedingt zur Evaluation des Einflusses der endothelialen S1PL auf S1P Konzentrationen in den oben genannten Geweben.

2.) Der Tie2Cre vermittelte *knock-out* von S1PL führt zu einer nicht signifikanten Erhöhung der S1P Aktivität in Blutplasma, Lymphe, Lymphknoten und Knochenmark. Auf Grund der heterogenen Expression von Tie2 in unterschiedlichen Zellpopulationen lässt sich allerdings nicht zweifelsfrei zuordnen, welche Zellpopulation genau mit Ihrer S1PL Aktivität entscheidend für die Aufrechterhaltung der entsprechenden S1P Konzentration in dem jeweiligen Gewebe ist.

4.3 Sphingosin-1-Phosphat Lyase *knock-out* führt zu Leuko- und Lymphopenie im peripheren Blut.

Ein S1PL *full-knock-out* führt in Versuchstieren zu erhöhten S1P Spiegeln in Geweben und im Blutplasma.¹⁴⁷ Dies liegt daran, dass die S1PL Funktion entscheidend für die Aufrechterhaltung des S1P Gradienten zwischen Geweben auf der einen, und Blutplasma bzw. Lymphe auf der anderen Seite verantwortlich ist.⁷⁵ Tiere mit einem S1PL *full-knock-out* haben, auf Grund von massiven Entzündungen und Defekten in diversen Geweben – eine deutlich verringerte Lebenszeit.^{138,147} Um trotzdem den Effekt eines ubiquitären S1PL *knock-out* auf den S1P

Gradienten sowie folglich auf die Migration von Immunzellen zu studieren, wurde das transgene β -actinCre⁺ x S1PL^{flox/flox} Mausmodell entwickelt. In diesem Modell lässt sich ein S1PL *knock-out* in adulten Mäusen mit konsekutiver 70-90%iger Herunterregulation der S1PL Aktivität durch Tamoxifengabe induzieren.⁷⁴ Diese Tiere zeigen erhöhte S1P Spiegel in Thymus, Lymphknoten, Milz und Blut.⁷⁴ Außerdem liegt bei diesen Tieren eine signifikante Lymphopenie mit starker Verringerung der CD4⁺ und CD8⁺ Zellpopulationen im peripheren Blut vor, was die Bedeutung der S1PL für die Aufrechterhaltung des S1P Gradienten unterstreicht.⁷⁴

In unseren Versuchen konnten wir die von Billich und Kollegen publizierten Ergebnisse reproduzieren. Auch wir finden im Mausmodell des induzierbaren ubiquitären S1PL *knock-out* eine Lymphopenie mit signifikanter Reduzierung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozytenpopulationen.

In unserem transgenen Tie2Cre Mausmodell sehen wir ebenfalls eine ausgeprägte Leukopenie, welche vermutlich bei normalen Neutrophilenzahlen vor allem durch die gleichzeitig vorliegende Lymphopenie bedingt ist. Ausserdem zeigt sich eine signifikante Reduktion der CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten im Blut.

Diese Erkenntnis ist in so fern äußerst interessant, als dass wir in vorangehenden Experimenten zur Veränderung der S1P Konzentration in den oben gezeigten Geweben keinen signifikanten Unterschied dieser Konzentrationen im Vergleich zu der Kontrollgruppe finden konnten. Somit war nicht unbedingt davon auszugehen, dass der S1P Gradient suffizient tangiert wurde um einen Einfluss auf Lymphozytenpopulationen im Blut zu haben.

Dies scheint aber durch den oben beschriebenen nicht-signifikanten Trend stattgefunden zu haben. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass durch Wiederholung der Versuche zu den S1P Konzentrationen in verschiedenen Geweben schlussendlich ein signifikanter Unterschied zu erzielen sein könnte.

Der *knock-out* der endothelialen S1PL mit seinen oben genannten Limitationen hinsichtlich der Zellspezifität hat somit bezüglich der Leukozytenpopulationen im peripheren Blut einen ähnlichen Effekt wie ein induzierbarer „full“ *knock-out*. Eine ordnungsgemäße S1PL Funktion in Endothelzellen scheint somit zumindest einen Beitrag zur Aufrechterhaltung des S1P Gradienten und folglich adäquater Leukozytenzahlen im peripheren Blut zu leisten.

4.4 Sphingosin-1-Phosphat Lyase *knock-out* führt zur Retention von Lymphozyten in sekundären lymphatischen Organen. Tie2Cre-KO Mäuse zeigen keine Retention von Lymphozyten in Lymphknoten.

Der von Billich und Kollegen beschriebene induzierbare ubiquitäre *knock-out* von S1PL führt zu einer Erhöhung der S1P Spiegel in Blut und Lymphknoten.⁷⁴ Da hierdurch der S1P Gradient aufgehoben wird, kommt es zu einer Festhaltung der T-Lymphozyten im peripheren Lymphknoten.^{74,75}

Diese Beobachtung konnten wir in den von uns durchgeführten Experimenten reproduzieren. In weiteren Experimenten zur Bestimmung der Lymphozytenpopulationen in β -actinCre-KO Tieren konnten wir zum ersten Mal zeigen, dass diese in der Lymphe stark erniedrigt sind. Dies ist dadurch erklärbar, dass Lymphozyten durch Zerstörung des S1P Gradienten den Lymphknoten nicht mehr verlassen können.

In unserem transgenen Tie2Cre Mausmodell, konnten wir eine erhöhte Zellzahl im Lymphknoten und dementsprechend eine Retention der Lymphozyten im Lymphknoten nicht nachvollziehen. Sowohl im Lymphknoten als auch in der Lymphe finden sich normale Lymphozytenzahlen (siehe Abbildungen 11 und 12).

Dies lässt vermuten, dass die S1PL in Tie2⁺ Zellpopulationen keinen bedeutenden Einfluss auf die Lymphozytenmigration zwischen Lymphknoten und Lymphe hat.

Somit stellen wir fest, dass die ubiquitäre S1PL Aktivität und somit ein streng kontrollierter S1P Gradient für den Lymphozytenegress aus dem Lymphknoten unabdinglich ist. Diese Feststellung spiegelt die schon etablierten wissenschaftlichen Tatsachen wieder. Ein lediglich auf Tie2⁺ Zellpopulationen beschränkter *knock-out* der S1PL hat keinen Einfluss auf den S1P vermittelten Lymphozytenegress aus dem Lymphknoten.

Dies bedeutet, dass entweder die Gesamtheit der S1PL exprimierenden Zellpopulationen die Aufrechterhaltung der S1P Homöostase und somit den Lymphozytenegress gewährleisten, oder dies durch eine bis jetzt noch nicht identifizierte Zellpopulation, ermöglicht wird. Zusätzlich könnte es sein, dass der Lymphozytenegress in bedeutender Weise durch S1P Homöostase im Mikromileau an der Grenzzone zwischen Lymphknoten und Lymphe kontrolliert wird.

4.5 Normales T-Zell *homing* in das Knochenmark in Tie2Cre-KO Tieren. β -actinCre-KO Tiere zeigen eine Retention von CD8⁺ Lymphozyten im Knochenmark.

Das Knochenmark dient nicht nur als Ursprungsort der Hämatopoese. Bestimmte T-Zellpopulationen wandern gezielt in das Knochenmark ein. Zudem dient es auch als Reservoir und Ort des T-Zellprimings.^{37,38}

In Tie2Cre-KO Tieren ließen sich im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Veränderung der untersuchten Lymphozytenpopulationen im Knochenmark nachweisen. Um zu untersuchen ob unabhängig von diesen Ergebnissen ein gestörtes T-Zellhoming gesunder Zellen aus C57BL/6 Spendertieren in unseren Versuchstieren vorliegt, untersuchten wir *ex vivo* das Knochenmark dieser Tiere mittels 2-Photonenmikroskopie nach adoptivem Zelltransfer Fluoreszenz-markierter T-Zellen aus C57BL/6 Spendertieren.

Hier konnten visuell transferierte T-Zellen im Knochenmark nachgewiesen werden, was für eine zumindest weitestgehend regelhaft ablaufendes *homing* von T-Lymphozyten in das Knochenmark spricht. Die Tie2 gebundene S1PL hat somit wahrscheinlich keinen Einfluss auf diesen Homingprozess. Eine wesentliche Limitation der Versuche mittels 2-Photonenmikroskopie ist, dass keine Quantifizierung der ins das Knochenmark eingewanderten T-Lymphozyten erfolgte.

β -actinCre-KO Tiere zeigen eine Retention von CD8⁺ Lymphozyten im Knochenmark. Da vor allem für CD8⁺ Gedächtniszellen das Knochenmark ein Reservoir darstellt, könnte es sein, dass der Egress dieser Subpopulation in das Knochenmark S1P vermittelt ist, und die S1PL Aktivität hierfür von entscheidender Bedeutung ist.

5. Zusammenfassung

Die Migration von Lymphozyten zwischen verschiedenen Geweben des Körpers ist ein streng kontrollierter Prozess. Sphingosin-1-Phosphat ist ein potenter Mediator der T-Lymphozytenmigration. Die Auswanderung von Lymphozyten aus lymphatischen Organen wie dem Lymphknoten wird durch Aufrechterhaltung des S1P Gradienten sowie einer regelhaften Funktion der S1P-S1PR₁ Achse gewährleistet. Wird diese Achse bzw. der S1P Gradient durchbrochen, sind Lymphozyten nicht länger in der Lage, aus lymphatischen Geweben auszuwandern. Für die Aufrechterhaltung des S1P Gradienten sind in unterschiedlichen Geweben unterschiedliche S1P metabolisierende Enzyme aktiv, welche S1P produzieren bzw. abbauen.

Wir stellten uns die Frage, inwiefern die endotheliale S1PL für die Aufrechterhaltung eines suffizienten S1P Gradienten zwischen flüssigen Geweben wie Blut/Lymphe und lymphatischen Geweben wie dem Lymphknoten und Knochenmark und somit für die Lymphozytenmigration von Bedeutung ist. Hierzu generierten wir ein transgenes Mausmodell in welchem die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Promoters für das murine Tie2 Gen steht. Tie2 kodiert einen Angiopoetin Rezeptor aus der Familie der Tyrosinkinase, und wird in allen murinen Endothelzellen, sowie weiteren Zellpopulationen exprimiert.

In unseren Experimenten konnten wir keinen signifikanten Unterschied in Blut, Lymphe, Knochenmark und Lymphknoten hinsichtlich der gemessenen S1P Spiegel im Vergleich zur Kontrollgruppe finden. Wir sehen jedoch in jedem dieser genannten Gewebe einen Trend zu erhöhten S1P Spiegeln. Da die Tie2 Expression jedoch nicht auf murine Endothelzellen beschränkt ist, können wir keine exakte Aussagen darüber treffen, welches (Sub-)Gewebe mit seiner intrinsischen S1PL Aktivität für diese Beobachtungen verantwortlich ist.

Trotz der Tatsache, dass der S1P Gradient in unserem transgenen Mausmodell nicht signifikant verändert ist, konnten wir in Tie2Cre-KO Tieren eine Lymphopenie mit Verringerung der CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozytenpopulationen im Blut zeigen. Der T-Zell Egress aus dem Lymphknoten sowie das *homing* in das Knochenmark waren ungestört.

Aus diesen Ergebnissen schlussfolgern wir, dass es durch den S1PL *knock-out* in Tie2⁺ Tieren letztlich doch zu einer Beeinflussung des S1P Gradienten kommt, welcher wohlmöglich nur das

Mikromilieu an den Grenzzonen der verschiedenen Gewebe tangiert, und deshalb in unseren Experimenten zur S1P Konzentrationsbestimmung nicht nachzuweisen war.

Somit erbringen wir in dieser Arbeit den Nachweis, dass die S1PL aus Tie2⁺ Geweben für die Aufrechterhaltung des S1P Gradienten von zumindest nicht vernachlässigbarer Bedeutung ist.

Der von den Versuchstieren gebotene Phänotyp lässt dabei auf eine Störung der T-Zellentwicklung/-migration schließen, welchen wir auf Grund der geringen Gewebsspezifität des gewählten Mausmodells nicht abschließend erklären können.

Die von uns durchgeführten Versuche zur T-Lymphozytenmigration anhand des β -actinCre⁺ x S1PL^{flox/flox} Modells bestätigen bereits publizierte Ergebnisse und untermauern die Bedeutung der S1PL für eine regelhafte Lymphozytenmigration.

6. Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP-binding cassette
APZ	Antigen präsentierende Zelle
BSA	Bovines serum albumin
β -actinCre-KO	β -actinCre-Knock-out Stamm
β -actinCre-WT	β -actinCre-Wildtyp Stamm
CCL19	CC-chemokine ligand 19
CCL21	CC-chemokine ligand 21
CCR7	CC-chemokine receptor 7
CLP	Common lymphoid precursor
CMLP	Common myelo-lymphoid progenitor
CMTMR	(5-(and-6)-(((4-chloromethyl)benzoyl)amino)tetramethylrhodamine)
DZ	Dendritische Zelle
DT	<i>Ductus thoracicus</i>
EAE	Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FBS	Fetal Bovine Serum
Fingolimod-P	Fingolimod-phosphat
FRZ	Fibroblastische Retikulumzelle
FSC	Forwardscatter
LFA-1	Integrin leukocyte function-associated antigen 1
LYVE-1	Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1
HDL	High Density Lipoprotein
HEV	High endothelial venules
HSZ	Hämatopoetische Stammzelle
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
ICAM-2	Intercellular adhesion molecule 2
IL-2	Interleukin 2
IL-7	Interleukin 7
IL-18	Interleukin 18
i.p.	Intraperitoneal
KHK	Koronare Herzkrankheit

Abkürzungsverzeichnis

KLF2	Krüppel-like-factor 2
LDL	Low Density Lipoprotein
LN	Lymphknoten
MAdCAM1	Mucosal addressin-cell adhesion molecule 1
MS	Multiple Sklerose
NFE2	Nuclear factor erythroid-derived 2
NKZ	Natürliche Killerzelle
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
PNAD	Peripheral-node addressin
PRRs	Pattern recognition receptors
PPs	Payer-Plaques
PTCA	Perkutane transluminale koronare Angioplastie
S1P	Sphingosin-1-phosphat
S1PL	Sphingosin-1-phosphat Lyase
S1PR	Sphingosin-1-phosphat Rezeptor
SLO	Sekundäres lymphatisches Organ
SphK1	Sphingosinkinase 1
SphK2	Sphingosinkinase 2
SphKs	Sphingosinkinasen
Spns2	Spinster 2
SSC	Sidescatter
T _{CM}	Zentrale Gedächtnis-T-Zelle
TZR	T-Zell Rezeptor
T _{EM}	Effektor-Gedächtnis-T-Zelle
T _{H1}	Typ1-T-Helferzelle
Tie2	Tunica intima endothelial kinase 2
Tie2Cre-KO	Tie2Cre-Knock-out Stamm
Tie2Cre-WT	Tie2Cre-Wildtyp Stamm
TLRs	Toll-like-Rezeptoren
TNF α	Tumornekrosefaktor
T _{reg} Zellen	Regulatorische T-Lymphozyten
VEGF	Vascular endothelial growth factor

7. Literaturverzeichnis

1. Murphy K.; Travers P.; Walport M. JC. Janeway's immunobiology. 8th ed. New York: Garland Science; 2012.
2. Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol* 2004;40:845-59.
3. Cooper MD, Alder MN. The evolution of adaptive immune systems. *Cell* 2006;124:815-22.
4. Burnet FM. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *Aust J Sci* 1957;20:67-9.
5. Echtenacher B, Mannel DN, Hultner L. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* 1996;381:75-7.
6. Malaviya R, Ikeda T, Ross E, Abraham SN. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature* 1996;381:77-80.
7. Lee DM, Friend DS, Gurish MF, Benoist C, Mathis D, Brenner MB. Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. *Science* 2002;297:1689-92.
8. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-52.
9. Sun JC, Lanier LL. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8(+) T cells. *Nature reviews Immunology* 2011;11:645-57.
10. Blom B, Spits H. Development of human lymphoid cells. *Annu Rev Immunol* 2006;24:287-320.
11. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 1997;91:661-72.
12. Galy A, Travis M, Cen D, Chen B. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* 1995;3:459-73.
13. Kawamoto H, Ohmura K, Katsura Y. Direct evidence for the commitment of hematopoietic stem cells to T, B and myeloid lineages in murine fetal liver. *Int Immunol* 1997;9:1011-9.
14. Adolfsson J, Mansson R, Buza-Vidas N, et al. Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* 2005;121:295-306.
15. Dik WA, Pike-Overzet K, Weerkamp F, et al. New insights on human T cell development by quantitative T cell receptor gene rearrangement studies and gene expression profiling. *J Exp Med* 2005;201:1715-23.
16. Plum J, De Smedt M, Leclercq G, Verhasselt B, Vandekerckhove B. Interleukin-7 is a critical growth factor in early human T-cell development. *Blood* 1996;88:4239-45.

17. Radtke F, Wilson A, Stark G, et al. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* 1999;10:547-58.
18. Perez E, Sullivan KE. Chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge and velocardiofacial syndromes). *Curr Opin Pediatr* 2002;14:678-83.
19. Markert ML, Boeck A, Hale LP, et al. Transplantation of thymus tissue in complete DiGeorge syndrome. *The New England journal of medicine* 1999;341:1180-9.
20. Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996;272:60-6.
21. von Andrian UH, Mackay CR. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *The New England journal of medicine* 2000;343:1020-34.
22. Girard JP, Springer TA. High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol Today* 1995;16:449-57.
23. von Andrian UH, Mempel TR. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nature reviews Immunology* 2003;3:867-78.
24. Bargatze RF, Jutila MA, Butcher EC. Distinct roles of L-selectin and integrins alpha 4 beta 7 and LFA-1 in lymphocyte homing to Peyer's patch-HEV in situ: the multistep model confirmed and refined. *Immunity* 1995;3:99-108.
25. Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 1996;88:3259-87.
26. Lawrence MB, Springer TA. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 1991;65:859-73.
27. Cyster JG. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* 1999;286:2098-102.
28. Warnock RA, Askari S, Butcher EC, von Andrian UH. Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *J Exp Med* 1998;187:205-16.
29. Andrew DP, Spellberg JP, Takimoto H, Schmits R, Mak TW, Zukowski MM. Transendothelial migration and trafficking of leukocytes in LFA-1-deficient mice. *Eur J Immunol* 1998;28:1959-69.
30. Lehmann JC, Jablonski-Westrich D, Haubold U, Gutierrez-Ramos JC, Springer T, Hamann A. Overlapping and selective roles of endothelial intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and ICAM-2 in lymphocyte trafficking. *J Immunol* 2003;171:2588-93.
31. Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* 1998;279:381-4.
32. Carlsen HS, Haraldsen G, Brandtzaeg P, Baekkevold ES. Disparate lymphoid chemokine expression in mice and men: no evidence of CCL21 synthesis by human high endothelial venules. *Blood* 2005;106:444-6.

33. Moschovakis GL, Forster R. Multifaceted activities of CCR7 regulate T-cell homeostasis in health and disease. *Eur J Immunol* 2012;42:1949-55.
34. Forster R, Davalos-Miszlitz AC, Rot A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nature reviews Immunology* 2008;8:362-71.
35. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews Immunology* 2007;7:678-89.
36. Fu YX, Chaplin DD. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annual review of immunology* 1999;17:399-433.
37. Feuerer M, Beckhove P, Garbi N, et al. Bone marrow as a priming site for T-cell responses to blood-borne antigen. *Nat Med* 2003;9:1151-7.
38. Mazo IB, Honczarenko M, Leung H, et al. Bone marrow is a major reservoir and site of recruitment for central memory CD8+ T cells. *Immunity* 2005;22:259-70.
39. Weninger W, Manjunath N, von Andrian UH. Migration and differentiation of CD8+ T cells. *Immunol Rev* 2002;186:221-33.
40. Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology* 2000;18:767-811.
41. Jung S, Unutmaz D, Wong P, et al. In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 2002;17:211-20.
42. Itano AA, McSorley SJ, Reinhardt RL, et al. Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity* 2003;19:47-57.
43. Takabe K, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S. "Inside-out" signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. *Pharmacol Rev* 2008;60:181-95.
44. Hannun YA, Loomis CR, Merrill AH, Jr., Bell RM. Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets. *J Biol Chem* 1986;261:12604-9.
45. Zhang H, Desai NN, Olivera A, Seki T, Brooker G, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. *J Cell Biol* 1991;114:155-67.
46. Hannun YA, Bell RM. Lysosphingolipids inhibit protein kinase C: implications for the sphingolipidoses. *Science* 1987;235:670-4.
47. Obinata H, Hla T. Sphingosine 1-phosphate in coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol* 2012;34:73-91.
48. Spiegel S, Milstien S. The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. *Nature reviews Immunology* 2011;11:403-15.
49. Mandala S, Hajdu R, Bergstrom J, et al. Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science* 2002;296:346-9.

50. Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, et al. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 2004;427:355-60.
51. Brinkmann V, Billich A, Baumruker T, et al. Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9:883-97.
52. Pelletier D, Hafler DA. Fingolimod for multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 2012;366:339-47.
53. Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:139-50.
54. Venkataraman K, Thangada S, Michaud J, et al. Extracellular export of sphingosine kinase-1a contributes to the vascular S1P gradient. *Biochem J* 2006;397:461-71.
55. Marathe S, Schissel SL, Yellin MJ, et al. Human vascular endothelial cells are a rich and regulatable source of secretory sphingomyelinase. Implications for early atherogenesis and ceramide-mediated cell signaling. *J Biol Chem* 1998;273:4081-8.
56. Olivera A, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature* 1993;365:557-60.
57. Shu X, Wu W, Mosteller RD, Broek D. Sphingosine kinase mediates vascular endothelial growth factor-induced activation of ras and mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol* 2002;22:7758-68.
58. Ma MM, Chen JL, Wang GG, et al. Sphingosine kinase 1 participates in insulin signalling and regulates glucose metabolism and homeostasis in KK/Ay diabetic mice. *Diabetologia* 2007;50:891-900.
59. El-Shewy HM, Johnson KR, Lee MH, Jaffa AA, Obeid LM, Luttrell LM. Insulin-like growth factors mediate heterotrimeric G protein-dependent ERK1/2 activation by transactivating sphingosine 1-phosphate receptors. *J Biol Chem* 2006;281:31399-407.
60. Sato K, Malchinkhuu E, Horiuchi Y, et al. Critical role of ABCA1 transporter in sphingosine 1-phosphate release from astrocytes. *J Neurochem* 2007;103:2610-9.
61. Kobayashi N, Nishi T, Hirata T, et al. Sphingosine 1-phosphate is released from the cytosol of rat platelets in a carrier-mediated manner. *J Lipid Res* 2006;47:614-21.
62. Mitra P, Oskeritzian CA, Payne SG, Beaven MA, Milstien S, Spiegel S. Role of ABCC1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103:16394-9.
63. Lee YM, Venkataraman K, Hwang SI, Han DK, Hla T. A novel method to quantify sphingosine 1-phosphate by immobilized metal affinity chromatography (IMAC). *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2007;84:154-62.
64. Kawahara A, Nishi T, Hisano Y, Fukui H, Yamaguchi A, Mochizuki N. The sphingolipid transporter spns2 functions in migration of zebrafish myocardial precursors. *Science* 2009;323:524-7.

65. Hisano Y, Kobayashi N, Kawahara A, Yamaguchi A, Nishi T. The sphingosine 1-phosphate transporter, SPNS2, functions as a transporter of the phosphorylated form of the immunomodulating agent FTY720. *J Biol Chem* 2011;286:1758-66.
66. Yatomi Y, Igarashi Y, Yang L, et al. Sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum. *J Biochem* 1997;121:969-73.
67. Hla T, Venkataraman K, Michaud J. The vascular S1P gradient-cellular sources and biological significance. *Biochim Biophys Acta* 2008;1781:477-82.
68. Venkataraman K, Lee YM, Michaud J, et al. Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate. *Circulation research* 2008;102:669-76.
69. Ikeda M, Kihara A, Igarashi Y. Sphingosine-1-phosphate lyase SPL is an endoplasmic reticulum-resident, integral membrane protein with the pyridoxal 5'-phosphate binding domain exposed to the cytosol. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325:338-43.
70. Pappu R, Schwab SR, Cornelissen I, et al. Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science* 2007;316:295-8.
71. Urtz N, Gaertner F, von Bruehl ML, et al. Sphingosine 1-Phosphate Produced by Sphingosine Kinase 2 Intrinsically Controls Platelet Aggregation In Vitro and In Vivo. *Circulation research* 2015;117:376-87.
72. Hanel P, Andreani P, Graler MH. Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. *FASEB J* 2007;21:1202-9.
73. Pham TH, Baluk P, Xu Y, et al. Lymphatic endothelial cell sphingosine kinase activity is required for lymphocyte egress and lymphatic patterning. *J Exp Med* 2010;207:17-27.
74. Billich A, Baumruker T, Beerli C, et al. Partial deficiency of sphingosine-1-phosphate lyase confers protection in experimental autoimmune encephalomyelitis. *PloS one* 2013;8:e59630.
75. Schwab SR, Pereira JP, Matloubian M, Xu Y, Huang Y, Cyster JG. Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. *Science* 2005;309:1735-9.
76. Graeler M, Goetzl EJ. Activation-regulated expression and chemotactic function of sphingosine 1-phosphate receptors in mouse splenic T cells. *FASEB J* 2002;16:1874-8.
77. Jolly PS, Rosenfeldt HM, Milstien S, Spiegel S. The roles of sphingosine-1-phosphate in asthma. *Mol Immunol* 2002;38:1239-45.
78. Terai K, Soga T, Takahashi M, et al. Edg-8 receptors are preferentially expressed in oligodendrocyte lineage cells of the rat CNS. *Neuroscience* 2003;116:1053-62.
79. Lee MJ, Thangada S, Paik JH, et al. Akt-mediated phosphorylation of the G protein-coupled receptor EDG-1 is required for endothelial cell chemotaxis. *Mol Cell* 2001;8:693-704.

80. Ryu Y, Takuwa N, Sugimoto N, et al. Sphingosine-1-phosphate, a platelet-derived lysophospholipid mediator, negatively regulates cellular Rac activity and cell migration in vascular smooth muscle cells. *Circulation research* 2002;90:325-32.
81. Wang F, Van Brocklyn JR, Hobson JP, et al. Sphingosine 1-phosphate stimulates cell migration through a G(i)-coupled cell surface receptor. Potential involvement in angiogenesis. *J Biol Chem* 1999;274:35343-50.
82. Zachariah MA, Cyster JG. Neural crest-derived pericytes promote egress of mature thymocytes at the corticomedullary junction. *Science* 2010;328:1129-35.
83. Cinamon G, Zachariah MA, Lam OM, Foss FW, Jr., Cyster JG. Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nat Immunol* 2008;9:54-62.
84. Jenne CN, Enders A, Rivera R, et al. T-bet-dependent S1P5 expression in NK cells promotes egress from lymph nodes and bone marrow. *J Exp Med* 2009;206:2469-81.
85. Rathinasamy A, Czeloth N, Pabst O, Forster R, Bernhardt G. The origin and maturity of dendritic cells determine the pattern of sphingosine 1-phosphate receptors expressed and required for efficient migration. *J Immunol* 2010;185:4072-81.
86. Konig K, Diehl L, Rommerscheidt-Fuss U, et al. Four-and-a-half LIM domain protein 2 is a novel regulator of sphingosine 1-phosphate receptor 1 in CCL19-induced dendritic cell migration. *J Immunol* 2010;185:1466-75.
87. Jolly PS, Bektas M, Olivera A, et al. Transactivation of sphingosine-1-phosphate receptors by FcepsilonRI triggering is required for normal mast cell degranulation and chemotaxis. *J Exp Med* 2004;199:959-70.
88. Ishii M, Egen JG, Klauschen F, et al. Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature* 2009;458:524-8.
89. Massberg S, Schaerli P, Knezevic-Maramica I, et al. Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues. *Cell* 2007;131:994-1008.
90. Allende ML, Dreier JL, Mandala S, Proia RL. Expression of the sphingosine 1-phosphate receptor, S1P1, on T-cells controls thymic emigration. *J Biol Chem* 2004;279:15396-401.
91. Zamora-Pineda J KA, Suh JH, Zhang M, Saba JD. Dendritic cell sphingosine-1-phosphate lyase regulates thymic egress. *Journal of Experimental Medicine* 17. Okt. 2016; epub ahead of print.
92. Schwab SR, Cyster JG. Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nat Immunol* 2007;8:1295-301.
93. Thangada S, Khanna KM, Blaho VA, et al. Cell-surface residence of sphingosine 1-phosphate receptor 1 on lymphocytes determines lymphocyte egress kinetics. *J Exp Med* 2010;207:1475-83.

94. Pham TH, Okada T, Matloubian M, Lo CG, Cyster JG. S1P1 receptor signaling overrides retention mediated by G alpha i-coupled receptors to promote T cell egress. *Immunity* 2008;28:122-33.
95. Grigorova IL, Schwab SR, Phan TG, Pham TH, Okada T, Cyster JG. Cortical sinus probing, S1P1-dependent entry and flow-based capture of egressing T cells. *Nat Immunol* 2009;10:58-65.
96. Bankovich AJ, Shiow LR, Cyster JG. CD69 suppresses sphingosine 1-phosphate receptor-1 (S1P1) function through interaction with membrane helix 4. *J Biol Chem* 2010;285:22328-37.
97. Fujita T, Inoue K, Yamamoto S, et al. Fungal metabolites. Part 11. A potent immunosuppressive activity found in *Isaria sinclairii* metabolite. *The Journal of antibiotics* 1994;47:208-15.
98. Chiba K, Yanagawa Y, Masubuchi Y, et al. FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats. I. FTY720 selectively decreases the number of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing. *Journal of immunology* 1998;160:5037-44.
99. Morris MA, Gibb DR, Picard F, Brinkmann V, Straume M, Ley K. Transient T cell accumulation in lymph nodes and sustained lymphopenia in mice treated with FTY720. *European journal of immunology* 2005;35:3570-80.
100. Enosawa S, Suzuki S, Kakefuda T, Li XK, Amemiya H. Induction of selective cell death targeting on mature T-lymphocytes in rats by a novel immunosuppressant, FTY720. *Immunopharmacology* 1996;34:171-9.
101. Henning G, Ohl L, Junt T, et al. CC chemokine receptor 7-dependent and -independent pathways for lymphocyte homing: modulation by FTY720. *The Journal of experimental medicine* 2001;194:1875-81.
102. Bandhuvula P, Tam YY, Oskouian B, Saba JD. The immune modulator FTY720 inhibits sphingosine-1-phosphate lyase activity. *The Journal of biological chemistry* 2005;280:33697-700.
103. Albert R, Hinterding K, Brinkmann V, et al. Novel immunomodulator FTY720 is phosphorylated in rats and humans to form a single stereoisomer. Identification, chemical proof, and biological characterization of the biologically active species and its enantiomer. *Journal of medicinal chemistry* 2005;48:5373-7.
104. Brinkmann V, Davis MD, Heise CE, et al. The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *The Journal of biological chemistry* 2002;277:21453-7.
105. Graler MH, Goetzl EJ. The immunosuppressant FTY720 down-regulates sphingosine 1-phosphate G-protein-coupled receptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2004;18:551-3.
106. Mehling M, Lindberg R, Raulf F, et al. Th17 central memory T cells are reduced by FTY720 in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 2010;75:403-10.

107. Mehling M, Brinkmann V, Antel J, et al. FTY720 therapy exerts differential effects on T cell subsets in multiple sclerosis. *Neurology* 2008;71:1261-7.
108. Zhou PJ, Wang H, Shi GH, Wang XH, Shen ZJ, Xu D. Immunomodulatory drug FTY720 induces regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in vitro. *Clinical and experimental immunology* 2009;157:40-7.
109. Kappos L, Radue EW, O'Connor P, et al. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 2010;362:387-401.
110. Cohen JA, Barkhof F, Comi G, et al. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 2010;362:402-15.
111. Kim YM, Sachs T, Asavaroengchai W, Bronson R, Sykes M. Graft-versus-host disease can be separated from graft-versus-lymphoma effects by control of lymphocyte trafficking with FTY720. *The Journal of clinical investigation* 2003;111:659-69.
112. Mansoor M, Melendez AJ. Recent trials for FTY720 (fingolimod): a new generation of immunomodulators structurally similar to sphingosine. *Reviews on recent clinical trials* 2008;3:62-9.
113. Serra M, Saba JD. Sphingosine 1-phosphate lyase, a key regulator of sphingosine 1-phosphate signaling and function. *Advances in enzyme regulation* 2010;50:349-62.
114. Weiler S, Braendlin N, Beerli C, et al. Orally active 7-substituted (4-benzylphthalazin-1-yl)-2-methylpiperazin-1-yl]nicotinonitriles as active-site inhibitors of sphingosine 1-phosphate lyase for the treatment of multiple sclerosis. *Journal of medicinal chemistry* 2014;57:5074-84.
115. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2012;32:2045-51.
116. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nature immunology* 2011;12:204-12.
117. Hansson GK, Robertson AK, Soderberg-Naucler C. Inflammation and atherosclerosis. *Annual review of pathology* 2006;1:297-329.
118. Paulsson G, Zhou X, Tornquist E, Hansson GK. Oligoclonal T cell expansions in atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2000;20:10-7.
119. Zhou X, Nicoletti A, Elhage R, Hansson GK. Transfer of CD4(+) T cells aggravates atherosclerosis in immunodeficient apolipoprotein E knockout mice. *Circulation* 2000;102:2919-22.
120. Gupta S, Pablo AM, Jiang X, Wang N, Tall AR, Schindler C. IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *The Journal of clinical investigation* 1997;99:2752-61.
121. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nature reviews Immunology* 2006;6:508-19.

122. Buono C, Come CE, Stavrakis G, Maguire GF, Connelly PW, Lichtman AH. Influence of interferon-gamma on the extent and phenotype of diet-induced atherosclerosis in the LDLR-deficient mouse. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2003;23:454-60.
123. Ait-Oufella H, Salomon BL, Potteaux S, et al. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nature medicine* 2006;12:178-80.
124. Nofer JR, Bot M, Brodde M, et al. FTY720, a synthetic sphingosine 1 phosphate analogue, inhibits development of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 2007;115:501-8.
125. Keul P, Tolle M, Lucke S, et al. The sphingosine-1-phosphate analogue FTY720 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2007;27:607-13.
126. Bot M, Van Veldhoven PP, de Jager SC, et al. Hematopoietic sphingosine 1-phosphate lyase deficiency decreases atherosclerotic lesion development in LDL-receptor deficient mice. *PloS one* 2013;8:e63360.
127. Keul P, Lucke S, von Wnuck Lipinski K, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor 3 promotes recruitment of monocyte/macrophages in inflammation and atherosclerosis. *Circulation research* 2011;108:314-23.
128. Skoura A, Michaud J, Im DS, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor-2 function in myeloid cells regulates vascular inflammation and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2011;31:81-5.
129. Rusch T. Auswirkungen von Haltungssystemen auf die Reproduktion und das Verhalten von Mäusen bei unterschiedlichen Käfiganreicherungen am Modell der DBA / 2 Maus. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover 2003.
130. Sternberg N, Hamilton D. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *Journal of molecular biology* 1981;150:467-86.
131. Sauer B, Henderson N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988;85:5166-70.
132. Metzger D, Chambon P. Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods* 2001;24:71-80.
133. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 1996;87:1161-9.
134. Sato TN, Qin Y, Kozak CA, Audus KL. Tie-1 and tie-2 define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993;90:9355-8.
135. Schnurch H, Risau W. Expression of tie-2, a member of a novel family of receptor tyrosine kinases, in the endothelial cell lineage. *Development* 1993;119:957-68.

136. Wong AL, Haroon ZA, Werner S, Dewhirst MW, Greenberg CS, Peters KG. Tie2 expression and phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circulation research* 1997;81:567-74.
137. Kisanuki YY, Hammer RE, Miyazaki J, Williams SC, Richardson JA, Yanagisawa M. Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo. *Developmental biology* 2001;230:230-42.
138. Allende ML, Bektas M, Lee BG, et al. Sphingosine-1-phosphate lyase deficiency produces a pro-inflammatory response while impairing neutrophil trafficking. *J Biol Chem* 2011;286:7348-58.
139. Shmerling D, Danzer CP, Mao X, et al. Strong and ubiquitous expression of transgenes targeted into the beta-actin locus by Cre/lox cassette replacement. *Genesis* 2005;42:229-35.
140. Ionac M. One technique, two approaches, and results: thoracic duct cannulation in small laboratory animals. *Microsurgery* 2003;23:239-45.
141. Cahalan MD, Parker I, Wei SH, Miller MJ. Two-photon tissue imaging: seeing the immune system in a fresh light. *Nature reviews Immunology* 2002;2:872-80.
142. Zemann B, Kinzel B, Muller M, et al. Sphingosine kinase type 2 is essential for lymphopenia induced by the immunomodulatory drug FTY720. *Blood* 2006;107:1454-8.
143. Berdyshev EV, Gorshkova IA, Garcia JG, Natarajan V, Hubbard WC. Quantitative analysis of sphingoid base-1-phosphates as bisacetylated derivatives by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical biochemistry* 2005;339:129-36.
144. Luttmann W BK, Küpper M, Myrtek D. *Der Experimentator - Immunologie* (3.Auflage). 2009.
145. Tang Y, Harrington A, Yang X, Friesel RE, Liaw L. The contribution of the Tie2+ lineage to primitive and definitive hematopoietic cells. *Genesis* 2010;48:563-7.
146. Tammela T, Saaristo A, Lohela M, et al. Angiopoietin-1 promotes lymphatic sprouting and hyperplasia. *Blood* 2005;105:4642-8.
147. Vogel P, Donoviel MS, Read R, et al. Incomplete inhibition of sphingosine 1-phosphate lyase modulates immune system function yet prevents early lethality and non-lymphoid lesions. *PloS one* 2009;4:e4112.

10. Danksagung

Allen voran bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Steffen Massberg für die Gelegenheit bin seinem Labor an der Medizinischen Klinik und Poliklinik I zu promovieren. Herr Massberg stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite und verbreitet stets einen elektrisierenden Enthusiasmus in Bezug auf die Bearbeitung wissenschaftlicher Fragestellungen.

Des weiteren gilt mein Dank Frau Dr. med. vet. Nicole Urtz für die insgesamt 4-jährige Betreuung am Deutschen Herzzentrum München sowie am Klinikum Großhadern. Als Student der Humanmedizin ist für mich das wissenschaftliche Arbeiten im Labor komplettes Neuland gewesen. Frau Urtz führte mich äußerst geduldige an die Methoden, sowie die theoretischen Grundlagen meiner Dissertation heran.

Zudem danke ich Herrn Michael Lorenz, Herrn Dr. med. Florian Gärtner, Herrn Dr. med. Konstantin Stark, Frau Wenwen Fu sowie allen weiteren Doktoranden und Mitarbeitern der AG Massberg für die tägliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Zum Schluss gilt mein Dank meiner Familie sowie meinen guten Freunden und Kommilitonen die mich durch die letzten 6 Jahre begleitet haben und mit denen ich eine fantastische Studienzeit verbringen durfte. Besonders zu nennen sind hier Herr Johannes Dorr, Frau Dr. med. Sophie Kirchner sowie alle Mitglieder der Studentenvereinigung "SMC".

Eidesstattliche Versicherung

Johannes Beil

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema
Die Rolle der Sphingosin-1-phosphat Lyase (S1PL) in der Migration von Lymphozyten innerhalb lymphatischer Organe

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 17.08.2017

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand