

Aus dem Institut für Pharmakologie und Klinischer Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor Prof. Dr. Jens W. Fischer

Die Freisetzung von Sphingosin-1-Phosphat aus humanen Thrombozyten ist von
der Thromboxanbildung abhängig

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Thomas Ulrych

2016

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. :

Dekan: Univ. - Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Erstgutachter: Univ. - Prof. Dr. med. Bernhard Rauch

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Rainer Haas

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Release of sphingosine-1-phosphate from human platelets is dependent on thromboxane formation

Ulrych T, Böhm A, Polzin A, Daum G, Nüsing RM, Geisslinger G, Hohlfeld T, Schrör K, Rauch BH.

Journal of Thrombosis and Haemostasis.2011 Apr; 9(4):790-8.

Inhaltsverzeichnis:

1.	Einleitung	7
1.1	Die Bedeutung des Thrombozyten in der Hämostase	7
1.2	Zusammenspiel von Thrombozyten und plasmatischer Gerinnung	11
1.3.	Funktionen thrombozytärer Botenstoffe jenseits der Hämostase	11
1.4	Acetylsalicylsäure	12
1.5.	Sphingosin-1-Phosphat	13
1.6.	Rolle des thrombozytären S1P in der Entwicklung der Arteriosklerose	14
1.7.	Fragestellung der Arbeit	15
2.	Material und Methoden	17
2.1	Substanzen	17
2.2	Puffer und Lösungen	18
2.3	Präparation humaner Thrombozyten und Lipidisololation	18
2.4	Dünnschichtchromatografie	19
2.5	Durchflusszytometrie	20
2.6	Isolierung humaner Monozyten und Zellkultur	20
2.7	Präparation muriner Plättchen	21
2.8	Massenspektrometrie	22
2.9	Plättchenaggregation	22
2.10	Thromboxanmessung	23
2.11	Zellmigration	24
2.12	si-RNA vermitteltes Gen-silencing der S1P Rezeptoren	25
2.13	Isolierung von Gesamt-RNA aus Monozyten	25

2.14	Quantifizierung von RNA und Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	26
2.15	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	26
2.16	Statistik	26
3.	Ergebnisse	28
3.1	S1P Freisetzung aus Thrombozyten und ihre Thromboxansynthese	28
3.1.1	Die Stimulation mit PAR-1-AP führt zur S1P Freisetzung aus Thrombozyten	28
3.1.2	Acetylsalizylsäure reduziert den S1P Export aus humanen Thrombozyten	29
3.1.3	ASS hemmt die thrombozytäre Thromboxansynthese nach der Stimulation mit PAR-1-AP	31
3.1.4	ASS hemmt gleichermaßen die Freisetzung von [³ H]-S1P und endogenem S1P	32
3.1.5	Einfluss weiterer Plättchenaktivatoren auf die S1P Freisetzung	33
3.1.6	S1P Export aus menschlichen Thrombozyten wird über ABC-Transporter vermittelt	34
3.1.7.	Einfluss von Dipyridamol und Indomethacin auf die Thromboxansynthese	35
3.1.8	S1P Export ist abhängig von der Protein Kinase C	36
3.2	Plättchendegranulation	37
	S1P Freisetzung aus Plättchen ist unabhängig von ihrer Degranulation	37
3.3	Plättchenaggregation	38
	Die Plättchenaggregation ist unabhängig von einer Vorbehandlung mit ASS	38
3.4	Charakterisierung der S1P Freisetzung aus murinen Thrombozyten mit einem knock-out des Thromboxanrezeptors	39

3.4.1	S1P Freisetzung aus murinen Thrombozyten ist thromboxanabhängig	39
3.4.2	Plättchen mit einem Knock-out des Thromboxanrezeptors setzen weniger S1P frei	39
3.5	Migration von Monozyten	42
	Thrombozytenüberstände mit einem reduzierten S1P Gehalt führen zu einer Beeinträchtigung der Migration menschlicher Monozyten	42
4	Diskussion	46
4.1	Pathophysiologische Bedeutung von S1P	46
4.2	Aspirin hemmt die Freisetzung von S1P aus Thrombozyten	46
4.3	Mechanismus der S1P Freisetzung	47
4.4	Bedeutung von S1P für die Plättchenfunktion	49
4.5	Aspirin hemmt die Freisetzung von S1P – mögliche Effekte auf Patienten	49
4.6	Untersuchungen in Thromboxanrezeptor-Knock-out Mäusen	51
4.7	Einfluss von thrombozytärem S1P auf humane Monozyten	51
4.8	Ausblick – Möglicher Einfluss von thrombozytärem S1P auf humane Endothelzellen	53
5	Literaturverzeichnis	54
6	Veröffentlichung	61
7	Eidesstattliche Erklärung	63

Einleitung:

1.1 Die Bedeutung des Thrombozyten in der Hämostase

Die grundlegende Aufgabe von Thrombozyten ist die Sicherstellung der Hämostase. Es handelt sich um etwa 1 – 4 µm große, scheibenförmige Zellfragmente, welche von Megakaryozyten im Knochenmark abgeschnürt werden und in das Blut übertreten (Triplett et al, 2000). Ihre Lebensdauer beträgt 5 – 10 Tage, voraus gesetzt, dass sie während einer Gerinnungssituation nicht verbraucht werden. Ihre Neubildung wird über das Glykoprotein Thrombopoetin reguliert, welches vor allem von Hepatozyten gebildet wird und grundsätzlich eine konstante Konzentration im Blut aufweist (Sungaran R et al, 1997). Da der Thrombopoietinrezeptor sowohl auf Blutplättchen selbst als auch auf Megakaryozyten vorhanden ist, kommt es bei einer Thrombozytopenie durch eine verminderte Absättigung des Hormons an der Thrombozytenoberfläche zu einem Anstieg des freien Hormons und somit zu einer verstärkten Bindung an Megakaryozyten. Diese bilden auf den nun stärker vorhandenen Reiz zunächst Proplättchen, von welchen sich Thrombozyten abschnüren. Ihre Konzentration im Blut beträgt ungefähr 150 – 400.000 Plättchen/ µl und kann beim Vorliegen einer Entzündung ansteigen (Wolber et al, 2002). Ursächlich hierfür ist eine Thrombopoietinproduktion, die über Zytokine aus der Akut-Phase-Reaktion gesteigert wird.

Bei den Thrombozyten liegen die Zellorganellen wie Mitochondrien oder Speichergranula in der Mitte, während sich in der Peripherie ein ringförmiges Bündel von Mikrotubuli findet. Darüber hinaus gibt es ein offenes und ein geschlossenes Membransystem. Bei dem Offenen handelt es sich um Einstülpungen der Plasmamembran, die den Speicherorganellen ermöglichen ihren Inhalt nach außen zu entleeren, wenn es zu einer Aktivierung des Blutplättchens kommt (White JG et al, 1992). Das geschlossene Membransystem ist ein Überbleibsel des rauen endoplasmatischen Retikulums der Megakaryozyten, das als Reservoir für Kalzium dient und dieses für eine Degranulation der Speichervesikel und für die Neuordnung von Aktin und Myosinfilamenten bereithält. Kommt es zu einer Thrombozytenaktivierung, so ändert sich die Form eines Blutplättchens und es bilden sich Pseudopodien aus, über welche eine Adhäsion an die extrazelluläre Matrix oder eine Aggregation an weitere aktivierte Thrombozyten stattfinden kann. Vermittelt wird eine Plättchenaktivierung über lösliche Stoffe, wie ADP oder Thromboxan A₂, oder über Komponenten der extrazellulären Matrix, wie dem Kollagen oder dem von-Willebrand-Faktor. Besteht eine Abdichtung der extrazellulären Matrix durch Endothelzellen, bleiben Thrombozyten in ihrer ruhenden Form. Liegt jedoch eine Endothelläsion vor, erkennen

Thrombozyten über diverse Rezeptoren Bestandteile der extrazellulären Matrix und es setzt die so genannte primäre Hämostase ein (Pinedo HM et al, 1998). Bei diesem Vorgang kommt es zu Bindungen zwischen Kollagen und dem thrombozytären Integrin-Rezeptors A2B1 sowie zwischen dem von-Willebrand-Faktor und dem Glykoprotein 1b Rezeptor. Durch diese Bindungen wird eine Adhäsion von Thrombozyten an der EZM vermittelt (Merten M et al, 1999). Sowohl die Affinität zwischen den Bindungspartnern als auch die Rezeptordichte spielen für das Anheften unter arteriellen Strombedingungen eine Rolle. Diese Interaktionen führen zu einer Aktivierung der Thrombozyten. Neben den morphologischen sind damit vor allem biochemische Veränderungen gemeint. Kollagenrezeptoren führen zu einer intrazellulären Signalkaskade, welche u. a. die Phospholipase A2 aktivieren, die wiederum Arachidonsäure aus der Plasmamembran loslöst (Moriyama T et al, 1994). Letztere wird in Thrombozyten über eine Abfolge von biochemischen Reaktionen schließlich durch die Thromboxan-Synthase in Thromboxan umgewandelt, das einerseits den Aktivierungsgrad des Thrombozyten verstärkt sowie andererseits ruhende Thrombozyten aktiviert und für die Hämostase rekrutiert. Darüber hinaus führt Thromboxan zu einer Vasokonstriktion, welche die Kontaktwahrscheinlichkeit mit weiteren Plättchen erhöht und somit das Wachstum eines Thrombus fördert. Außerdem werden über intrazelluläre Signalkaskaden Schlüsselenzyme wie die Phospholipase C oder die Adenylatzyklase aktiviert, welche einen Kalziumausstrom aus dem geschlossenen Membransystem in das Zytosol bewirken. Das intrazelluläre Kalzium ist für die Degranulation und für die Ausbildung von Pseudopodien notwendig, indem es über eine Neuordnung der Aktin und Myosinfilamente für eine Vergrößerung der thrombozytären Oberfläche und damit für eine stärkere Abdeckung der EZM sorgt. Während des Aktivierungsvorgangs ändert der Fibrinogenrezeptor GP2b3a seine Konformation, was eine Bindung mit Fibrinogen ermöglicht (Fitzgerald DJ, 2001). Über ein gebundenes Fibrinogenmolekül kann der Thrombozyt mit einem anderen aktivierten Thrombozyten, eine Bindung eingehen, womit es zu einer Aggregation kommt. Eine solche Bindung ist noch reversibel. Erst nach der Degranulation mit einer Freisetzung von Thrombospondin kommt es durch eine enzymatische Vernetzung der Fibrinogenbindung zu einer irreversiblen Aggregation.

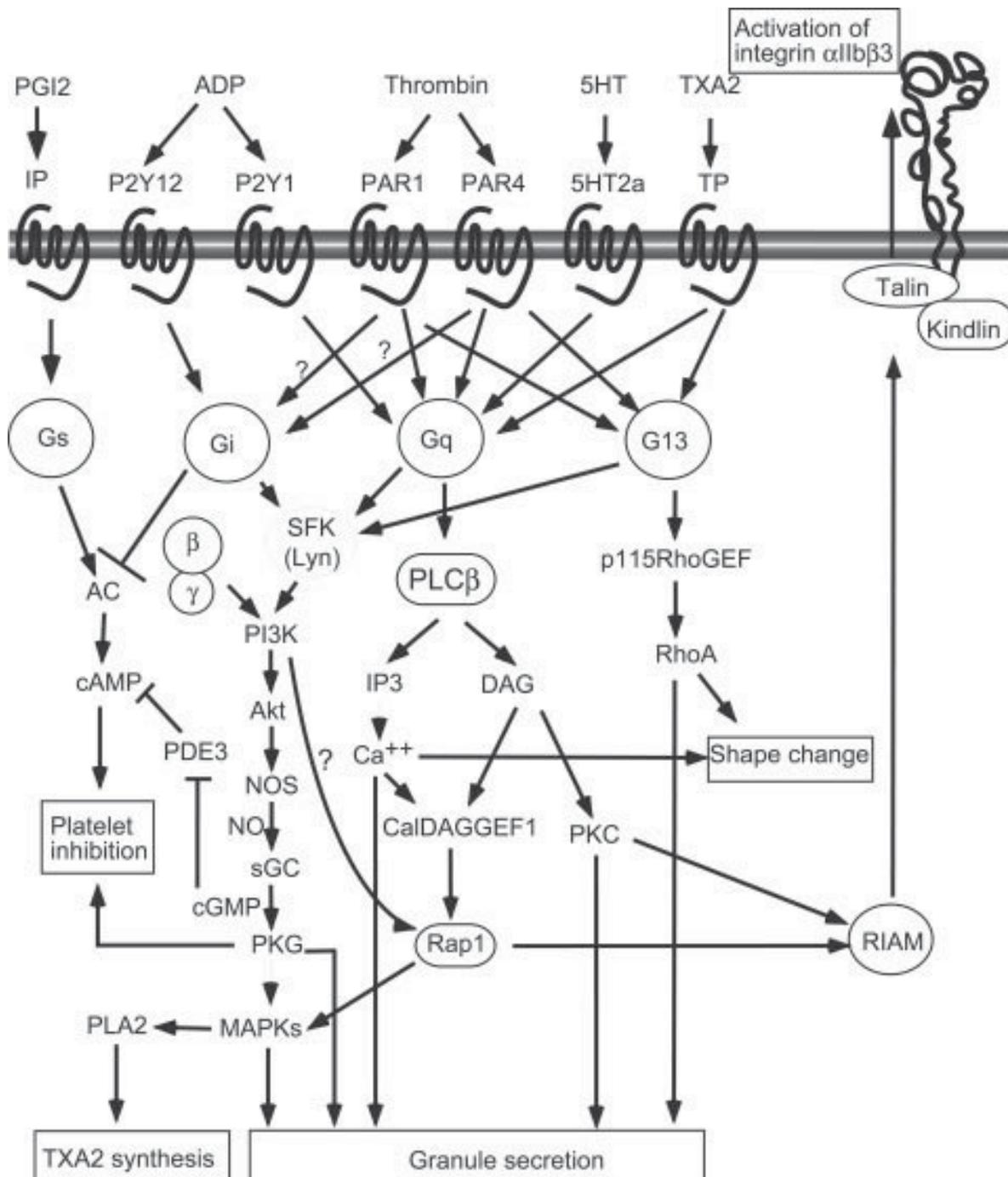


Abbildung 1.1: Signalwege der Plättchenaktivierung über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (aus Li Z. et al 2010)

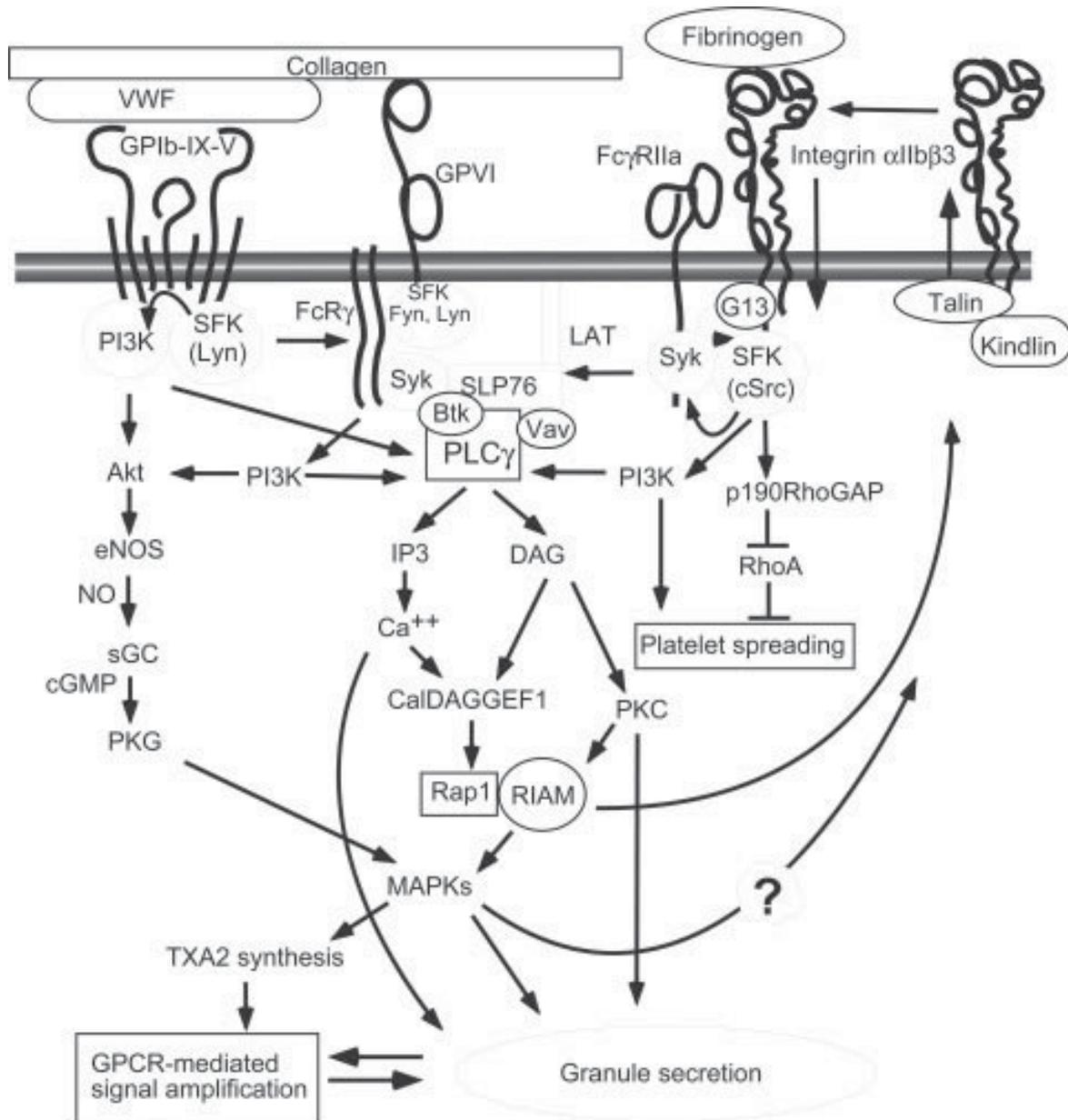


Abbildung 1.2: Signalwege wesentlicher thrombozytärer Adhäsionsrezeptoren (aus Li Z. et al 2010)

1.2 Zusammenspiel von Thrombozyten und plasmatischer Gerinnung

Aktivierte Thrombozyten sind die Voraussetzung für die sekundäre Hämostase, bei der es zu einem Zusammenspiel der Gerinnungsfaktoren kommt. Auf der Thrombozytenoberfläche kommt es durch den Aktivierungsvorgang zu einer Umlagerung der Lipide des zytosolischen Teils der Plasmamembran auf die äußere Seite. Dabei gelangen negativ geladene Lipide wie Phosphatidylcholin oder Phosphatidylethanolamin an die Zelloberfläche. Hier stehen sie als Bindungspartner für die Gerinnungsfaktoren zur Verfügung. Dabei wird zunächst ein Komplex aus dem gewebständigen Faktor III und aktiviertem Faktor VII gebildet, welcher den im Blut zirkulierenden Faktor X aktiviert. Dieser stellt geringe Mengen von Thrombin bereit, welches über Proteinase-aktivierte Rezeptoren (PAR) als starker Plättchenaktivator fungiert (Sambrano GR et al, 2001). Thrombin aktiviert anschließend Faktor VIII und Faktor XI, welche mit Kalzium einen Komplex auf der Thrombozytenoberfläche eingehen und größere Mengen von Faktor Xa herstellen. Dieser bildet zusammen mit Kalzium und Gerinnungsfaktoren, wie dem Faktor V einen Komplex, die Thrombokinase, die zur Synthese großer Mengen von Thrombin führt. Dieses bewirkt auf enzymatischem Weg die Umwandlung von löslichem Fibrinogen zu Fibrinmonomeren, welche zusammen mit Kalzium und Fibrinopeptiden polymerisieren und Fibrinnetze ausbilden. Die Festigkeit des Gerinnsels wird über den Faktor XIII vermittelt, welcher kovalente Bindungen zwischen den Fibrinmonomeren erzeugt.

1.3 Funktionen thrombozytärer Botenstoffe jenseits der Hämostase

Interessanterweise enthalten die verschiedenen thrombozytären Granula, wie α - oder dense Granula nicht nur proaggregatorische oder prothrombotische Stoffe, sondern auch Wachstumsfaktoren wie den platelet-derived growth factor (PDGF), den transforming growth factor (TGF β) oder den vascular endothelial growth factor (VEGF), die u. a. Endothelzellen, glatte Muskelzellen oder Fibroblasten zur Proliferation und Migration anregen (Pinedo HM et al. 1998). Auch Abwehrzellen wie Monozyten werden über MIP-1 oder PF4 zu Orten mit aktivierten Gerinnungsprozessen gelockt (Hoh BL et al, 2011). Neben ihrer proinflammatorischen Eigenschaft können Thrombozyten während der Blutgerinnung damit einen Reiz für anschließende Reparationsvorgänge setzen. Damit sind die Beseitigung von Granulationsgewebe und das Einsprossen von Kapillaren gemeint. Die genannten Zytokine und Wachstumsfaktoren spielen nicht nur während der Gerinnung und der anschließenden Konsolidierung des Gewebes eine Rolle, sondern sind wesentlich am Fortschreiten einer Atherosklerose beteiligt. Bei dieser Erkrankung handelt es sich um eine langsame

entzündlich-degenerative Arterienerkrankung, die sich hauptsächlich in der Intima und der angrenzenden Media abspielt. Als Ursache wird eine so genannte „endotheliale Dysfunktion“ angenommen, welche unter anderem über eine reduzierte Produktion von antiaggregatorischen Stoffen wie Prostacyclin oder NO verursacht wird (Ross et al, 1999). Dadurch kann an der Zelloberfläche leichter eine Thrombozytenaggregation stattfinden, bei welcher die oben genannten Mediatoren freigesetzt werden und die Produktion von Adhäsionsmolekülen wie ICAM oder VCAM verursachen (Che J et al 2011), an welche Monozyten binden und in die Intima des Gefäßes einwandern. Sie erhalten einen entzündlichen Zustand aufrecht, indem sie Radikale wie das Superoxid anion bilden. Dabei wird LDL oxidiert und von den Monozyten phagozytiert, die sich in Folge dessen zu den charakteristischen Schaumzellen entwickeln. Die von Thrombo- und Monozyten freiwerdenden Zytokine regen glatte Muskelzellen zur Migration in die Intima an und führen zu einer verminderten Elastizität der Gefäße. Blutplättchen werden als wesentliche Komponente bei der Entstehung und für das Fortschreiten der Atherosklerose angesehen, weshalb plättchenhemmende Medikamente eine wichtige Rolle bei der Therapie dieser Erkrankung spielen.

1.4 Acetylsalicylsäure

Die Acetylsalicylsäure ist ein irreversibler Hemmstoff der Cyclooxygenase (Schrör K 1997). Bei Anwendung kommt es durch Acetylierung des Enzyms zu seinem Funktionsverlust, weil Arachidonsäure nicht mehr zu Prostaglandin G₂ katalysiert werden kann und auf die Weise die weitere Prostaglandinsynthese aufgehoben ist. Insbesondere fehlt die thrombozytäre Thromboxan A₂ Produktion, welche für die Plättchenaggregation und die Vasokonstriktion mit verantwortlich ist. Relativ kleine Mengen, wie 100 mg/ d, reichen aus, um eine Aggregationshemmung ohne relevante systemische Nebenwirkungen zu erzielen. Dieser Umstand ist auf eine kurze Halbwertszeit und einen hohen „first-pass“ Effekt der Substanz zurückzuführen. Während auf die im Portalblut vorhandenen Thrombozyten die volle Dosis wirkt, erfährt der systemische Kreislauf eine geringere Belastung (Pedersen AK et al. 1984) durch dieses Medikament und insbesondere die endotheliale Prostacyclinsynthese ist nur gering beeinträchtigt. Die irreversible Hemmung der COX macht ASS gegenüber anderen COX-Inhibitoren wie Diclofenac, Indomethacin oder Ibuprofen für die Anwendung besonders geeignet, da eine einmalige tägliche Gabe ausreicht. Die verminderte Aggregationsfähigkeit sorgt nicht nur für eine partielle Hemmung der Hämostase, sondern auch zu einer verminderten Sekretion von Zytokinen. Dabei wird die Degranulation eines einzelnen

Plättchens nicht durch ASS verhindert, da dieser nicht abhängig von der Bildung von Thromboxan ist.

1.5 Sphingosin-1-Phosphat

Nicht alle Wachstumsfaktoren, welche von Thrombozyten sezerniert werden, sind in Granula gespeichert. In diese Kategorie fällt die Substanz Sphingosin-1-Phosphat (Kobayashi N et al. 2006). Bei diesem Molekül handelt es sich um ein polares Lipid, welches bioaktive Eigenschaften besitzt. Es kommt ubiquitär vor, wobei hohe Konzentrationen im Serum bzw. im Blutplasma zu finden sind. Es wird über die Sphingosin-Kinase synthetisiert, welche in zwei Isoformen vorkommt (Maceyka M et al. 2005). Das Enzym ist im Zytosol lokalisiert, wird jedoch von Endothelzellen konstitutiv in das Blut sezerniert (Venkataraman K et al. 2008), wo es am Aufbau des zwischen Blut und Gewebe vorhandenen S1P Gradienten beteiligt ist. S1P führt zu einer reduzierten Fenestrierung von Endothelzellen (Shaphorst KL et al. 2003), die bei einer verbesserten Abdichtung der Intima eine Thrombozytenaktivierung reduzieren. In Zellen wird die Aktivität der Sphingosin-Kinase durch TNF- α (Xia P et al. 1999) oder EGF positiv reguliert, da S1P als ein second messenger fungieren kann. Darüber hinaus besitzen Zellen zwei abbauende Enzyme, die S1P-Lyase und die S1P-Phosphatase, welche die S1P Konzentration senken. Blutplättchen und Erythrozyten (Ito K et al. 2007) besitzen keine abbauenden Enzyme und die Sphingosin-Kinase ist daueraktiv. Beide Umstände resultieren in einer Akkumulation von Sphingosin-1-Phosphat. Während Erythrozyten S1P in einem begrenzten Umfang konstitutiv sezernieren können und dieses passiv bei einer Hämolyse verstärkt freisetzen, können Thrombozyten nach Stimulation mit Thrombin oder anderen Stimuli (Yatomi Y et al. 1995), die eine Aktivierung der Protein Kinase C bewirken, S1P aktiv in ihre Umgebung sezernieren. Dabei ist festzuhalten, dass die Halbwertszeit von S1P im Plasma ungefähr 20 min. beträgt und durch Ektophosphatasen begrenzt wird. Da es sich um ein tendenziell hydrophobes Lipid handelt, geht es eine Bindung mit Albumin oder mit Lipoproteinen ein (Kimura T et al. 2001), wodurch sich die Halbwertszeit verlängert. Seine Wirkung wird über fünf verschiedene plasmamembranständige Rezeptoren vermittelt, welche an G-Proteine gekoppelt sind und intrazelluläre Kaskaden auslösen. Der S1P1 Rezeptor kann beispielsweise über die second messenger Rac und Akt Endothelzellen zur Proliferation, Migration oder zur Angiogenese über eine Bildung von Tubes anregen (Wang F et al. 1999, English D et al. 1999). Diese gelten als Vorstufen sich bildender Kapillaren. Darüber hinaus wird durch die

Rezeptoraktivierung die Permeabilität eines Endothelzell-Monolayers verringert. Der S1P2 Rezeptor scheint ein Widersacher der genannten Effekte zu sein. Die Bindung vermindert die Zellmigration und steigert die Permeabilität. Da die Affinität von S1P zum S1P2R deutlich geringer ist als zum S1P1 Rezeptor, wird postuliert, dass über eine Expression des S1P2R ein Schutz vor einer Überstimulation vermittelt wird. Die unterschiedliche Anordnung der Rezeptoren führt zu unterschiedlichen zellulären Antworten auf ein und denselben Reiz hin und erklärt so die vielfältigen Eigenschaften des Lipids. Neben den bereits angesprochenen Wirkungen ist S1P ein wichtiger Mediator für das Homing von Lymphozyten (Matloubian M et al. 2004). So konnte gezeigt werden, dass durch eine Überexpression von S1P1 Rezeptoren auf T-Lymphozyten diese im stärkeren Maß im Blut verbleiben, während eine verminderte Expression die Lymphozyten in den Lymphknoten verweilen lässt, was im Blut zu einer Lymphozytopenie führt. Mit Fingolimod steht ein Medikament zur Verfügung, das als funktioneller Antagonist an S1P Rezeptoren bereits für die Therapie der Multiplen Sklerose genutzt wird. Nach der Bindung von Fingolimod werden die S1P-Rezeptoren internalisiert (Aktas O et al. 2010). Durch eine Hemmung der Dissoziation und des damit ausbleibenden Recyclings kommt es zu einer Depletion von membranständigen S1P-Rezeptoren auf Lymphozyten. Die Zellen können auf S1P als Chemokin nicht mehr reagieren und somit auch dem Konzentrationsgefälle zwischen Blut und Gewebe entlang nicht folgen. So bleiben sie in den sekundären lymphatischen Organen, was letztlich einer Immunsuppression entspricht und bei den Patienten nicht nur zu weniger Läsionen im ZNS führt, sondern auch die Häufigkeit der Schübe reduziert.

1.6 Rolle des thrombozytären S1P in der Entwicklung der Arteriosklerose

Es liegen zurzeit verschiedene, sich teilweise widersprüchliche Daten zur Frage, aus welchen Quellen sich das im Blut vorhandene S1P speist. Während einerseits das Endothel über die bereits oben aufgeführte konstitutive Externalisierung der Sphingosin-Kinase als Bildungsort in Frage kommt (Venkataraman et al, 2008), sprechen die Ergebnisse anderer Untersuchungen eher für Erythrozyten (Hänel et al, 2007) und Thrombozyten (Yatomi et al, 2000) als der hauptsächlich führenden Komponente. Selbst wenn der Plasmaspiegel nicht in erster Linie durch Thrombozyten beeinflusst sein sollte, so können sie diesen kurzfristig erhöhen und am Ort ihrer Aktivierung einen Konzentrationsgradienten aufbauen, um so beispielsweise Zellen des Immunsystems anzulocken (Gude DR et al. 2008). In diesem Zusammenhang sind vor allem Monozyten zu nennen, welche eine Schlüsselrolle bei der Entstehung und beim Fortschreiten der Arteriosklerose spielen. Ungeachtet des chemokinetischen Reizes auf

Monozyten wirkt S1P auch auf Endothelzellen stimulierend mit einer verstärkten Expression von E-Selektin (Wang F et al. 1999, English D et al. 1999), das die Adhäsion von Monozyten über ESL-1 am Endothel begünstigt und deren Diapedese fördert. Darüber hinaus führt S1P zu einer verstärkten Bildung von MCP-1 und Il-8 durch Endothelzellen, die selbst als Chemokine in der Lage sind weitere Monozyten anzulocken (Lin CI et al. 2006).

In einer Arbeit von Cyrus T et al. von 2002 konnte gezeigt werden, dass die Verabreichung von Aspirin zu einer Abnahme der NF-KB Aktivität und zu einer verringerten Zahl von Monozyten in Gefäßschnitten von Mäusen führt. Dieser Transkriptionsfaktor bewirkt die Steigerung der Expression von proinflammatorischen Zytokinen, wie MCP-1 oder TNF- α . Ihre Konzentrationen waren folglich vermindert. In anderen Untersuchungen konnte die Hemmung von NF-Kappa-B nur durch eine hohe Dosis von Aspirin erzielt werden (Cayatte AJ et al. 2000, Paul A et al. 2000). Daher besteht zurzeit keine eindeutige Erkenntnis, über welchen Mechanismus die Verminderung der Atherosklerose durch Aspirin verursacht wird. Möglicherweise wird dieser Effekt nicht durch eine direkte Interaktion zwischen Aspirin und den Gefäßzellen verursacht, sondern es besteht eine indirekte Wirkung, die durch Thrombozyten vermittelt wird. Diese zeichnen sich durch eine nicht funktionierende Cyclooxygenase aus und könnten über ihre reduzierte Funktion weniger stark mit Zellen der Gefäße interagieren. Ob durch Aspirin weitere Funktionen des Thrombozyten – möglicherweise über indirekt beeinflusste Signalsysteme wie S1P beeinflusst werden, ist bislang unbekannt und wurde in der vorliegenden Dissertation untersucht.

1.7 Fragestellung der Arbeit

Thema der vorliegenden Dissertation war zunächst die Untersuchung eines möglichen Effektes von Aspirin auf die Freisetzung von S1P aus dem Thrombozyten. Nachdem dieser initiale Nachweis geführt war, erfolgten die Aufklärung des Mechanismus der thrombozytären S1P-Sekretion sowie eine weitere Charakterisierung der beteiligten intrazellulären Signalwege. Hierbei konnte eine thromboxanabhängige Freisetzung von S1P nachgewiesen werden, die durch Aspirin gehemmt wird. Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte auch die physiologische Bedeutung des aus Thrombozyten stammenden S1P untersucht werden. Es zeigte sich, dass aus Thrombozyten freigesetztes S1P vermutlich keine grundlegende Bedeutung für die Aktivierung weiterer Plättchen besitzt. Um die Bedeutung des aus Blutplättchen freigesetzten S1P weiter zu erfassen, wurde sein Effekt auf humane Monozyten untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass

thromboxanabhängig freigesetztes S1P einen modulierenden Einfluss auf die Aktivität humaner Monozyten besitzt, die durch Aspirin indirekt beeinflusst wird. Die klinische Bedeutung der durch Aspirin beeinflussten S1P Freisetzung, insbesondere ob hierdurch mögliche anti-inflammatorische oder anti-atherosklerotische Effekte des Aspirins, die sich in klinischen Studien zeigen erklärbar sind, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Material und Methoden

2.1 Substanzen

[3H] Sphingosin	Perkin Elmer, Rodau
Acetylsalicylsäure	Bayer, Wuppertal
BAPTA/AM	Calbiochem, San Diego, USA
BSA	Sigma Aldrich, München
Butanol	Sigma Aldrich, München
Citronensäure	Sigma Aldrich, München
Dichlormethan	Sigma Aldrich, München
Dynabeads® human Monocyteskit	Invitrogen, Carlsbad, USA
Dypridamol	Calbiochem, San Diego, USA
Essigsäure	Sigma Aldrich, München
Ficoll-Paque™ PLUS	GE Healthcare, München
GFX109203X	Calbiochem, San Diego, USA
Glucose	Sigma Aldrich, München
Gö 6976	Calbiochem, San Diego, USA
HEPES	Sigma Aldrich, München
Indomethacin	Calbiochem, San Diego, USA
Kollagen	Nycomed, Linz, Österreich
Methanol	Sigma Aldrich, München
MK571	Calbiochem, San Diego, USA
NaHCO ₃	Sigma Aldrich, München
NaH ₂ PO ₄	Sigma Aldrich, München
PKCβII	Sigma Aldrich, München
Ramatroban	Biozol, Eching
Ro32-0432	Calbiochem, San Diego, USA
Rottlerin	Sigma Aldrich, München
Sphingosin-1-Phosphat	Sigma Aldrich, München
C17 Sphingosin-1-Phosphat	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
S1P1-Rezeptor Antagonist (W146)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
S1P2-Rezeptor Antagonist (JTE-013)	Calbiochem, San Diego, USA
S1P3-Rezeptor Antagonist (CAY10444)	Biozol, Eching

TFLLRN (PAR1-AP)
U-46619 (TX-Rezeptor Agonist)

Biosynthan, Berlin
Calbiochem, San Diego, USA

2.2 Puffer und Lösungen

Die nachfolgend aufgelisteten Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders vermerkt, mit entmineralisiertem Wasser hergestellt.

ACD:

85 mM Trinatriumcitrat x 2 H₂O; 65 mM Citronensäure x H₂O; 111 mM Glucose

Laufmittel 1: Dichlormethan

Laufmittel 2: Butanol, Essigsäure, H₂O im Verhältnis 3:1:1

Lipidlysepuffer: 155mM NH₄Cl, 1mM EDTA, 10mM KHCO₃, pH7,4

PBS: 8mM Na₂HPO₄, 137mM NaCl, 1,4mM KH₂PO₄, 2,68mM KCl, pH7,4

Tyrode Puffer:

134 mM NaCl, 12mM NaHCO₃, 2,9mM KCl, 2mM CaCl₂, 0,36mM NaH₂PO₄, 1mM MgCl₂,
5mM HEPES, 5mM Glukose 1 mg/mL BSA, pH 7,4

Dynabeads® Untouched™ human Monocytes kit:

Antikörpermix mit monoklonalen Antikörpern gegen CD3, CD7, CD16 (a und b), CD19, CD56, CD123 und CD235a (Glycophorin A)

2.3 Präparation humaner Thrombozyten und Lipidisololation

Für die Durchführung der folgenden Versuche lag ein Ethikvotum (#3162) vor, da Blutabnahmen erfolgen mussten. Nach der Einverständniserklärung gesunder Probanden, die in den letzten Wochen keine Medikamente eingenommen haben, wurde venöses Blut entnommen und mit Citrat (ACD) in einem Verhältnis von 1:9 verdünnt. Es erfolgte die Zentrifugation bei Raumtemperatur mit 300 x g über 10 Minuten. Anschließend wurde die obere Phase entnommen, die dem plättchenreichen Plasma entsprach. Dieses wurde in einem Gefäß gesammelt und erst anschließend auf die Reaktionsgefäße verteilt, um keine Variationen der Thrombozytenkonzentration aufzuweisen. Dann fand die Inkubation mit den jeweiligen Inhibitoren bei 37° C über 15 Minuten statt. Daraufhin wurde das PRP für 35

Sekunden mit 1200 x g zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Schließlich wurden die Plättchen in 500 µl Tyrode Puffer resuspendiert. Nun wurden diese für 10 Minuten mit [3H]-Sphingosin (0,2 µCi) inkubiert und dann mit den entsprechenden Plättchenaktivatoren für weitere 10 Minuten stimuliert. Die Reaktion wurde durch eine letzte Zentrifugation über 50 Sekunden mit 1200 x g beendet und die Überstände wurden in ein separates Gefäß überführt. Abschließend wurde jeder Probe 500 µl Lipidlysepuffer hinzugefügt und die Proben wurden bei -20°C weggefroren, bevor mit diesen weiter gearbeitet wurde.

Die Isolation der Lipide fand nach der Methode von Bligh und Dyer von 1959 statt, wobei zu jeder Probe (0,5 ml) 2 ml eines Gemischs aus Chloroform/ Methanol in einem Verhältnis von 1:2 beigemischt wurde. Die Inkubation dauerte 10 Minuten und anschließend wurden jeweils 0,5 ml Chloroform und Essigsäure hinzugefügt. Die erneute Inkubationszeit dauerte 15 Minuten, wobei mehrfaches Schütteln stattfand. Dann erfolgte eine Zentrifugation über 15 Minuten mit 2500 x g und die wässrige Phase wurde verworfen, während das Chloroform der organischen Phase evaporiert wurde. Abschließend erfolgte die Resuspension der Lipide in 10 µl Methanol.

2.4 Dünnschichtchromatografie

Die Dünnschichtchromatografie ist eine Methode, um verschiedene Komponenten einer Probe, wie Lipide, voneinander zu trennen. Sie wurde 1938 von Izmailov und Shraiber entwickelt und in den folgenden Jahrzehnten weiter verfeinert. So wird eine Probe auf eine Kieselgelplatte aufgetragen die als stationäre Phase fungiert. Anschließend läuft eine mobile Phase, wie Butanol, mittels Kapillarkräften die Kieselplatte entlang. Die Probe ist zunächst in der Laufrichtung der mobilen Phase gelöst, wobei die in ihr enthaltenen Stoffe unterschiedlich stark von dem Kieselgel zurückgehalten werden und dadurch letztlich voneinander getrennt werden.

Die in Methanol gelösten Proben wurden auf Silicagel 60 Platten (Macherey-Nagel GmbH, Düren) aufgetragen. Dann wurde die Platte in ein Gefäß gesetzt, das das Laufmittel Dichlormethan/ Aceton (20:1) beinhaltete. Die Trennung dauerte etwa eine Stunde. Anschließend wurde die Platte in das zweite Gefäß mit dem Laufmittel Butanol/ Essigsäure/ Wasser (3:1:1) für etwa eine Stunde gesetzt. Nach der Trocknung wurde die Platte mit dem szintillationsverstärkendem Spray (ENHANCE Spray Surface Autoradiographie Enhancer, Perkin Elmer) versetzt und dann bei -80°C mit Autoradiografiefilmen (KODAKTM BioMax® XAR) bedeckt. Nach etwa drei Tagen wurden die Filme entwickelt und mit einem

GS-800 Calibrierted Densitometer (BioRad, München) gescannt und der unter Zuhilfenahme der QuantityOne Software quantifiziert.

Das [3H]-Sphingosine-1-Phosphat wurde mittels des Rf-Werts des nicht radioaktiven S1P identifiziert. Dabei wurde nicht radioaktives S1P nach der Auftrennung mit einer Kupferfärbung dargestellt, wie es in der Arbeit von [2] beschrieben ist.

2.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt es einzelne Zellen hinsichtlich ihrer Oberflächenproteine zu charakterisieren. So werden Zellen mit einem oder mehreren monoklonalen Antikörpern inkubiert. Falls eine Zelle ein Protein trägt, wogegen sich ein Antikörper richtet, tritt eine Bindung ein. Dabei ist der Antikörper mit einer Fluoreszenz erzeugenden Substanz konjugiert. In einem Durchflusszytometer werden dann einzelne Zellen mit Laserstrahlen definierter Wellenlängen beleuchtet und es wird zeitgleich analysiert, ob Licht einer anderen Wellenlänge emittiert wird. Falls dieses detektiert wird, beweist es die Bindung des jeweiligen Antikörpers an die Zelle und somit auch ein bestimmtes Protein auf ihrer Oberfläche.

In den vorliegenden Untersuchungen wurden sowohl gewaschene murine als auch humane Thrombozyten untersucht. Die Plättchenisolierung erfolgte wie bereits in den oben aufgeführten Schritten. Schließlich wurden gewaschene humane Thrombozyten mit PAR-1-AP über 10 Minuten stimuliert. Anschließend erfolgte die Inkubation entweder mit dem monoklonalen Antikörper gegen das P-Selektin (CD62P) oder gegen das Granulophysin, CD63, über 10 Minuten. Nach zwei Waschschritten erfolgte dann die Analyse mittels des Durchflusszytometers EPICS-XL (Beckmann coulter).

Murine Plättchen wurden ebenfalls wie bereits oben aufgeführt isoliert. Dabei wurden schließlich gewaschene Thrombozyten genutzt und entweder mit Thrombin oder U46619 stimuliert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit CD62.

2.6 Isolierung humaner Monozyten und Zellkultur:

Zur Isolation humaner Monozyten wurde jungen Probanden venöses Blut entnommen und mit Citrat (ACD) in einem Verhältnis von 1:9 versetzt. Anschließend wurde dieses in ein Gefäß mit der sich darin bereits befindlichen Lösung „Ficoll-Paque“ in einem Verhältnis von 1:1 pipettiert. Die „Ficoll-Paque“ Lösung besteht aus einer hydrophilen Polysaccharoselösung, die eine Dichte von etwa 1,077 hat. Dann fand eine Zentrifugation bei Raumtemperatur mit

2000 Umdrehungen pro Minute statt. Mittels dieser werden die unterschiedlichen Blutzellen voneinander getrennt, da sie eine unterschiedliche Dichte aufweisen und die Ficoll Lösung mit ihrer Dichte von 1,077 zwar größer als diejenige der Lympho- und Monozyten, während jedoch kleiner als diejenige der Erythro- und Granulozyten ist. So entstehen die verschiedenen Phasen Serum, Lymphozyten und Monozyten, Ficoll sowie Thrombozyten, Granulozyten und Erythrozyten. Die Phase mit den enthaltenen Monozyten wurde entnommen, während die anderen verworfen wurden. Anschließend wurde die Zellsuspension mit der Lösung "Dynabeads® Untouched™ human Monocyteskit" versetzt. Die darin enthaltenen monoklonalen Antikörper sind mit polystyrenenbeads konjugiert, die magnetische Eigenschaften aufweisen. Die enthaltenen Antikörper binden an alle Zellen, bis auf Monozyten, die negativ für CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123 und CD235 sind. Mittels eines Magneten werden dann die Monozyten von den übrigen Zellen getrennt. Um nachzuweisen, dass sich in den gewonnenen Proben weitestgehend Monozyten befinden, wurde eine durchflusszytometrische Untersuchung durchgeführt, wobei das CD 14 Antigen untersucht wurde. Dieses befindet sich hauptsächlich auf Monozyten und es konnte gezeigt werden, dass nahezu alle gemessenen Zellen positiv für das CD 14 waren.

Nach der Gewinnung der Monozyten wurden die Zellen in RPMI-1640 GlutaMAX™ Zellmedium mit 10% FCS suspendiert.

2.7 Präparation muriner Plättchen

Für die Analyse der S1P Freisetzung wurden ebenfalls murine Thrombozyten genutzt. Diese wurden zum einen genetisch unveränderten Tieren (C57BL/ 6) und zum anderen solchen, die einen knock-out des Thromboxanrezeptors aufwiesen. Beide Gruppen waren was das Alter und das Geschlecht angeht vergleichbar. So lag das Alter der Tiere bei der Durchführung der Versuche zwischen 8 und 10 Wochen. Die Blutentnahmen waren von der örtlichen Tierversuchsanstalt (TVA) genehmigt (Genehmigungsnummer #O 60/07).

Die Versuchstiere wurden durch eine CO₂ Narkose getötet und ihr Blut wurde unmittelbar durch eine rechtsventrikuläre Punktion entnommen. Dabei wurde es mit Citrat in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt. Anschließend wurde analog der oben aufgeführten Präparation humaner Thrombozyten vorgegangen. So wurde zunächst PRP erzeugt und schließlich wurden gewaschene Thrombozyten generiert. Da das gesamte Probenvolumen relativ gering war, wurde eine Verdünnung der Thrombozytensuspension durchgeführt, so dass schließlich eine Konzentration von etwa 200.000 Thrombozyten/ µl vorlag. Diese wurden zunächst 10 Minuten mit [³H]-Sphingosin (0.2 µCi), dann 15 Minuten mit den entsprechenden Inhibitoren

und schließlich 10 Minuten mit den jeweiligen Stimulatoren, U46619 oder Thrombin, inkubiert. Die weitere Aufbereitung der Proben sowie die Lipidisolierung, ihre Auftrennung und ihre Quantifizierung erfolgten analog den oben aufgeführten Ausführungen.

2.8 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie wird zur Ermittlung der Masse eines Teilchens genutzt. Alternativ kann eine Substanz aus einem Gemisch bzw. einer Probe qualitativ und quantitativ erfasst werden.

In der vorliegenden Untersuchung wurden die Proben aus gewaschenen Plättchen mit dem Lipid-Lyse Puffer versetzt und mit Acetonitril vermischt, das eine Fällung der Proteine bewirkte. Anschließend erfolgten ein Zentrifugationsschritt und die Auftrennung der Lipide in einer HPLC Anlage. Dabei kam die „reversedphase“ Methode zum Einsatz, wobei eine Säule mit einer unpolaren Phase genutzt wurde (Zorbax C-8 SB 2.1 50 mm) und Methanol als mobile polare Phase fungierte. Das im Methanol gelöste S1P wurde dann in einem Massenspektrometer (Micromass Quattro Premier XE Tandem Quadrupole) analysiert. So erfolgte zunächst eine Ionisierung und dann die Detektion des Ions m/z 264, das für die Quantifizierung genutzt wurde. Parallel wurde eine bekannte Konzentration des C17-S1P (Avanti Polar Lipids), also einem um ein Kohlenstoffatom reduzierten S1P, analysiert. Hierüber konnten Verluste, wie sie über den Versuchsaufbau entstehen berechnet werden. Der Verlustanteil konnte dann für die Quantifizierung des aus den biologischen Proben stammenden S1P berücksichtigt werden. Somit diente das C17-S1P als interner Standard. [5]

2.9 Plättchenaggregation

Die Plättchenaggregation beschreibt den Vorgang der Bindung einzelner Thrombozyten an einander. Eine Plättchenaggregation findet nach einer Aktivierung von Thrombozyten statt. Diese erfolgt entweder über Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Kollagen oder über lösliche Stoffe wie das Thrombin. Dabei verändert das Blutplättchen seine Form und bildet Pseudopodien aus, die eine Vergrößerung seiner Oberfläche bewirken. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit einer Bindung zu einem weiteren Thrombozyten bzw. deckt einen größeren Bereich der EZM ab. Schließlich erfolgt eine Konformationsänderung des Gp2b/3a Rezeptors, so dass Fibrinogen gebunden werden kann, das die einzelnen Thrombozyten miteinander vernetzt.

Die Messung der Plättchenaggregation erfolgt in einem Licht-Transmissions-Aggregometer (APACT 4004, Haemochrom Diagnostica, Essen). Dabei wird eine Probe mit PRP in einen Lichtstrahlengang gesetzt, während die durch die Probe durchgelassene Lichtmenge aufgezeichnet wird. Die Lösung liegt bei einer Temperatur von 37°C vor und wird mit einem Eisenpartikel mittels eines Magnetfelds gerührt. Die durch das PRP hindurch gelassene Lichtmenge wird als 0% gekennzeichnet. Die maximal durchgelassene Lichtmenge entspricht der Lichttransmission der gleichen Probe, die jedoch keine Plättchen enthält. Diese Probe stellt dann 100% der Lichttransmission dar und entspricht reinem Blutplasma. Das Prinzip dieser Messung wurde bereits 1962 von Born und O'Brien beschrieben.

Nach der Eichung ist das PRP zunächst relativ trüb, da Thrombozyten einzeln homogen in der Lösung vorliegen. Nach ihrer Aktivierung wird die Lösung kurzfristig trüber, was dem sogenannten "shape change" entspricht und die oben beschriebene Oberflächenvergrößerung des Thrombozyten widerspiegelt. Folglich sinkt die Lichttransmission. Anschließend binden die Thrombozyten an einander und es findet die Aggregation statt. Die Lösung wird klarer und die Lichttransmission größer.

In den durchgeführten Analysen wurde das PRP mit PAR1-AP und SIP versetzt und die Lichttransmission wurde nach der Zugabe in Abhängigkeit der Zeit aufgezeichnet.

2.10 Durchführung des Radio-Immunoassays (RIA) zur Bestimmung von Thromboxan A2

Die Bestimmung des Thromboxan A2 erfolgte aus PRP, das wie oben aufgeführt präpariert wurde. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von Thromboxan A2 wird Thromboxan B2, das stabile Produkt nichtenzymatischer Hydrolyse, gemessen. Die Thrombozyten werden zunächst mit Inhibitoren über 15 Minuten vorbehandelt und anschließend für 10 Minuten mit den jeweiligen Agonisten stimuliert. Die Reaktion wird über einen Zentrifugationsschritt und einer Abnahme des Überstands von dem pellet beendet.

Bei der Plättchenaktivierung entsteht über mehrere enzymatische Reaktionen aus der Arachidonsäure das Thromboxan A2, das u.a. proaggregatorische Eigenschaften besitzt. Die quantitative Bestimmung von Thromboxan B2 wurde hier mit einem Kohle-Einfachantikörper-Radioimmunoassay durchgeführt. Dabei wird der Probe, die eine unbekannte Menge von Thromboxan B2 aufweist, eine bekannte Konzentration von radioaktiven, mit Tritium markierten Thromboxan B2 (^3H]-TXB2) zugesetzt. Beide Isotope konkurrieren um eine exakte Menge von Bindestellen an einen spezifischen Antikörper. Den

Konzentrationsverhältnissen entsprechend stellt sich ein Dissoziationsgleichgewicht zwischen [³H]-TXB2 und dem aus der Probe stammenden Thromboxan B2 ein. Nach 16 bis 20 Stunden Inkubationszeit wird nicht gebundenes Thromboxan B2 bzw. [³H]-Thromboxan durch Adsorption an Aktivkohle aus der Probe entfernt, während die Antigen-Antikörper-Komplexe im Überstand verbleiben.

Zur Messung der durch das antikörpergebundene [³H]-Thromboxan B2 emittierten Radioaktivität wird der Überstand mit einer Szintillationslösung inkubiert und die Lichtimpulse werden im Szintillationszähler gezählt. Aus der Zahl der Impulse wird anhand einer Eichkurve auf die Konzentration von Thromboxan B2 in der untersuchten Probe geschlossen. Die Zahl der pro Minute erfassten Lichtimpulse ist dabei umgekehrt proportional zur Konzentration von Thromboxan B2 in der Probe.

2.11 Zellmigration

Das Migrationsverhalten humaner Monozyten und U937 Zellen wurde mittels eines „transwell assays“ durchgeführt.

Dabei wurden entweder Zellen der Zelllinie U937 oder humane Monozyten in einzelne Wells einer 24-Well Zellkulturplatte in einer Konzentration von 1×10^6 / ml ausgesät. Gelöst waren diese in RPMI Medium ohne Zusatz von FCS. Nach 24 h erfolgte die Inkubation mit ausgewählten Substanzen oder mit Thrombozytenüberständen. Dabei wurde zunächst wie oben aufgeführt PRP erzeugt. Die einzelnen Proben wurden mit Inhibitoren versetzt und nach 10 Minuten wurden die Plättchen gewaschen, so dass die Inhibitoren nicht mehr in der Lösung vorlagen. Schließlich wurden die Proben stimuliert und nach 10 Minuten wurden die Überstände in einem Verhältnis von 1:10 in die jeweiligen Wells hinzugegeben. Die Inkubation dauerte 24 h. Danach wurden die Monozyten mittels Trypsin/ EDTA von den Wells gelöst und in RPMI-Medium ohne Serumzusatz resuspendiert. Hinzugegeben wurde Calcein (2 μ M), ein intrazellulärer Stoff mit Fluoreszenzeigenschaft. Nun wurde in jedes Well einer frischen 24-Well Platte 600 μ l RPMI-Medium mit MCP-1 in einer Konzentration von 50 ng/ ml pipettiert. Dann wurden die transwells (BD Biosciences, Heidelberg) in die wells eingesetzt, wobei die Porengröße ihrer Bodenmembran bei 3 μ m lag. Schließlich wurden die Monozyten bzw. die U937 Zellen in die transwells pipettiert. Auf diese Weise lagen zwei Kompartimente vor, wobei das obere Kompartiment die Zellen und das untere das Chemokin enthielt. Die Zellkulturplatte wurde für drei Stunden bei 37°C in den Brutschrank gestellt und die Migration konnte erfolgen.

Abschließend wurden die transwells entfernt und die Unterstände mit den darin enthaltenen migrierten Zellen wurden hinsichtlich ihrer Fluoreszenz mittels eines Fluoroskan Ascent microplate reader (Thermo Labsystems, Oberhausen) analysiert. Dabei entsprach die Leuchtkraft der Anzahl transmigrierter Zellen.

2.12 si-RNA vermitteltes Gen-silencing der S1P Rezeptoren

Die Transfektion von Zellen mit si-RNA hat die Zielsetzung selektiv die Translation einzelner Gene zu unterdrücken und somit Funktionen dieser Gene zu erkennen.

In den folgenden Untersuchungen wurden Monozyten gemäß den oben bereits aufgeführten Schritten isoliert und mit si-RNA transfiziert. Dabei wurden die Zellen in wells einer 6-well Platte mit einer Konzentration von 1×10^7 / ml pipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von si-RNA in einer Konzentration von 30 nM jeweils gegen das Transkript des S1P1 (Qiagen, cat. no SI00376201, Germany), des S1P2 und des S1P3 Rezeptorgens für 24 h (Thermo Scientific Dharmacon; USA). Um sicherzustellen, dass die si-RNA an sich keine Schäden an den Zellen hervorruft, wurde eine unspezifische si-RNA als Kontrollgruppe eingesetzt (Qiagen und Dharmacon). Diese zeigte keine negativen Effekte. Nach der Inkubationszeit wurden die Monozyten dann, wie oben beschrieben, für die Migrationsversuche benutzt.

2.13 Isolierung von Gesamt-RNA aus Monozyten

Um die Wirksamkeit der Transfektion zu überprüfen, wurde 24 Stunden nach der Inkubation die RNA der Monozyten isoliert. Dieser Vorgang erfolgte durch Zugabe von Trizol (Sigma), nachdem das Medium entfernt wurde. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Lysat in autoklavierte Eppendorf-Gefäße überführt und mit 200 μ l Chloroform versetzt. Nach einer kurzen Inkubation erfolgte ein Zentrifugationsschritt über 10 Minuten bei 13000 rpm. 450 μ l der wässrigen Phase wurden abgenommen und die darin gelöste RNA wurde durch Zugabe von 500 μ l Isopropanol ausgefällt. Nach erneuter Zentrifugation für 20 min bei 13000 rpm, wurde das erhaltene RNA-Pellet mit 800 μ l Ethanol gewaschen und erneut über 20 Minuten zentrifugiert (13000 rpm). Im Anschluss wurde das RNA-Pellet an der Luft getrocknet, in Millipore-Wasser (22 μ l) aufgenommen und anschließend im Schüttelinkubator unter kurzzeitiger Erwärmung (65 °C) 5 min gelöst. Die Proben wurden nach Zentrifugation entweder sofort quantifiziert oder bei -20 °C gelagert.

2.14 Quantifizierung von RNA und Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Konzentration und Reinheit der präparierten RNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm in einem Nanodrop ND1000 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bestimmt. Da das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260 nm und das von aromatischen Aminosäuren oder Phenol bei 280 nm liegt, bietet der Quotient aus beiden Absorptionswerten (ratio 260/ 280 nm) eine gute Abschätzung der RNA-Reinheit und sollte zwischen 1,5 und 2 liegen. 1 OD_{260nm} = 40 µg/ ml RNA.

RT-PCR Reaktionen wurden im PCR-Automaten Mastercycler Gradient der Firma Eppendorf durchgeführt. Für alle gezeigten RT-PCR Experimente wurde ein Archive Kit (Applied Biosystems) verwendet. Als interner Standard wurde die Genexpression des GAPDH nachgewiesen. Für jeden RT-PCR-Ansatz (Gesamtvolumen 25 µl) wurden 250 ng Gesamt-RNA eingesetzt.

2.15 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die qPCR wurde in einem Zweischnitt-Protokoll durchgeführt. Im ersten Schritt wurde die cDNA aus 0,5-1 µg RNA nach Angaben des Herstellers (Archive Kit; Applied Biosystems, Darmstadt) synthetisiert. Die Synthese erfolgte in einem *Mastercycler Gradient* (Eppendorf, Hamburg). Die Detektion der cDNA wurde mit dem Sensi-Mix SYBR® Green Reagent (Quantace, London, UK) und QuantiTect® Primer Assays [QT00208733 (S1P1), QT00230846 (S1P2), QT00244251 (S1P3) and QT01192646 (GAPDH als interne Kontrolle)] sowie mit TaqMan® Reagent und TaqMan® -Primer-Sonden (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) im 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Daten wurden mittels Sequence Detection Software v1.2.3. detektiert. Die Expressionsniveaus des Zielgens wurden auf GAPDH normalisiert (Wineret *al.*, 1999). Die Expression von GAPDH änderte sich nicht, so dass es als geeignetes Kontroll-Gen fungierte.

2.16 Statistik

Die Messdaten wurden als Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus n unabhängigen Experimenten angegeben. Das Signifikanzniveau P für α wurde mit 0,05 festgelegt. Signifikante Unterschiede zwischen mehreren Versuchsgruppen (≥ 3) wurden mittels One-Way Analysis of Variance (ANOVA) und nachfolgendem Bonferroni-Test für

multiple Vergleiche überprüft. Unterschiede zwischen zwei Versuchsgruppen wurden mittels ungepaartem oder gepaartem „Student's t-Test“ überprüft. Lineare Zusammenhänge einer metrischen abhängigen Variablen y von einer metrischen unabhängigen Variablen x wurden mittels linearer Regression

bestimmt. Die Güte der Regression wurde anhand des Bestimmtheitsmaßes r^2 bewertet. Das Konfidenzintervall für den vorhergesagten Wert y wurde mit 95% festgelegt. Die statistische Auswertung der Experimente erfolgte mit GraphPadPrism-Software (Version 4.00, GraphPad Software, San Diego, USA) oder Microsoft Excel TM (Microsoft GmbH, Frankfurt).

Ergebnisse:

3.1.1 Die Stimulation mit PAR-1-AP führt zur S1P Freisetzung aus Thrombozyten

Bei dem folgenden dargestellten Experiment wurden menschliche Thrombozyten aus Blut gesunder Probanden isoliert und zunächst über 10 Minuten mit [³H]-Sphingosin inkubiert. Dabei fungierte dieses als Substrat für die Sphingosin-Kinase, welche es nahezu vollständig zu [³H]-S1P umwandelte. Danach wurden die Thrombozyten über 10 Minuten mit PAR-1-AP in den angegebenen Konzentrationen stimuliert und durch Zentrifugieren wurden sie von ihrem Medium getrennt. Anschließend erfolgten die Isolierung der Lipide und ihre Auftrennung. Eine Verrechnung des S1P in den Pellets und in den Überständen ermöglichte die Angabe des Ausmaßes einer Freisetzung dieser Substanz.

Die Stimulation mit PAR-1-AP in einer Konzentration von 30 µM und von 100 µM führte zu einer 5-fach stärkeren Freisetzung von [³H]-S1P im Vergleich zu unbehandelten Thrombozyten.

Parallel wurde die Thromboxansynthese in Abhängigkeit von der Stimulation mit PAR-1-AP bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass der Einsatz von PAR-1-AP in einer Konzentration von 100 µM zu einer deutlichen Thromboxansynthese führt. Folglich wurden die folgenden Experimente hauptsächlich mit PAR-1-AP in der höchsten Konzentration von 100 µM durchgeführt, um eine optimale Stimulation der Thrombozyten zu bewirken.

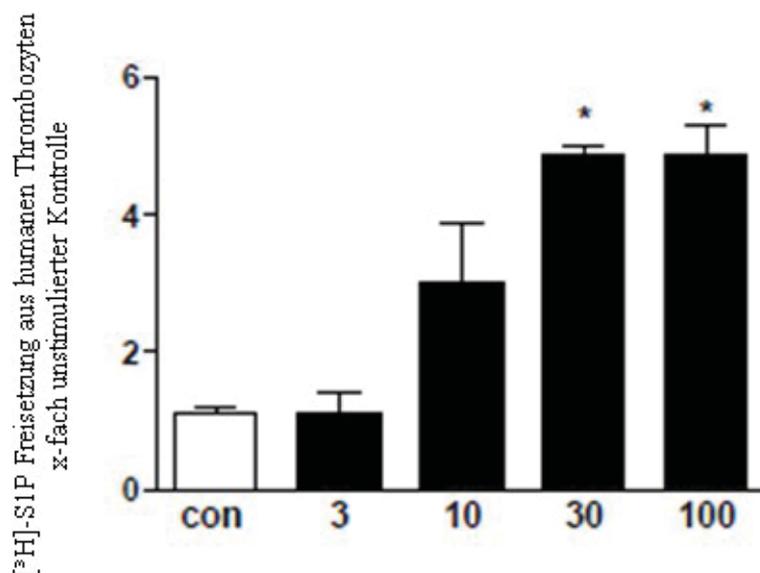


Abbildung 2.1. PAR-1-AP steigert konzentrationsabhängig die Freisetzung von S1P

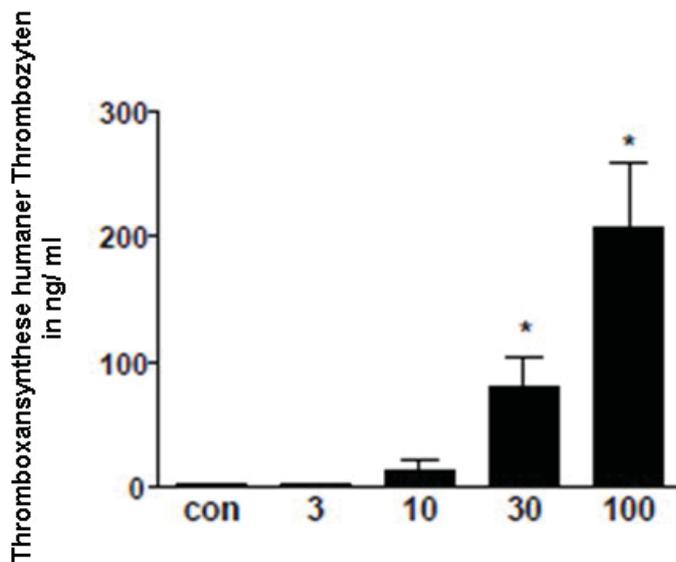


Abbildung 2.2 PAR-AP steigert konzentrationsabhängig die Bildung von Thromboxan A₂

3.1.2 Acetylsalizylsäure reduziert den S1P Export aus humanen Thrombozyten

In der nächsten Versuchsreihe wurde erneut die Freisetzung von [³H]-S1P aus menschlichen Thrombozyten dargestellt. Nach der Isolation erfolgte zusätzlich eine Inkubation über 15 Minuten mit Aspirin in einer Konzentration von 3 μ M, 30 μ M und von 300 μ M. Hiernach wurden die Thrombozyten über 10 Minuten mit PAR-1-AP aktiviert. Die Stimulation mit PAR-1-AP bewirkte eine nahezu vervierfachte Freisetzung von [³H]-S1P im Vergleich zu unbehandelten Thrombozyten. Die Vorbehandlung mit ASS in einer Konzentration von 30 μ M und 300 μ M erreichte eine signifikante Reduktion der [³H]-S1P Freisetzung um 50 % bzw. um 60 %, während ASS in einer Konzentration von 3 μ M keine Hemmung entfaltete.

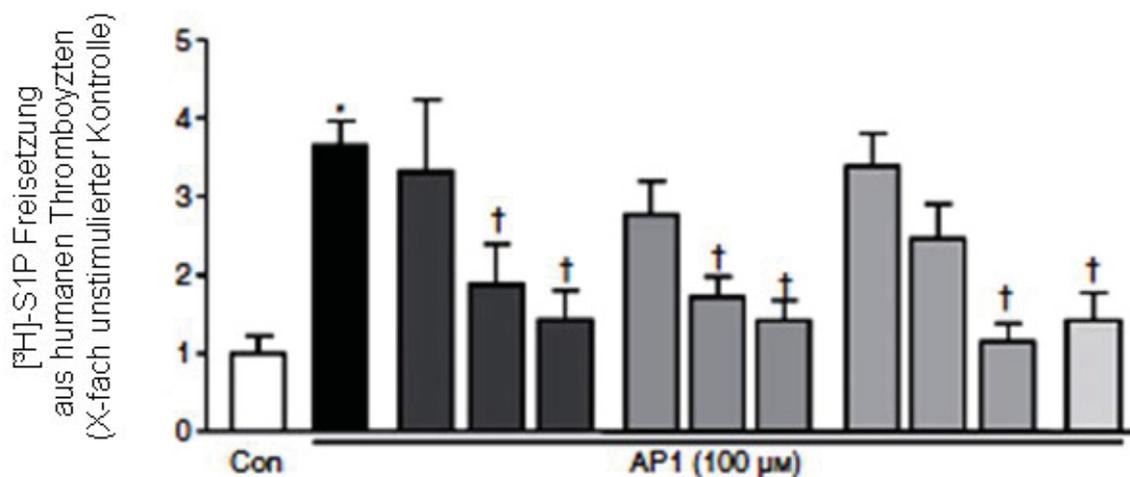
Eine ähnlich starke Hemmung des Exports von [³H]-S1P nach Stimulation mit PAR-1-AP konnte durch die Vorinkubation mit Ramatroban in einer Konzentration von 2 μ M erreicht werden. Hierbei handelt es sich um einen Antagonisten des Thromboxanrezeptors.

Darüber hinaus wurden zwei weitere Inhibitoren der COX, Diclofenac und Ibuprofen, unter dem Hinblick auf eine Reduzierung der Freisetzung von [³H]-S1P untersucht. Diclofenac bewirkte eine Hemmung des Freisetzungsvorgangs in einer Konzentration von 4 μ M und 40 μ M, nicht aber in derjenigen von 0,4 μ M, und Ibuprofen beeinflusste die Ausschleusung ebenfalls negativ. Seine notwendige Konzentration lag bei 200 μ M, wohingegen 20 μ M und 2 μ M nicht effektiv waren.

Anschließend wurde die Freisetzung von S1P nach Stimulation mit dem Agonisten des Thromboxanrezeptors U-46619 beleuchtet. Hieraus ging hervor, dass eine Plättchenaktivierung mit U-46619 zu einer ähnlich starken Freisetzung von S1P führt wie

diejenige mit PAR-1-AP. Interessanterweise führt eine Vorinkubation mit Aspirin jedoch nicht zu der oben beschriebenen Hemmung. Die durch die Vorbehandlung mit Aspirin bewirkte Freisetzungshemmung nach der Stimulation mit PAR1-AP konnte durch eine gleichzeitige Stimulation mit beiden Agonisten, U-46619 und PAR-1-AP, aufgehoben werden und eine uneingeschränkte Freisetzung erzielen.

Die Gemeinsamkeit der drei NSAIDs ist die Hemmung der COX, obwohl sie sich in Ihrer Strukturformel deutlich voneinander unterscheiden. Daher ist eine direkte Hemmung eines Transportproteins durch die Medikamente ebenfalls unwahrscheinlich. Folglich scheint ein Produkt des Stoffwechselweges der COX notwendig für den Export von S1P zu sein. Zusammengenommen mit der Tatsache, dass Ramatroban auch eine Hemmung auslöst und als ein Antagonist des Thromboxanrezeptors gilt, scheint für den Freisetzungsvorgang eine Aktivierung des Thromboxanrezeptors notwendig zu sein. Der Befund, dass die Hemmung der Thromboxansynthese durch Aspirin erfolgt und eine verminderte S1P-Freisetzung bewirkt, aber eine Gabe von U-46619 den Hemmeffekt wieder aufheben kann, misst der Aktivierung des Thromboxanrezeptors die entscheidende Rolle bei.



ASS (μM)	-	3	30	300	-	-	-	-	-	-	-
Diclofenac (μM)	-	-	-	-	0,4	4	40	-	-	-	-
Ibuprofen (μM)	-	-	-	-	-	-	-	2	20	200	-
Ramatroban (μM)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2

Abbildung 2.3 Die $[^3\text{H}]$ -S1P Freisetzung aus humanen Thrombozyten durch PAR1-AP wird nach Vorinkubation mit ASS, Ibuprofen, Diclofenac und Ramatroban konzentrationsabhängig gehemmt

Dünnschichtchromatografische Lipidauftrennung

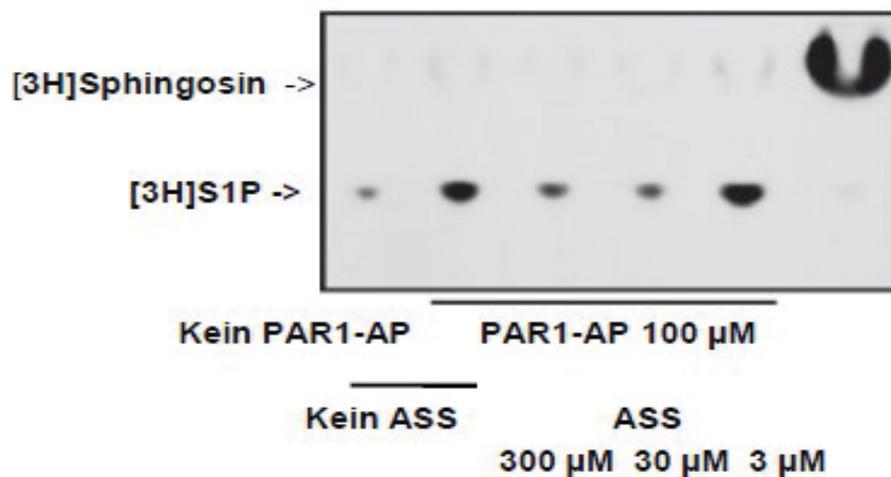


Abbildung 2.4 Auftrennung der aus Thrombozytenüberständen gewonnenen Lipide
Die $[^3\text{H}]$ -S1P Freisetzung aus humanen Thrombozyten nach PAR1-AP wird nach Vorinkubation mit ASS gehemmt

3.1.3 ASS hemmt die thrombozytäre Thromboxansynthese nach der Stimulation mit PAR-1-AP

In einem weiteren Versuch wurde die thrombozytäre Thromboxansynthese in Abhängigkeit von einer Vorinkubation mit ASS untersucht. Zunächst wurden unbehandelte Blutplättchen mit PAR-1-AP stimuliert. Diese produzierten im Vergleich zu den unstimulierten Plättchen eine große Menge von Thromboxan. Wurden Blutplättchen jedoch mit ASS vorbehandelt, so kam es zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme dieser Synthese. ASS in einer Konzentration von 30 μM und höher führte nahezu zu einer vollständigen Hemmung der Bildung von Thromboxan. Dieser Versuch stützt die oben angegebene Vermutung, dass die S1P Freisetzung thromboxanabhängig ist, da diese ebenfalls bei einer Vorinkubation mit ASS in einer Konzentration von 30 μM und größer gehemmt war.

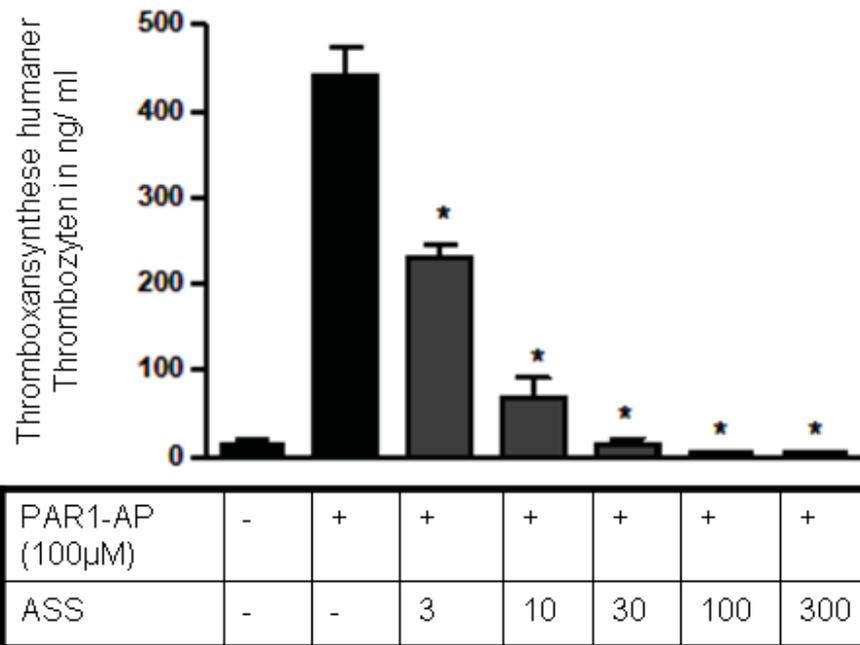


Abbildung 2.5 Thrombozytäre Thromboxansynthese wird durch die Vorinkubation mit ASS konzentrationsabhängig gehemmt

3.1.4 ASS hemmt gleichermaßen die Freisetzung von [³H]-S1P und endogenem S1P

Um zu überprüfen, ob sich das [³H]-S1P gleichermaßen wie das endogene S1P verhält, wurden erneut Thrombozyten aus Blut isoliert und mit ASS (300 µM) behandelt. Es erfolgte die Stimulation mit PAR1-AP und eine Trennung von Plättchen und Medium durch einen Zentrifugationsschritt. Das nach der Stimulation freigesetzte S1P wurde anschließend mit einem Massenspektrometer bestimmt. Hierbei konnte die hemmende Eigenschaft von ASS auch auf die Freisetzung des endogenen Lipids bestätigt werden. Somit liegt ein identisches Verhalten von S1P und [³H]-S1P vor.

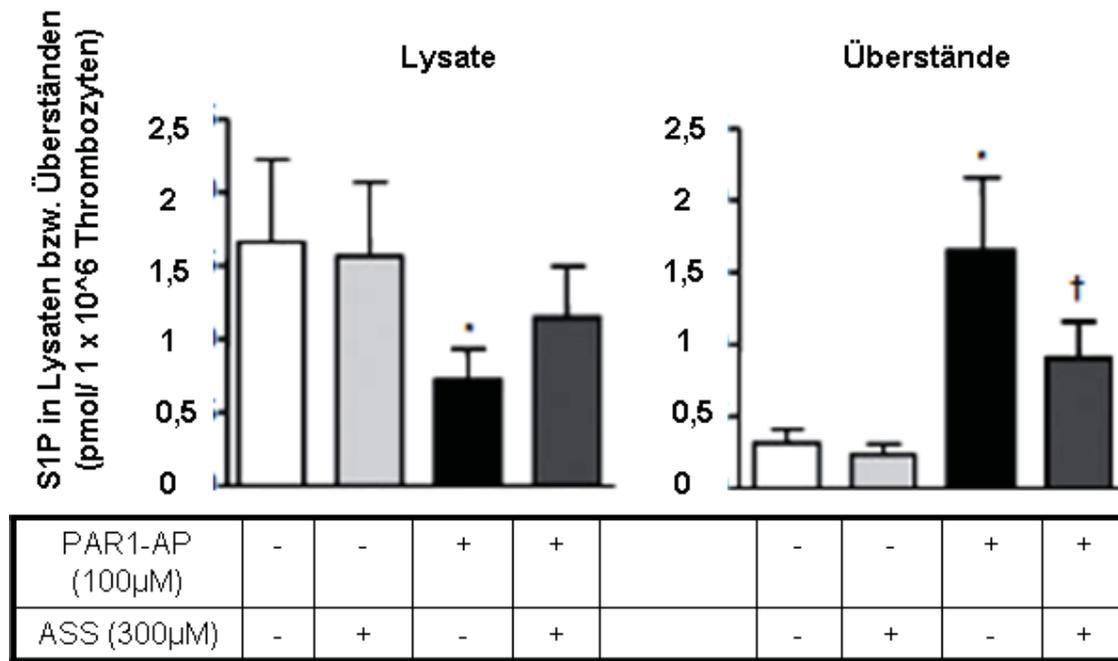


Abbildung 2.6 Konzentrationen von S1P in thrombozytären Lysaten bzw. ihren Überständen

3.1.5 Einfluss weiterer Plättchenaktivatoren auf die S1P Freisetzung

In den folgenden Versuchen wurde erneut die S1P Freisetzung aus Thrombozyten beleuchtet. Dabei wurden Blutplättchen mit ADP in verschiedenen Konzentrationen stimuliert. Wie bereits in anderen Untersuchungen gezeigt worden ist, entsteht bei der Stimulation mit ADP kein Thromboxan A₂. Passend zu der Hypothese, dass der Export von S1P thromboxanabhängig ist, erfolgt in dieser Untersuchung auf die Stimulation mit ADP keine Sekretion von S1P.

Die Stimulation mit Kollagen ergibt ein geteiltes Bild. Während die Gabe von 1 µg/ml keinen S1P Export auslöste, führte eine Stimulation mit Kollagen in einer Konzentration von 10 µg/ml zu einer regelrechten Sekretion. Diese wird ebenfalls durch eine Vorbehandlung mit Aspirin, Ibuprofen und Diclofenac in den vorher genannten Konzentrationen gehemmt.

Die nächsten Versuche stellen zum einen die S1P Sekretion und zum anderen die Thromboxansynthese nach einer Stimulation mit Kollagen gegenüber. So führt die Aktivierung mit Kollagen in der Konzentration von 1 µg/ml weder zu einer S1P Freisetzung noch zu einer Thromboxansynthese. Die Zugabe von Kollagen in einer Konzentration von 3 µg/ml ruft eine signifikant vorhandene Thromboxanbildung hervor, die für eine S1P Sekretion jedoch nicht ausreichend. Die Gabe von Kollagen in einer Konzentration von 10 µg/ml vermittelt sowohl eine regelrechte S1P Sekretion als auch eine starke Bildung von

Thromboxan. Da hiermit eine adäquate Plättchenaktivierung vorliegt, wurden Thrombozyten mit Kollagen in dieser Konzentration stimuliert, nachdem sie mit Diclofenac, Ibuprofen und Aspirin vorbehandelt wurden. Es resultierte im Vergleich zu den unbehandelten aber aktivierten Thrombozyten eine Hemmung der S1P Sekretion.

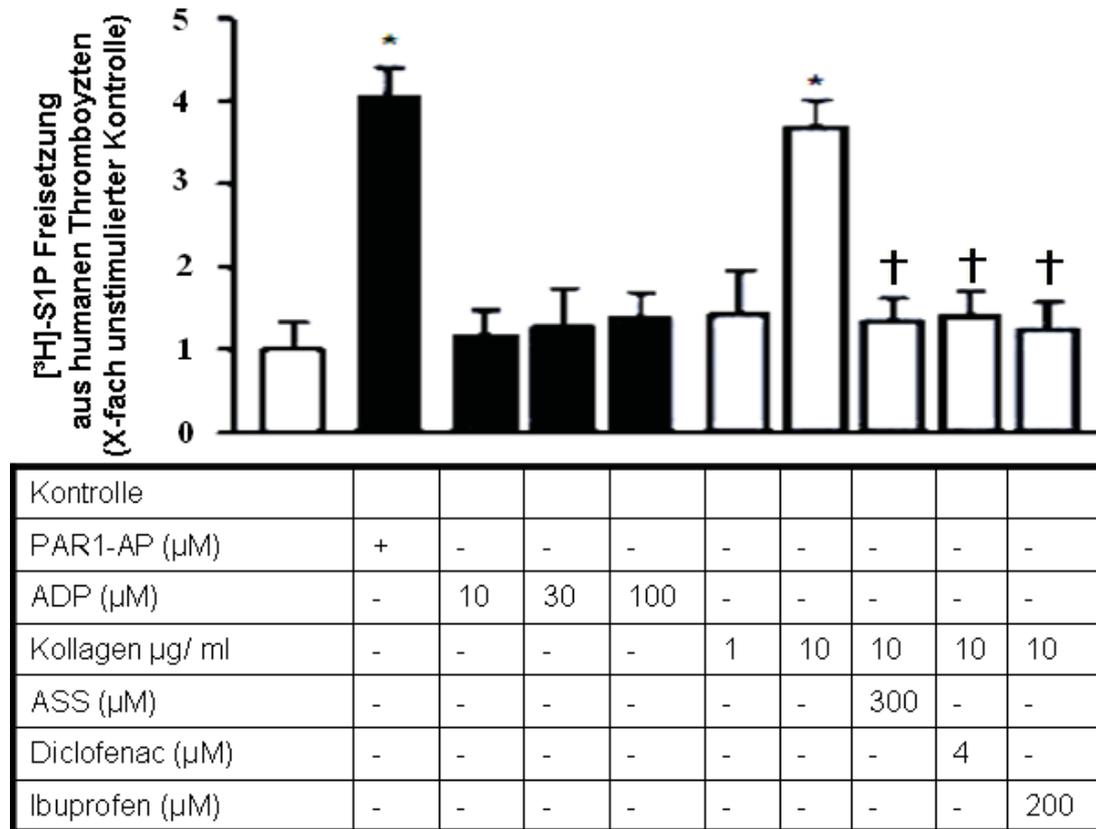


Abbildung 2.7 Die S1P Freisetzung aus humanen Thrombozyten wird durch PAR1-AP und höher dosiertes Kollagen gesteigert, während ADP keine Freisetzung bewirkt; die Vorinkubation mit ASS, Diclofenac und Ibuprofen hemmt die S1P Freisetzung

3.1.6 S1P Export aus menschlichen Thrombozyten wird über ABC-Transporter vermittelt

Ziel der nächsten Versuchsanordnung war die Untersuchung, ob andere Substanzen, welche nicht die COX hemmen, eine Reduktion der S1P Freisetzung bewirken können. Da in einer Arbeit von Mitra P. et al (ProcNatlAcadSci USA 2006) der ABCC1 Transporter den S1P Export aus Mastzellen vermittelt, bestand die Vermutung, dass auch Thrombozyten ihr S1P mittels eines ABC Transporter freisetzen. Daher wurden Thrombozyten mit MK571, einem unspezifischen Hemmstoff von ABC Transportern nach ihrer Isolierung inkubiert. Dies erzeugte nach einer Stimulation mit PAR-1-AP oder mit U46619 eine eingeschränkte S1P Freisetzung. Eine weitere Arbeit konnte zeigen, dass auf Blutplättchen der ABCC4

Transporter besonders stark exprimiert wird, so dass analog zu dieser Untersuchung Indomethacin und Dipyridamol eingesetzt wurden. Auch diese Stoffe erzeugten eine Hemmung der S1P Freisetzung nach einer Stimulation mit PAR1-AP und U46619.

Wie in der Arbeit von Jedlitschky et al. (Blood 2004) beschrieben, zeichnet sich der ABCC4 Transporter dadurch aus, dass er von den drei benutzten Stoffen in seiner Funktion charakteristischerweise inhibiert wird. Daher kann die Folgerungen geschlossen werden, dass dieser Transporter den S1P Export aus menschlichen Plättchen heraus bewerkstelligt

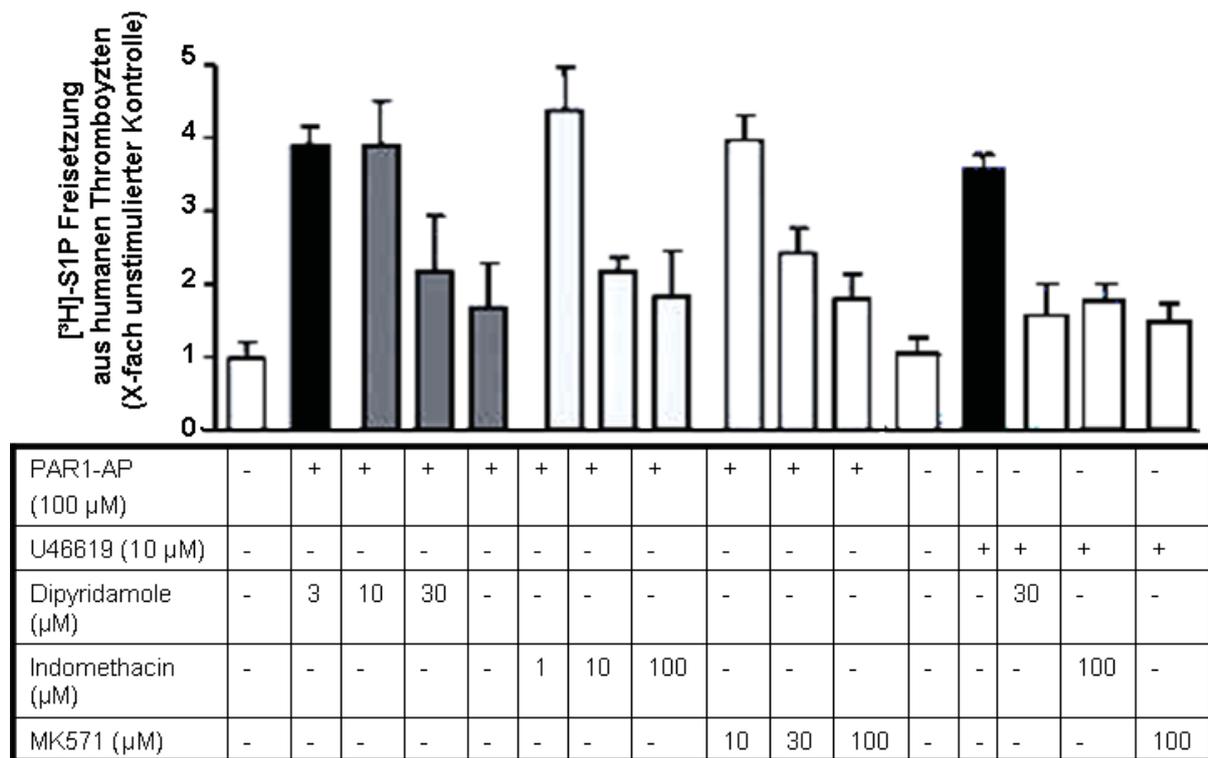


Abbildung 2.8 Die $[^3\text{H}]$ -S1P Freisetzung aus humanen Thrombozyten wird sowohl nach einer Stimulation mit PAR1-AP als auch mit U46619 durch Dipyridamol, Indomethacin und MK571 konzentrationsabhängig gehemmt

3.1.7 Einfluss von Dipyridamol und Indomethacin auf die Thromboxansynthese

In einem weiteren Experiment wurde die thrombozytäre Thromboxansynthese nach der Stimulation mit PAR-1-AP beleuchtet. Blutplättchen waren entweder unbehandelt oder wurden mit Indomethacin in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Dabei stellte sich heraus, dass bereits eine Konzentration von 100 nM die Thromboxansynthesefähigkeit im Vergleich zu unbehandelten Thrombozyten verminderte. Jedoch erst in einer Konzentration von 10 μM konnte die Produktion von Thromboxan deutlich vermindert werden. Entsprechend zu dem vorangegangenen Versuch war eine Hemmung der S1P Sekretion auch

erst bei dieser Konzentration vorhanden, so dass man die Hemmung durch Indomethacin als thromboxanabhängig bezeichnen muss.

Dipyridamol hingegen zeigte nur eine geringe Hemmung der Thromboxansynthese, wohl aber eine Hemmung der S1P Sekretion, so dass hier eine direkte Hemmung des Transportproteins ABCC4 anzunehmen ist.

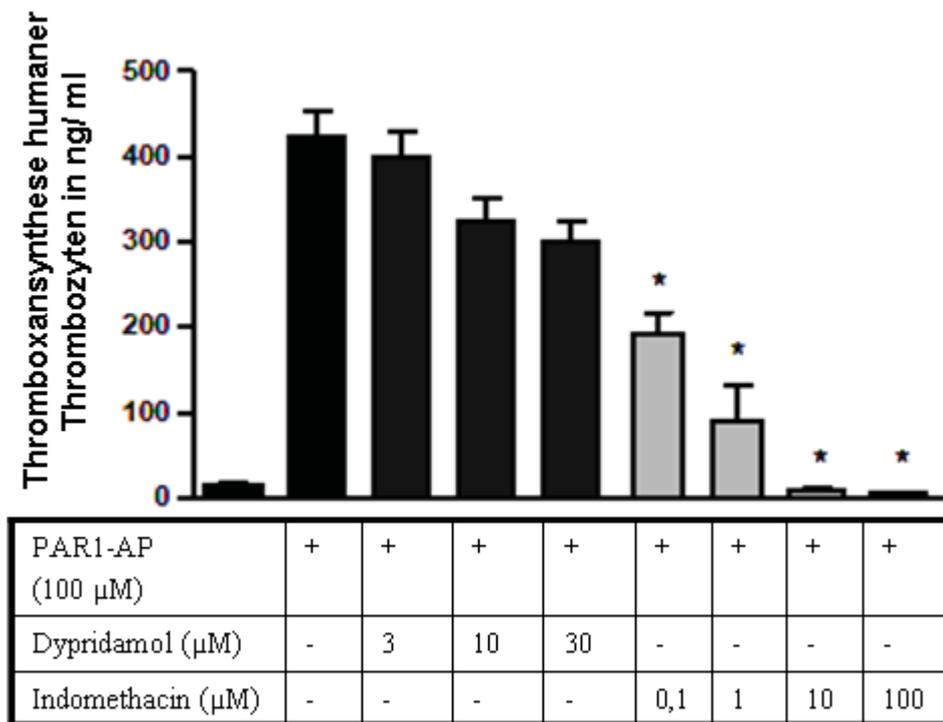


Abbildung 2.9 Die thrombozytäre Thromboxansynthese wird konzentrationsabhängig von Indomethacin, nicht jedoch von Dipyridamol gehemmt

3.1.8 S1P Export ist abhängig von der Protein Kinase C

Ziel des nächsten Versuchs war die Überprüfung, ob die Proteinkinase C notwendig ist um, den S1P Transport zu vermitteln. Dafür wurden Thrombozyten mit einem Hemmstoff der Protein Kinase C, GF109203X, vorbehandelt und anschließend sowohl mit dem PAR-1-AP als auch mit U46619 stimuliert. Das freigesetzte S1P war im Unterschied zu den unbehandelten Plättchen signifikant reduziert, was andere Untersuchungen bestätigt. Das zeigt jedoch auch, dass eine intrazelluläre Signalkaskade erforderlich ist und nicht dass eine eventuelle direkte Stimulation des Transportproteins mit U46619 als Thromboxananalogon für den Transportprozess verantwortlich ist. Offenbar ist die Aktivierung des Thromboxanrezeptors für die Freisetzung von S1P entscheidend.

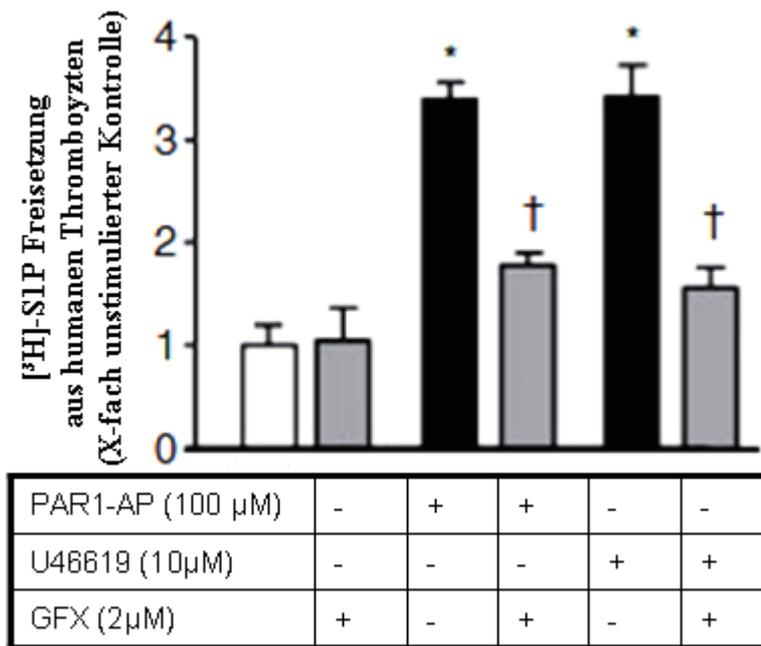


Abbildung 2.10 Die [^3H]-S1P Freisetzung aus humanen Thrombozyten nach einer Stimulation mit PAR1-AP oder U46619 wird durch die Vorinkubation mit GFX gehemmt

3.2 S1P Freisetzung aus Plättchen ist unabhängig von ihrer Degranulation

Der Freisetzungsvorgang von S1P ist nicht abschließend geklärt, da zwar eine Hemmung der Freisetzung von S1P nach Unterdrückung der Thromboxansynthese stattfindet, jedoch keine vollkommene Suppression erzielt wird. Der Einsatz von Dypiridamol, Indomethacin und MK571 konnte den ABCC4 Transporter für die S1P Sekretion identifizieren, ist aber nur für einen Teil der Sekretion verantwortlich. Unklar ist auch, ob die Degranulation von ASS beeinflusst wird. Daher wurden Blutplättchen mit ASS vorbehandelt und mit PAR-1-AP stimuliert. Anschließend wurden die Thrombozyten mit Antikörpern gegen CD 62 und CD 63 inkubiert, um diese Antigene anschließend über eine Durchflusszytometrie zu bestimmen. Dabei stellt CD62 einen Marker für die Degranulation von alpha-granules und CD 63 einen für die Degranulation von dense-granules dar. In den Ergebnissen wurde deutlich, dass die Stimulation mit PAR-1-AP konzentrationsabhängig eine Degranulation beider Vesikelarten auslöst. Dabei erreicht die Stimulation mit PAR-1-AP in einer Konzentration von 100 µM ein maximales Niveau der Degranulation. Eine Vorbehandlung mit ASS führt zu keiner Beeinträchtigung des Freisetzungsprozesses beider Vesikeltypen.

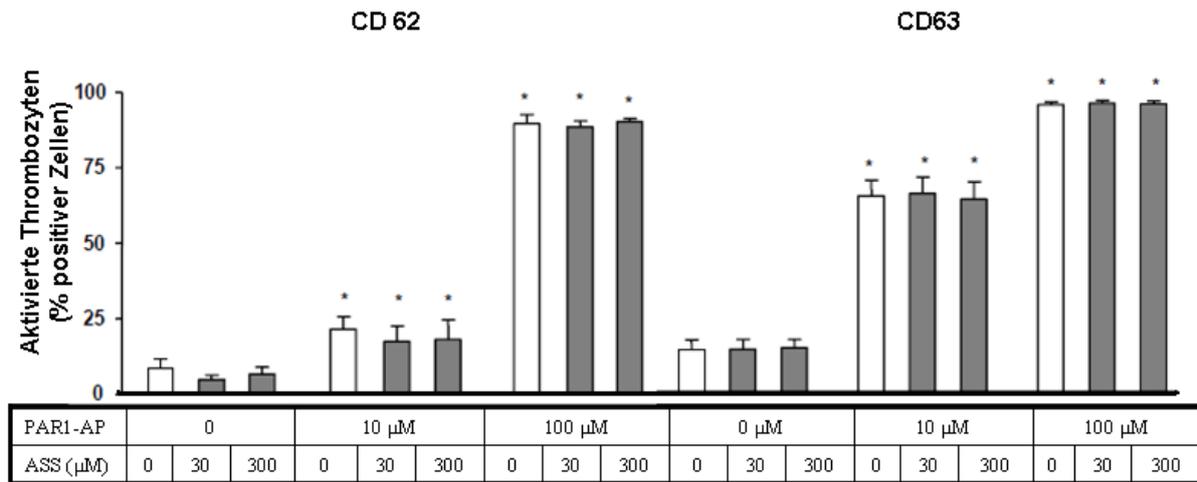


Abbildung 2.11 Die CD 62 bzw. CD 63 Externalisierung nach Stimulation mit PAR1-AP wird nicht durch die Vorinkubation mit ASS gehemmt

3.3 Die Plättchenaggregation ist unabhängig von einer Vorbehandlung mit ASS

In den folgenden Versuchen wurde eine mögliche Beeinflussung der Thrombozytenaggregation durch S1P bestimmt. Dafür wurden Aggregationsversuche mit plättchenreichen Plasma durchgeführt. Zunächst kam PAR-1-AP als Stimulus zum Einsatz. Während die Stimulation mit 30 μM und mit 100 μM eine irreversible Aggregation auslöste, erzeugte PAR-1-AP in einer Konzentration von 10 μM nur eine reversible und PAR-1-AP in einer Konzentration von 3 μM keine Aggregation aus.

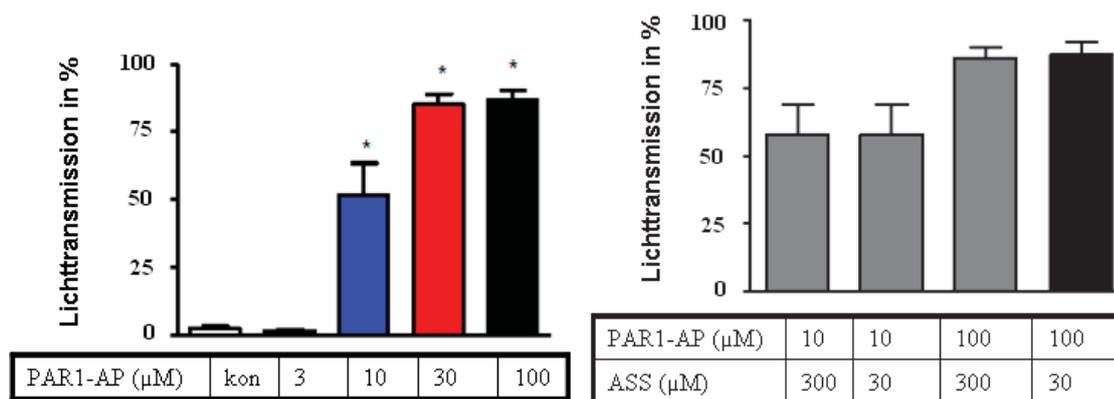


Abbildung 2.12 Plättchenaggregation nach Stimulation mit PAR1-AP wird nicht durch die Vorinkubation mit ASS gehemmt

Danach wurden Plättchen mit ASS in den angegebenen Konzentrationen über 15 Minuten inkubiert und es wurde anschließend mit PAR-1-AP eine Aggregation ausgelöst. Die

Vorbehandlung mit ASS führte zu keiner Abschwächung dieses Vorgangs und ist folglich mit anderen Arbeiten deckungsgleich.

Anschließend wurde die Plättchenaggregation durch eine gleichzeitige Stimulation mit PAR-1-AP und mit S1P ausgelöst. Diese war durch die Zugabe von S1P nicht verändert. Dabei wurde auch eine submaximale Konzentration von PAR-1-AP (10 μ M) benutzt, um eine möglicherweise additive Wirkung des S1P festzustellen, die jedoch ausblieb.

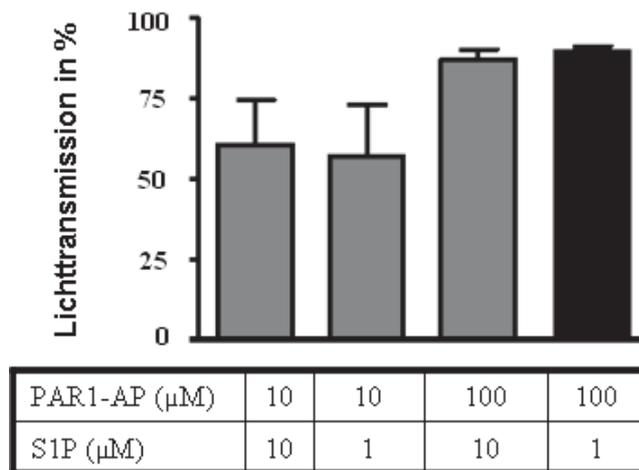


Abbildung 2.13 Die Plättchenaggregation wird durch S1P nicht verstärkt

3.4.1 S1P Freisetzung aus murinen Thrombozyten ist thromboxanabhängig

In den folgenden Versuchen wurden murine Thrombozyten benutzt. Diese zeichnen sich durch eine andere Thrombinrezeptorexpression als menschliche Plättchen aus. Auf ihrer Oberfläche sind der PAR3 und der PAR4 Rezeptor stark exprimiert, während der PAR1 Rezeptor nicht vorhanden ist. Folglich wurde zur ihrer Aktivierung Thrombin statt PAR-1-AP benutzt. Die Isolation der Plättchen erfolgte nach der gleichen Anordnung wie für die oben aufgeführte Isolation menschlicher Thrombozyten mit dem Unterschied, dass das gesamte Blut eines Tieres entnommen wurde, was seinen Tod bedingte. Nach der Isolierung der Plättchen erfolgte die Stimulation mit Thrombin, die eine deutliche Freisetzung von S1P im Vergleich zu unbehandelten Plättchen bewirkte. Die Vorinkubation mit ASS führte wie bei den menschlichen Thrombozyten zu einer reduzierten S1P Freisetzung.

3.4.2 Plättchen mit einem Knock-out des Thromboxanrezeptors setzen weniger S1P frei

Für die folgenden Versuche wurden murine Plättchen benutzt, die aus Tieren stammen, die durch einen Knock-out des Thromboxanrezeptors gekennzeichnet sind. Nach der Isolierung der Thrombozyten erfolgte eine Stimulation mit Thrombin, die im Vergleich zur Freisetzung

von S1P aus Plättchen der Wildtyp-Tiere zu einer reduzierten Freisetzung führte. Dabei entspricht der Umfang der Freisetzung etwa dem Freisetzungsniveau der murinen Thrombozyten aus Wildtyp-Tieren, die mit ASS vorbehandelt wurden. Eine Vorbehandlung der Thrombozyten der Knock-out Tiere mit ASS führte nach Stimulation mit Thrombin zu keiner weiteren Suppression der S1P Freisetzung.

Die Stimulation mit U-46619 ergibt eine deutliche Freisetzung von S1P aus Plättchen der Wildtyp-Tiere, ähnlich derjenigen aus menschlichen Thrombozyten. Dabei wird die Freisetzung durch die Vorbehandlung mit ASS erwartungsgemäß nicht gehemmt. Thrombozyten der Knock-out Tiere zeigen nur eine sehr schwache Freisetzung von S1P nach der Stimulation mit U-46619, was das Fehlen des Rezeptors beweist. Daraus kann eine signifikante Bedeutung des Thromboxanrezeptors für die S1P Freisetzung abgeleitet werden.

Die Funktionsfähigkeit der Thrombozyten wurde mittels der Durchflusszytometrie untersucht, welche die CD62 Externalisierung zeigte, die wiederum als Maß für die Degranulation dient. Es zeigte sich eine starke CD62 Externalisierung nach der Stimulation mit Thrombin. Diese ist jedoch bei den für den Thromboxanrezeptor negativen Plättchen im Vergleich zu denjenigen der Wildtyp-Tiere leicht eingeschränkt. Die CD62 Externalisierung nach einer Stimulation mit U-46619 ist jedoch nur bei Thrombozyten aus Wildtyp-Tieren vorhanden, während sie erwartungsgemäß bei den Plättchen der Knock-out Tiere fehlt. Diese Grafik beweist das Fehlen des Thromboxanrezeptors und zeigt eine gewisse Bedeutung des Thromboxanrezeptors für die Degranulation nach der Stimulation mit Thrombin. Möglicherweise spiegelt es das Fehlen der endogenen Verstärkung durch das gebildete aber letztlich wirkungslose Thromboxan auf die Degranulation wider.

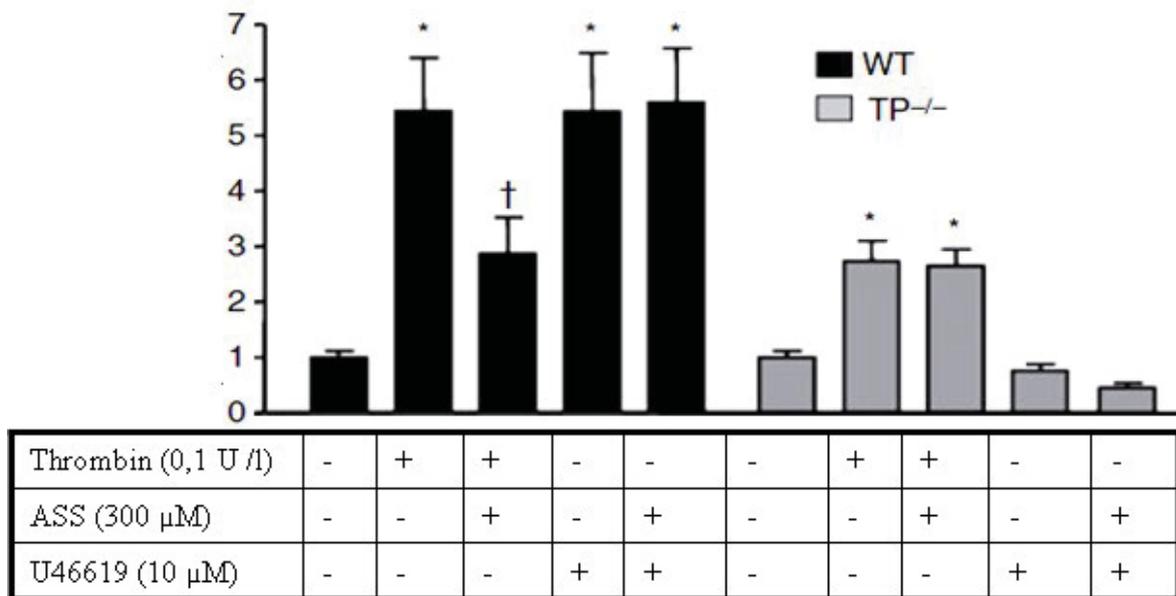


Abbildung 2.14 Die [³H]-S1P Freisetzung aus murinen Thrombozyten (WT) wird durch die Vorinkubation mit ASS gehemmt; diejenige aus Mäusen mit einem „knock-out“ des Thromboxanrezeptors (TP -/-) ist im Vergleich zu Wildtieren gehemmt

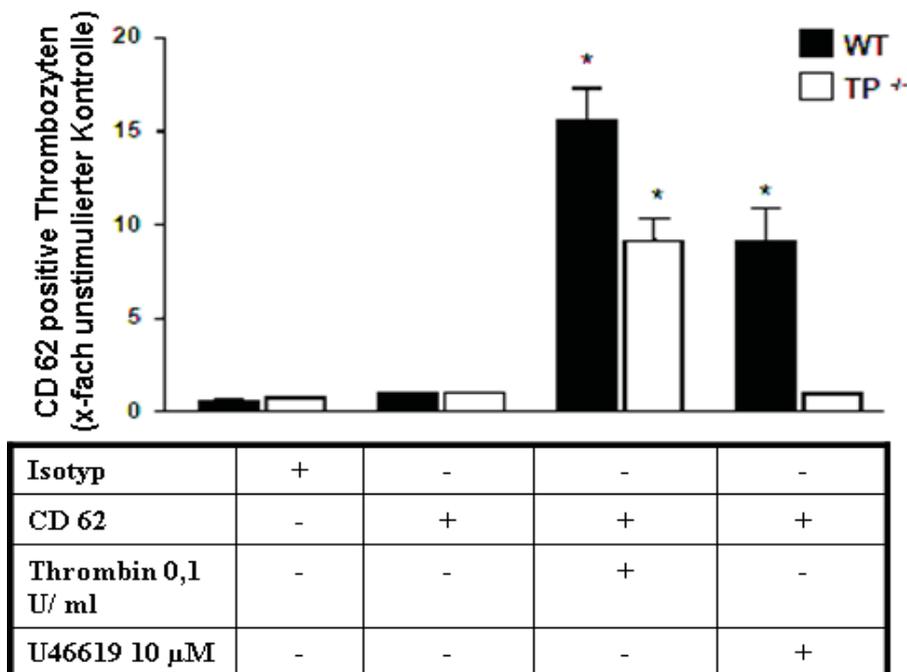


Abbildung 2.15 Die CD 62 Externalisierung muriner Thrombozyten nach der Stimulation mit Thrombin bzw. U46619

3.5 Thrombozytenüberstände mit einem reduzierten S1P Gehalt führen zu einer Beeinträchtigung der Migration menschlicher Monozyten

In den folgenden Versuchen wurde das Migrationsverhalten menschlicher Monozyten gegenüber MCP-1 untersucht. Hierfür wurden Monozyten gesunder Probanden isoliert und anschließend unterschiedlichen Stoffen für 24 h ausgesetzt, um sie gegenüber einem einheitlichen Reiz migrieren zu lassen. Die Vorinkubation mit S1P im Vergleich zu unbehandelten Monozyten bewirkt eine Zunahme der Migration. Die Vorbehandlung mit Thrombozytenüberständen unstimulierter Thrombozyten führt zu keiner erhöhten Migration. Setzt man hingegen Thrombozytenüberstände der mit PAR1-AP stimulierten Blutplättchen ein, bewirken diese eine deutliche Zunahme der Migration von Monozyten. Waren die Thrombozyten ihrerseits hingegen mit ASS vorbehandelt, fällt die Migration geringer aus. Zusätzlich wurden Plättchen mit U-46619 stimuliert und es wurden ihre Überstände gewonnen. Dabei führte eine Vorinkubation der Thrombozyten mit ASS zu keiner Reduktion der anschließenden Migration von Monozyten. Sie fiel ähnlich stark aus wie diejenige nach einer Stimulation mit Thrombozytenüberständen, die nach einer Aktivierung durch PAR-1-AP gewonnen waren. Anhand dieser Daten könnte ein unterschiedlicher S1P Gehalt der Thrombozytenüberstände für das unterschiedliche Migrationsverhalten der eingesetzten Monozyten verantwortlich sein.

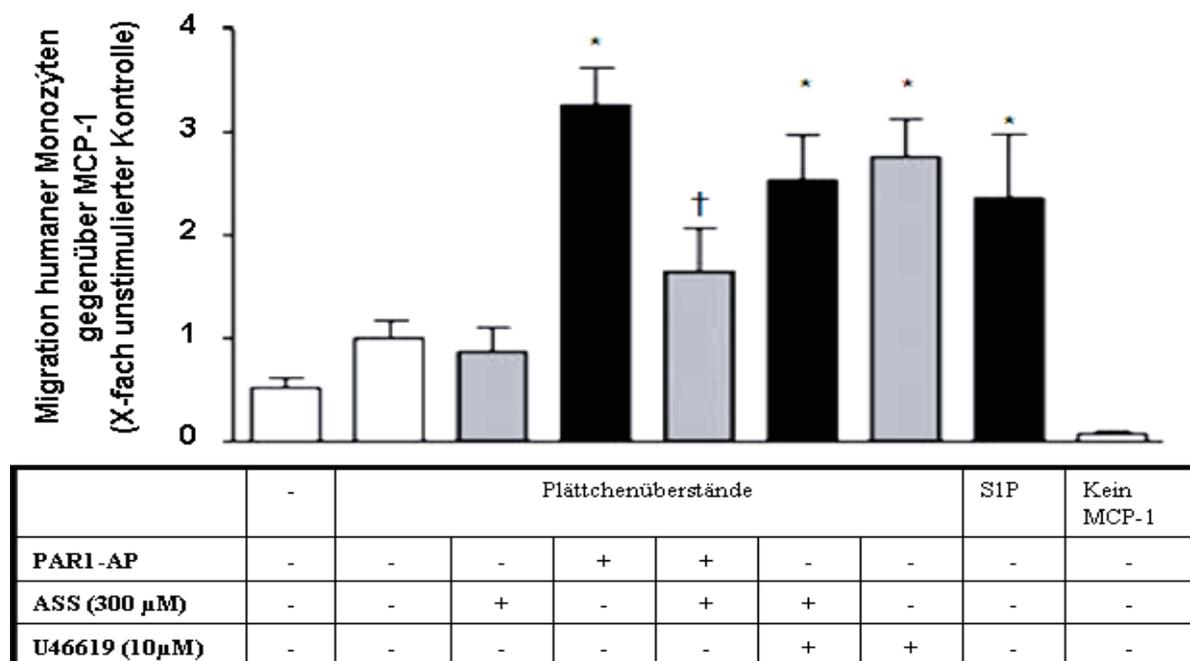


Abbildung 2.16 Migration humaner Monozyten gegenüber MCP-1 ist nach der Vorinkubation mit Thrombozytenüberständen, die wiederum mit ASS vorbehandelt waren und mit PAR1-AP stimuliert wurden gehemmt

In weiteren Versuchen wurde das Migrationsverhalten von Monozyten gegenüber Serum dargestellt. Die Vorbehandlung der Monozyten erfolgte analog der oben bereits aufgeführten Versuchsanordnung und zeigte die gleichen Ergebnisse. Auch hierbei ist die Migration eingeschränkt, wenn Thrombozyten mit ASS vorbehandelt wurden und mit PAR-1-AP stimuliert wurden. Bei dieser Versuchsreihe war der Migrationsreiz ebenfalls für alle Gruppen gleich, stellt jedoch keinen einheitlichen Stoff wie das MCP-1 dar, sondern ist als Serum ein heterogenes Gemisch. Welche Veränderungen die Inkubation mit Thrombozytenüberständen bei Monozyten auslöst, ist unbekannt. Es könnte beispielsweise eine Aufregulierung von Rezeptoren für MCP-1 oder für andere Chemokin-Rezeptoren, die im Serum vorhanden sind, erfolgen.

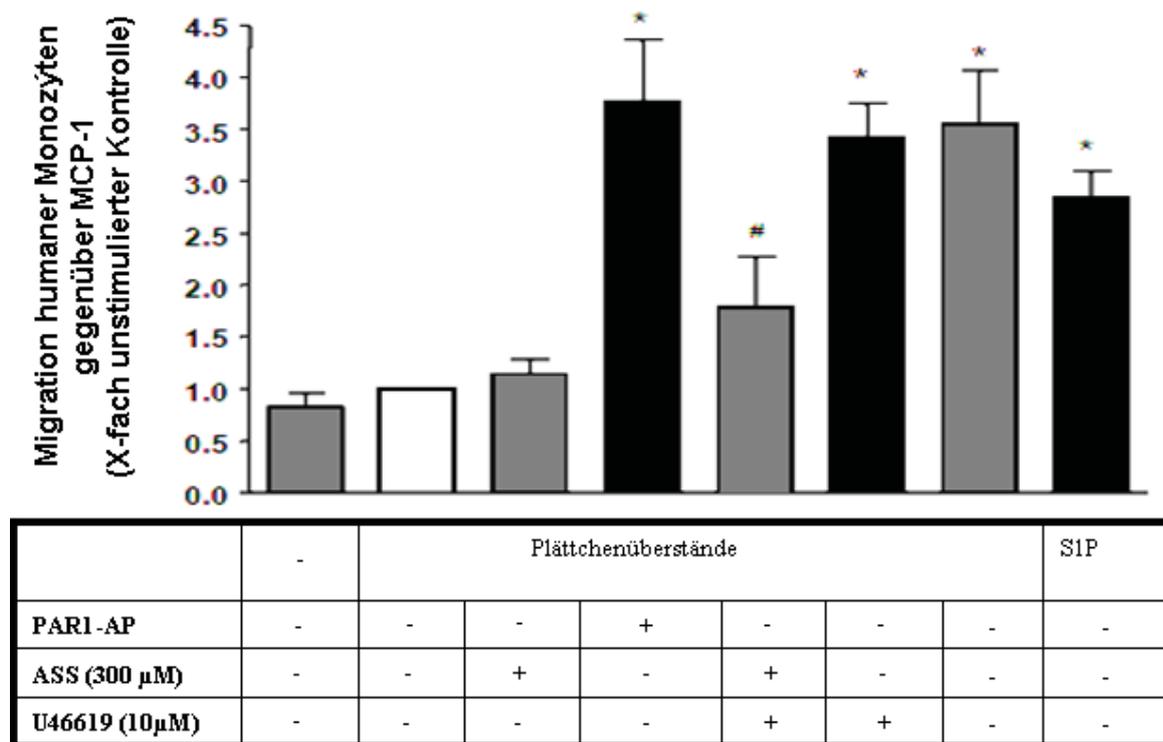


Abbildung 2.17 Migration humaner Monozyten gegenüber 10% FCS nach Vorinkubation mit Thrombozytenüberständen

Um zu überprüfen, ob der unterschiedliche Gehalt von S1P der benutzten Thrombozytenüberstände für das unterschiedliche Migrationsverhalten der eingesetzten Monozyten verantwortlich ist, erfolgte eine Transfektion der Monozyten mit si-RNA, die eine

verminderte Expression von S1P Rezeptoren bewirkte. Es wurde jeweils selektiv der S1P1, S1P2 oder S1P3 Rezeptor der Monozyten vermindert exprimiert.

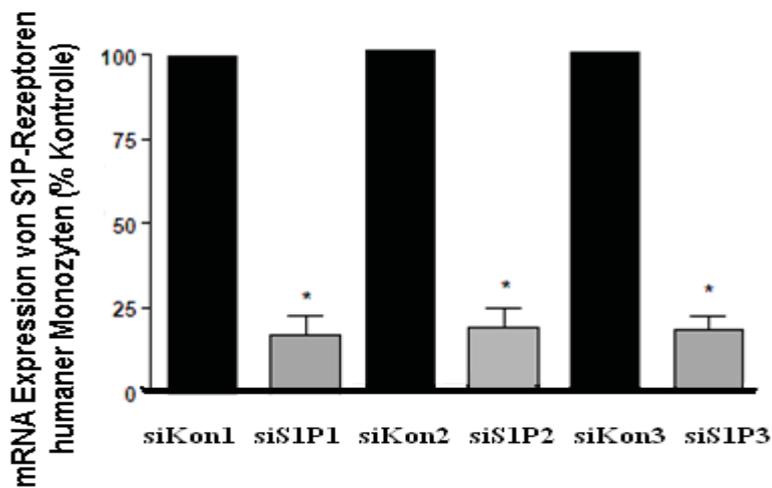
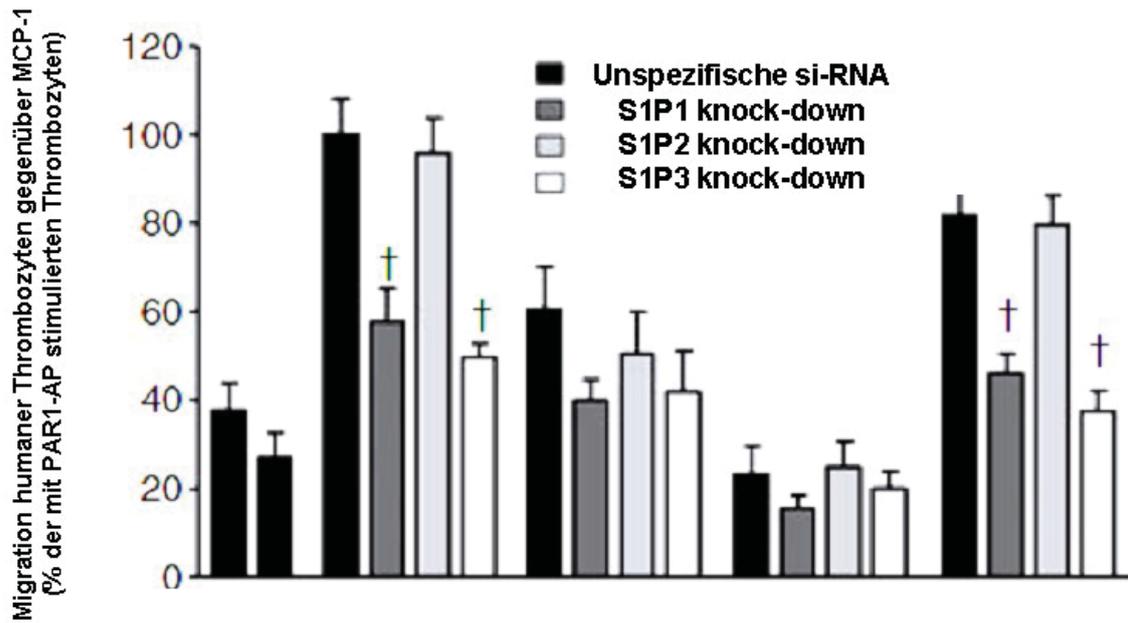


Abbildung 2.18 mRNA Expression des S1P1, S1P2 und des S1P3 Rezeptors humaner Thrombozyten nach Behandlung mit jeweiliger siRNA

Anschließend erfolgte die Stimulation der vorbehandelten Monozyten mit S1P. Daraufhin zeigte sich eine Beeinträchtigung der Migration, wenn Monozyten entweder den S1P1 oder den S1P3 Rezeptor nicht mehr exprimierten. Folglich scheinen diese beiden verantwortlich für die Migration zu sein.

Darüber hinaus wurden die weiter oben aufgeführten Thrombozytenüberstände zur Vorinkubation über 24 h eingesetzt. Dabei zeigte sich eine regelrechte Migration nach der Inkubation mit Überständen, die nach der Stimulation mit PAR1-AP gewonnen wurden. War jedoch entweder der S1P1 oder der S1P3 Rezeptor herunter reguliert, fand eine reduzierte Migration statt. Das Ausmaß der Migration entsprach dann derjenigen, die nach der Inkubation mit Überständen mit ASS vorbehandelter und mit PAR-1-AP stimulierter Thrombozyten gemessen wurde. Die S1P1 oder S1P3 Herunterregulierung führte zu keiner weiteren Reduktion der Migration bei dieser Gruppe.

Folglich konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein von S1P1 und S1P3 Rezeptoren notwendig ist, damit Monozyten eine Migration durchführen können. Zum anderen zeigt sie, dass der S1P Gehalt in den unterschiedlichen Thrombozytenüberständen, für das unterschiedliche Migrationsverhalten verantwortlich ist.



Plättchenüberstände	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
PAR1-AP 100 μ M	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
ASS 300 μ M	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
S1P 100 nM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

Abbildung 2.19 Migration humaner Monozyten gegenüber MCP-1 nach Vorinkubation mit Thrombozytenüberständen und vorangegangener Herunterregulierung einzelner S1P Rezeptoren

4. Diskussion:

4.1 Pathophysiologische Bedeutung von S1P

Sphingosin-1-Phosphat ist als hochaktives Signallipid an der Regulation zahlreicher zellulärer Funktionen beteiligt. Insbesondere besitzt es immunmodulierende Wirkungen und fördert die Migration von Monozyten (Matloubian M. 2004).

Die Einwanderung von Monozyten stellt einen Schlüsselprozess bei der Entwicklung und Progression der Arteriosklerose und somit der koronaren Herzkrankheit dar. In der Arbeit von Deutschmann et al. (2003) wurde eine positive Korrelation zwischen der Plasmakonzentration von S1P und dem Vorhandensein einer KHK bzw. ihrer Ausprägung hergestellt. Da ein Teil des S1P im Plasma aus Thrombozyten stammt (Yatomi et. al, 1995), könnten plättchenfunktionshemmende Substanzen wie Aspirin die Konzentration von S1P senken und möglicherweise auf diesem Weg ein Voranschreiten der Arteriosklerose abmildern. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass Aspirin bereits in geringer Dosierung kardioprotektive Eigenschaften über eine antiinflammatorische Wirkung entfalten kann. Nach einer Untersuchung von Morris et al. (2002) ist die orale Einnahme von 75 mg pro Tag hierfür bereits ausreichend. Der Mechanismus für eine antiinflammatorische Wirkung ist bei dieser Dosis nicht klar, da keine hinreichende systemische Konzentration von Aspirin erzielt wird. Vielmehr beschränkt sich die Wirkung des Aspirins auf Thrombozyten im Portalkreislauf, da ein ausgeprägter „first-pass“ Effekt für dieses Medikament vorliegt. Daher stellt sich die Frage, ob die Hemmung der Bildung von Thromboxan A₂ in Thrombozyten einen Effekt jenseits der Aggregationshemmung aufweist. So ist bereits heute schon bekannt, dass Aspirin die Produktion von Zytokinen (Cyrus T et al, 2002), eine Reduktion des CRP-Werts und ein Absenken der Leukozytenzahl hervorrufen kann, was sich auf inflammatorische Prozesse in der Gefäßwand auswirken könnte (Steinhübel et al, 2007). Auch ist Thromboxan A₂ selbst proatherogen, indem es die Plaquebildung in ApoE defizienten Mäusen begünstigt (Kobayashi et al, 2004). Ob hierfür die verminderte Sekretion von S1P aus Thrombozyten ebenfalls eine Rolle spielt, ist nicht bekannt.

4.2 Aspirin hemmt die Freisetzung von S1P aus Thrombozyten

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine stark verminderte Thromboxansynthese bei Thrombozyten die S1P Freisetzung aus diesen vermindert. Hierbei wurden Blutplättchen mit dem PAR-1-AP, einem starken Plättchenaktivator, oder mit Kollagen stimuliert. ADP bewirkt zwar eine Plättchenaktivierung, kann jedoch keine

ausreichende Thromboxanbildung erzeugen (Jin et al, 2002) und folglich auch keine S1P Freisetzung erzielen. Um zu beweisen, dass die Aktivierung des Thromboxanrezeptors für den Freisetzungsvorgang entscheidend ist, wurde der Thromboxanrezeptorantagonist Ramatroban eingesetzt und erzielte die gleiche hemmende Wirkung wie Aspirin, Diclofenac und Ibuprofen. Stimulierte man Plättchen mit dem Thromboxanrezeptoragonisten, führte eine Vorbehandlung mit Aspirin zu keiner Hemmung, da zwar endogenes Thromboxan nicht gebildet wurde, wohl aber der Stimulus an sich direkt den Thromboxanrezeptor aktiviert. Seine Aktivierung scheint folglich für den Freisetzungsmechanismus von S1P essentiell zu sein.

Unabhängig von der Thromboxanbildung konnte ein gewisser Teil von S1P dennoch freigesetzt werden. Dies geschah in unstimulierten Plättchen, welche kein Thromboxan bildeten. Darüber hinaus bewirkte die Unterdrückung der Thromboxansynthese keine vollständige Hemmung der S1P Freisetzung. Eine weitere Einschränkung stellte die Beobachtung dar, dass die simultane Stimulation von Plättchen mit U46619 und mit PAR-1-AP eine stärkere Freisetzung bewirkte als eine isolierte Stimulation mit einem der beiden Agonisten. Diese Punkte verdeutlichen, dass ein weiterer Freisetzungsvorgang für S1P in Thrombozyten existieren muss, welcher unabhängig von Thromboxan ist. Beispielsweise könnten Mikropartikel, die sich von Thrombozyten ablösen, S1P enthalten. In der Tat ist ein großer Teil des intrazellulären S1P an der zytosolischen Plasmamembran lokalisiert (Kobayashi et al, 2006) und könnte bei einer Abschnürung passiv als Inhaltsstoff der Mikropartikel den Thrombozyten verlassen. Da der Ablösungsvorgang der Mikropartikel nicht thromboxanabhängig ist (Chow TW et al, 2000), könnte dieser Zusammenhang für die angegebenen Erscheinungen verantwortlich sein.

4.3 Mechanismus der S1P Freisetzung

Vorangegangene Veröffentlichungen zeigten die einen Zusammenhang zwischen der zellulären Freisetzung von S1P und ATP-binding Cassette (ABC)-Transportern (Kobayashi et al, 2006, Mitra et al, 2006). Auf der Grundlage dieser Arbeiten wurde die Theorie verfolgt, dass die Freisetzung von S1P auch im Blutplättchen über einen Subtyp dieser Molekelpumpe erfolgt. ABC-Transporter stellen membranständige Proteine dar, welche Moleküle in die Zelle hinein oder aus dieser heraus bewegen. Dieser Vorgang ist energieabhängig und die jeweiligen Transportproteine sind in der Lage verschiedene Moleküle zu transportieren und sind somit nicht substratspezifisch. Es bestehen zahlreiche Subtypen dieser Transporter und es konnte gezeigt werden, dass der ABCC1 Transporter für die Freisetzung von S1P aus

Mastzellen verantwortlich ist (Mitra et al, 2006). Er konnte von der Substanz MK571 gehemmt werden, die sich durch eine generelle Hemmung dieser Transporter-Familie auszeichnet. Unter anderem kann MK571 aber auch den ABCC4 Transporter inhibieren (Jedlitschky et al, 2004), welcher besonders stark auf Thrombozyten exprimiert wird. Dieser wird zusätzlich auch durch Indomethacin und Dipyridamol gehemmt. In der vorliegenden Untersuchung wurde herausgestellt, dass die Freisetzung von S1P durch die angeführten Stoffe, MK571, Indomethacin und Dipyridamol, deutlich gehemmt wird. Dabei wurden Thrombozyten sowohl mit PAR1-AP als auch mit U46619 stimuliert. Folglich scheint der ABCC4 Transporter die Ausschleusung von S1P aus humanen Thrombozyten zu vermitteln. Die Stimulation mit U46619 bewirkt nach der Inkubation mit den genannten Inhibitoren auch keine Freisetzung von S1P, so dass eine eventuelle direkte Aktivierung des Transportproteins unwahrscheinlich ist. Folglich stellt dieser die Endstrecke der Signalkaskade dar.

Die Beleuchtung weiterer Bestandteile der Signalkaskade könnte in weiterführenden Arbeiten erfolgen. So konnte gezeigt werden, dass die Protein-Kinase C die S1P Freisetzung reguliert (Yatomi et al, 1995) und dass ihre Hemmstoffe diese reduzieren. Welche Unterform möglicherweise über die einmündende Signalkaskade des Thromboxanrezeptors spezifisch stimuliert wird und eine Aktivierung der ABC-Transporter verursacht, bleibt offen.

Ein sich aus diesem Zusammenhang zusätzlich ergebender Aspekt, ist der Umstand, dass der ABCC4 Transporter weitere Stoffe wie Leukotriene (Rius M et al, 2008) transportiert, welche dann ebenfalls durch Aspirin vermindert freigesetzt würden. Es ist allgemein bekannt, dass Leukotriene an dem Fortschreiten der Arteriosklerose beteiligt sind (Aiello RJ et al. 2002) und daher wäre eine verminderte Freisetzung somit günstig, um diese Erkrankung zu verlangsamen. Es ist zurzeit jedoch nicht klar, ob die Funktion des ABCC4 Transporters auch in anderen Zellen abhängig von Thromboxan ist.

Da sich die ABC-Transportproteine u. a. dadurch auszeichnen, dass Medikamente in Zellen hinein oder aus diesen heraus bewegt werden, könnten über eine Hemmung durch Aspirin möglicherweise Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten entstehen. Eine solche Interaktion könnte möglicherweise mit Fingolimod stattfinden, da dieses Medikament ebenfalls über ABC-Proteine transportiert wird und strukturell dem S1P ähnlich ist (Honig SM et al, 2003). Bei diesem Medikament handelt es sich darüber hinaus um ein Prodrug, so dass seine Wirkung erst nach einer intrazellulären Phosphorylierung entstehen kann. Die Zellen, die eine solche Reaktion vermitteln, sind nicht identifiziert, jedoch gibt es Untersuchungen, dass Thrombozyten und Erythrozyten diese Reaktion katalysieren können (Anada Y. et al 2007 und Kihara A et al, 2008) und eben Fingolimod auch sezernieren. Ob sie

vorrangig für die Bioverfügbarkeit dieses Medikaments verantwortlich sind, bleibt offen. Falls sie aber hauptverantwortlich für die Umwandlung des Medikaments sein sollten, könnte Aspirin tatsächlich eine reduzierte Wirksamkeit von Fingolimod verursachen.

4.4 Bedeutung von S1P für die Plättchenfunktion

In der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass Aspirin die Degranulation von Alpha- und Dense-Granules nicht vermindert. Dieser Nachweis unterstützt die Beobachtung einer Untersuchung von Kobayashi et al. (2006), die diesen Aspekt an Thrombozyten aus Ratten entdeckt haben. Folglich scheint auch in menschlichen Thrombozyten S1P nicht in den intrazellulären Granula, sondern im Zytoplasma lokalisiert zu sein.

Über eine Wirkung von S1P auf Thrombozyten selbst existieren unterschiedliche Arbeiten mit sich zum Teil widersprechenden Ergebnissen. So wird zum einen S1P eine aktivierende (Xiao H et al, 2001) und zum anderen eine inhibierende Eigenschaft zugesprochen (Nugent D et al 2000). Möglicherweise liegen den unterschiedlichen Ergebnissen eine unterschiedliche Präparation und Durchführung der Aggregationsmessungen zugrunde. In der vorliegenden Untersuchung wurde S1P in verschiedenen Konzentrationen benutzt, um eine Aggregation von plättchenreichem Plasma zu verursachen. Diese blieb jedoch aus. Eine simultane Stimulation mit einer unterschwelligen Konzentration von PAR1-AP führte zu keiner verstärkten Aggregation von Thrombozyten. Somit muss festgehalten werden, dass S1P wohl nicht vornehmlich für die Plättchenaktivierung verantwortlich ist, sondern auf andere Gefäßzellen eine Wirkung ausübt.

4.5 Aspirin hemmt die Freisetzung von S1P –mögliche Effekte auf Patienten

Ziel weiterführender Untersuchungen wäre es herauszufinden, ob oral eingenommenes Aspirin in der Lage ist, die S1P Freisetzung aus Thrombozyten zu beeinflussen. Da in den bisherigen Versuchen klar herausgestellt wurde, dass die Freisetzung von S1P thromboxanabhängig ist, sollte die orale aber auch die intravenöse Applikation von Aspirin den gleichen Effekt erzielen. Anzunehmen ist also die Hemmung der S1P Sekretion aus Plättchen im Organismus, sofern die Thromboxansynthese unterdrückt und dadurch die Plättchenaggregation eingeschränkt ist. Für gewöhnlich wird dieser Effekt durch eine tägliche Einnahme von 100 mg Aspirin nach 3 Tagen bzw. nach einer einmaligen Einnahme von 300 mg erreicht (Morris T et al, 2009). Damit hätte der in dieser Arbeit beschriebene Effekt eine klare physiologische Relevanz. Welche Konsequenzen sich daraus für den Organismus ergeben bleibt jedoch offen. Jedes vaskuläre Ereignis, wie eine Verletzung oder eine

Gefäßokklusion, wie z.B. durch einen Myokardinfarkt bedingt, führt zur Aktivierung von Thrombozyten. Liegt jedoch eine Vorbehandlung mit Aspirin vor, so würden diese am Ort des Geschehens weniger S1P freisetzen. Da in den vorliegenden Versuchen S1P offenbar keine relevante Auswirkung auf die Aggregation ausübt, sind eher modulierende Eigenschaften zu vermuten. Dazu zählen beispielsweise das Migrations- und Proliferationsverhalten von Monozyten und Endothelzellen.

So ist in derartigen Akutsituationen die Einwanderung von Monozyten entscheidend, um Zelldetritus zu beseitigen und Regenerationsvorgänge zu initiieren. Eine verminderte Einwanderung von Monozyten, durch eine reduzierte Menge von S1P, hätte somit negative Auswirkungen auf die Wundheilung. Für Aspirin ist seit langem eine hemmende Eigenschaft für diesen Vorgang bekannt (Sato T et al. 2013). Dennoch überwiegen die positiven Effekte über den antiaggregatorischen Effekt und Aspirin senkt die Mortalität im Allgemeinen (Berger JS 2012).

Darüber hinaus könnte der Plasmagehalt des S1P die Wirksamkeit von Aspirin widerspiegeln. In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bei manchen Patienten eine Aspirinresistenz vorliegt (Zimmermann N et al, 2006), so dass dieses Medikament in einer solchen Konstellation keinen therapeutischen Wert hat oder unterdosiert ist. Die Testung der Wirksamkeit von Aspirin ist aufwendig, da entweder eine Aggregation mit Arachidonsäure oder eine Thromboxanbestimmung erfolgen müssen. Beide Untersuchungen sind für eine akute Diagnostik nicht geeignet. Ob eine Bestimmung von S1P Spiegel als möglicher zukünftiger Parameter zur Beurteilung der Aspirinwirkung oder zur Erfassung parakriner Plättchenfunktionen geeignet ist, müssen zukünftige Studien klären.

Die Konzentration des zur Aktivierung von Plättchen benötigten Thromboxan ist äußerst niedrig. Es ist erforderlich, dass die Thromboxansynthese zu mehr als 90 % (Reilly et al, 1987) gehemmt ist, um eine Plättchenaggregation effektiv zu verhindern. Dieser Umstand verdeutlicht die Relevanz einer täglichen Einnahme von ASS 100 mg zur Verminderung einer Plättchenaktivierung, da täglich fast 10% der Thrombozyten aus dem Knochenmark erneuert werden und eine funktionierende COX haben, die die Voraussetzung für eine Thromboxanbildung darstellt. Dieser tägliche Nachschub von Thrombozyten aus dem Knochenmark kann zu einer Aufhebung der Aspirinwirkung führen, falls das Medikament nicht täglich eingenommen wird. Dieser Zusammenhang betrifft auch die S1P Freisetzung. Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine Thromboxankonzentration von 80 ng/ ml für die volle S1P Freisetzung ausreichend ist. Folglich würde eine Hemmung der S1P Freisetzung in vivo auch nur bei einer täglichen Einnahme von Aspirin erfolgen.

4.6 Untersuchungen an Thromboxanrezeptor-Knock-out Mäusen

Als weiteren Beweis für die Thromboxanabhängigkeit der S1P Freisetzung wurden Mäuse untersucht, die einen Knock-out des Thromboxanrezeptors hatten. Bei diesen stellte sich im Vergleich zu gewöhnlichen Mäusen eine verminderte S1P Sekretion dar. Die Zufuhr von Aspirin konnte keine weitere Reduktion der S1P Sekretion bewirken. Die Konzentration von S1P im Plasma der „Knock-Out“ Tiere zeigte keine signifikante Reduktion im Vergleich zu den gewöhnlichen Tieren. Dies deutet darauf hin, dass der basale S1P Gehalt des Plasmas nicht thrombozytären Ursprungs ist (Pappu et al, 2007) und dass eine Thrombozytenaktivierung möglicherweise nur eine mittelfristige Modulation der systemischen Konzentration bewirkt. Hierbei würde Aspirin in der Tat über seine beschriebene Hemmung den S1P Gehalt des Plasmas beeinflussen können. Um diese Überlegung zu beweisen sind Untersuchungen von Patientenproben nötig, bei welchen eine Thrombozytenaktivierung vorliegt und Aspirin verabreicht wird. So konnte in der Arbeit von Polzin et al. (2013) gezeigt werden, dass Thrombozyten von Herzinfarktpatienten, die mit Aspirin behandelt wurden, tatsächlich weniger S1P freisetzen.

4.7 Einfluss von thrombozytärem S1P auf humane Monozyten

Wie bereits geschrieben führt eine Plättchenaktivierung während der Hämostase zu einer Freisetzung von S1P (Yatomi Y et al, 1995). Die aktivierten Gerinnungsenzyme führen letztlich zur Bildung eines Gerinnsels und zur Migration von Monozyten. Für das freigesetzte S1P ist eine chemotaktische Wirkung auf Monozyten beschrieben (Gude DR et al, 2008), so dass unter der Annahme einer verminderten Freisetzung hiervon in vivo, eben die Monozytenmigration weniger stark ausfällt. Um den Effekt von S1P auf Monozyten zu beleuchten, wurden sowohl Migrationsversuche mit humanen Monozyten als auch mit U937 Zellen unternommen. Benutzt wurden Überstände von Thrombozyten, die entweder zunächst unbehandelt oder mit Aspirin vorbehandelt waren und anschließend mit PAR1-AP stimuliert wurden. Die Überstände unterschieden sich durch ihren unterschiedlichen Gehalt an S1P, was über eine Messung mittels Massenspektroskopie gelang, und wurden mit Monozyten versetzt. Anschließend ließ man die Monozyten gegenüber einem festen Reiz wie Serum oder MCP-1 (Gude DR et al, 2008) migrieren und stellte fest, dass die Vorbehandlung mit Aspirin eine reduzierte Migration erzeugte. Um zu beweisen, dass der unterschiedliche Gehalt an S1P verantwortlich für das unterschiedliche Migrationsverhalten war, wurde mittels Si-RNA die S1P Rezeptorexpression der benutzten Monozyten vermindert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit den genannten Thrombozytenüberständen. Das Migrationsverhalten von

Monozyten zeigte eine Reduktion, wenn die Zellen keine S1P1 oder S1P3 Rezeptoren mehr hatten. Die Reduktion war ähnlich stark wie diejenige, die nach der Vorbehandlung mit Aspirin benutzten Thrombozyten herrührte. Folglich konnte gezeigt werden, dass der reduzierte S1P Gehalt verantwortlich für das Migrationsverhalten war und dass generell das Vorhandensein von S1P1 und S1P3 Rezeptoren auf Monozyten notwendig für ihre Migration ist.

Monozyten stellen eine Schlüsselrolle in der Entwicklung der Arteriosklerose dar (Ghattas A 2013). Sie verstärken das Entzündungsgeschehen in der Gefäßwand, indem sie beispielsweise vermehrt Interleukine produzieren (Domsalla A et. Al 2002). Falls nun beispielsweise Thrombozyten an der Oberfläche von Endothelzellen bei endothelialer Dysfunktion aktiviert werden, setzen diese S1P frei und fördern die Monozytenmigration. Die in dieser Arbeit beschriebene Reduktion dieses Vorgangs, könnte für ein geringeres Fortschreiten dieser Erkrankung verantwortlich sein. Ursächlich für das verminderte Migrationsverhalten, neben dem direkten Einfluss von S1P, könnte auch eine indirekte über eine modulierte Expression von Rezeptoren an der Oberfläche sein (Böhm A et al, 2013). So werden bereits eingewanderte Monozyten weiterhin einer ggf. unterschiedlichen Konzentration von S1P ausgesetzt, was sich auf ihre proinflammatorische Funktion auswirken kann.

Die angeführten Beobachtungen dieser Arbeit verdeutlichen, dass S1P ein proinflammatorischer Botenstoff ist und die Rekrutierung von Monozyten zu einem Entzündungsort vermitteln kann. Der beschriebene Mechanismus, dass eine verminderte S1P Sekretion aus Thrombozyten durch Aspirin hervorgerufen wird ist neu und könnte einen Teil der antiinflammatorischen Wirkung von Aspirin erklären. Außerdem wäre eine Hemmung weiterer monozytärer Funktionen über diesen Mechanismus denkbar. So könnten die Zellen u. U. weniger Radikale bilden, die zu zellulärem Schaden führen.

Darüber hinaus geht dieser Befund damit einher, dass niedrige Dosierungen von Aspirin, die normalerweise nur einen antiaggregatorischen Effekt aufweisen, über den genannten Mechanismus indirekt die antiatherogene Eigenschaft dieses Medikaments mit erklären könnten.

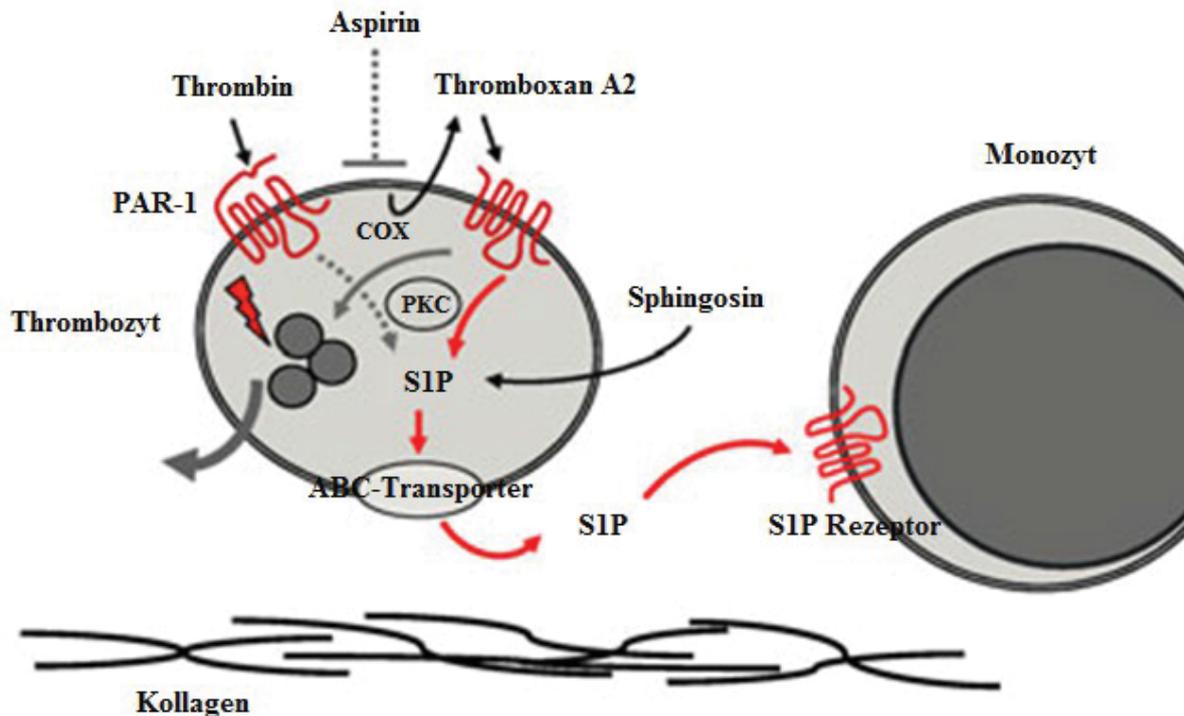


Abbildung 4. Eine Aktivierung von Thrombozyten durch Thrombin führt zu einer Thromboxan-Bildung und Thromboxan-Rezeptor-Aktivierung. Diese bewirkt eine Freisetzung von S1P. Diese konnte wiederum durch eine Vorinkubation der Plättchen mit Aspirin reduziert werden. Der konsekutiv verminderte Gehalt an S1P bedingt eine verminderte Migration von Monozyten.

4.8 Ausblick – Möglicher Einfluss von thrombozytärem S1P auf humane Endothelzellen

Ein weiterer Effekt, der möglicherweise durch die verminderte Freisetzung von S1P bedingt wird, ist eine verminderte Angiogenese. In einer Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Einnahme von Aspirin zu einer verminderten Bildung von Kapillaren führen kann (Rhee JS et al, 2004). S1P ist ein bekannter Mediator, der Endothelzellen zur Migration, zur Proliferation und zu einer „tubeformation“, also einer in vitro Bildung von Kapillaren, bewegen kann (Rikitake Y et al, 2002). Ein reduziertes Angebot dieser Substanz, könnte an Entzündungsorten eine verminderte Angiogenese verursachen. Über einen solchen Mechanismus könnte auch ein Tumorwachstum möglicherweise langsamer stattfinden, da in einem Tumorgewebe sehr häufig eine Entzündung und eine Aktivierung des Gerinnungssystems stattfinden. Klinische Untersuchungen zeigen in der Tat bei Patienten, die dauerhaft Aspirin einnehmen, u. a. eine geringere Inzidenz von Kolonkarzinomen (Rosenberg L et al, 1998). Diese Erscheinung könnte möglicherweise mit durch den in der vorliegenden Arbeit herausgestellten Mechanismus erklärbar sein.

5. Literaturverzeichnis

1. Aiello RJ, Bourassa PA, Lindsey S, Weng W, Freeman A, Showell HJ. "Leukotriene B4 receptor antagonism reduces monocytic foam cells in mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 443-449
2. Aktas O, Küry P, Kieseier B, Hartung HP. "Fingolimod is a potential novel therapy for multiple sclerosis." *Nat Rev Neurol*. 2010 Jul;6(7):373-82.
3. Anada Y, Igarashi Y, Kihara A. "The immunomodulator FTY720 is phosphorylated and released from platelets." *Eur J Pharmacol*. 2007 Jul 30;568(1-3):106-11.
4. Berger JS, Lala A, Krantz MJ, Baker GS, Hiatt WR. "Aspirin for the prevention of cardiovascular events in patients without clinical cardiovascular disease: a meta-analysis of randomized trials." *Am Heart J*. 2011; 162(1):115–24.
5. Böhm A, Sostmann B, Rauch BH "The bioactive lipid sphingosine-1-phosphate enhances thrombin-induced migration of human monocytes via transcriptional regulation of the protease-activated receptor-4." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2013; 386:S11-S12.
6. Cayatte AJ, Du Y, Oliver-Krasinski J "The TP-receptor antagonist, S18886, but not aspirin inhibits atherogenesis in apolipoprotein E deficient mice: evidence that other eicosanoids contribute to atherosclerosis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20:1724
7. Che J, Okigaki M, Takahashi T, Katsume A, Adachi Y, Yamaguchi S, Matsunaga S, Takeda M, Matsui A, Kishita E, Ikeda K, Yamada H, Matsubara H. "Endothelial FGF receptor signaling accelerates atherosclerosis." *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011 Jan; 300(1):H154-61.
8. Cyrus T1, Sung S, Zhao L, Funk CD, Tang S, Praticò D. "Effect of low-dose aspirin on vascular inflammation, plaque stability, and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice." *Circulation*. 2002 Sep 3; 106(10):1282-7.

9. Deutschman DH, Carstens JS, Klepper RL, Smith WS, Page MT, Young TR, Gleason LA, Nakajima N, Sabbadini RA. "Predicting obstructive coronary artery disease with serum sphingosine-1-phosphate." *Am Heart J* 2003; 146: 62–8.
10. Domsalla A, Melzig MF "Enhancement of protease-induced IL-6 release in monocytic U-937 cells by phorbol-12-myristate-13-acetate." *Inflamm Res* 2012; 61:1125-1129.
11. English D, Kovala AT, Welch Z, Harvey KA, Siddiqui RA, Brindley DN, Garcia JG. "Induction of endothelial cell chemotaxis by sphingosine 1-phosphate and stabilization of endothelial monolayer barrier function by lysophosphatidic acid, potential mediators of hematopoietic angiogenesis." *J Hematother Stem Cell Res.* 1999 Dec; 8(6):627-34.
12. Fitzgerald DJ. "Vascular biology of thrombosis: the role of platelet-vessel wall adhesion." *Neurology.* 2001; 57(5 Suppl 2):S1-4.
13. Ghattas A, Griffiths HR, Devitt A, Lip GY, Shantsila E "Monocytes in coronary artery disease and atherosclerosis: where are we now?" *J Am CollCardiol* 2013; 62:1541-1551.
14. Gude DR, Alvarez SE, Paugh SW, Mitra P, Yu J, Griffiths R, Barbour SE, Milstien S, Spiegel S. "Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a "come-and-get-me" signal." *FASEB J.* 2008 Aug; 22(8):2629-38.
15. Hänel P, Andréani P, Gräler MH. "Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood." *FASEB J.* 2007 Apr; 21(4):1202-9
16. Hoh BL, Hosaka K, Downes DP, Nowicki KW, Fernandez CE, Batich CD, Scott EW. "Monocyte chemoattractant protein-1 promotes inflammatory vascular repair of murine carotid aneurysms via a macrophage inflammatory protein-1 α and macrophage inflammatory protein-2-dependent pathway." *Circulation.* 2011 Nov 15; 124(20):2243-52.
17. Honig SM, Fu S, Mao X, Yopp A, Gunn MD, Randolph GJ, Bromberg JS. "FTY720 stimulates multidrug transporter- and cysteinyl leukotriene-dependent T cell chemotaxis to lymph nodes." *J Clin Invest.* 2003 Mar; 111(5):627-37.

18. Ito K, Anada Y, Tani M, Ikeda M, Sano T, Kihara A, Igarashi Y. "Lack of sphingosine 1-phosphate-degrading enzymes in erythrocytes." *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 May 25; 357(1):212-7.
19. Jedlitschky G, Tirschmann K, Lubenow LE, Nieuwenhuis HK, Akkerman JW, Greinacher A, Kroemer HK. "The nucleotide transporter MRP4 (ABCC4) is highly expressed in human platelets and present in dense granules, indicating a role in mediator storage." *Blood* 2004; 104: 3603–10.
20. Jin J, Quinton TM, Zhang J, Rittenhouse SE, Kunapuli SP. "Adenosine diphosphate (ADP)-induced thromboxane generation in human platelets requires coordinated signaling through integrin alpha(IIb)beta(3) and ADP receptors." *Blood* 2002. Jan 1; 99(1):193-8
21. Kihara A, Igarashi Y. "Production and release of sphingosine 1-phosphate and the phosphorylated form of the immunomodulator FTY720." *Biochim Biophys Acta*. 2008 Sep; 1781(9):496-502.
22. Kimura T, Sato K, Kuwabara A, Tomura H, Ishiwara M, Kobayashi I, Ui M, Okajima F. "Sphingosine 1-phosphate may be a major component of plasma lipoproteins responsible for the cytoprotective actions in human umbilical vein endothelial cells." *J Biol Chem*. 2001 Aug 24; 276(34):31780-5. Epub 2001 Jun 26.
23. Kobayashi N, Nishi T, Hirata T, Kihara A, Sano T, Igarashi Y, Yamaguchi A. "Sphingosine 1-phosphate is released from the cytosol of rat platelets in a carrier-mediated manner." *J Lipid Res* 2006; 47: 614–21.
24. Kobayashi T, Tahara Y, Matsumoto M, Iguchi M, Sano H, Murayama T, Arai H, Oida H, Yurugi-Kobayashi T, Yamashita JK, Katagiri H, Majima M, Yokode M, Kita T, Narumiya S "Roles of thromboxane A(2) and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice." *J Clin Invest* (2004), 114:784-794
25. Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X. "Signaling during platelet adhesion and activation." *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010 Dec; 30(12):2341-9.

26. Lin CI, Chen CN, Chen JH, Lee H. "Lysophospholipids increase IL-8 and MCP-1 expressions in human umbilical cord vein endothelial cells through an IL-1-dependent mechanism." *J Cell Biochem.* 2006 Nov 1; 99(4):1216-32.
27. Maceyka, M., H. Sankala " SphK1 and SphK2, sphingosine-kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism." *J BiolChem* (2005) 280(44): 37118-37129.
28. Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL, Cyster JG. "Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1." *Nature* 2004; 427: 355–60.
29. Merten M, Pakala R, Thiagarajan P, Benedict CR. "Platelet microparticles promote platelet interaction with subendothelial matrix in a glycoprotein IIb/IIIa-dependent mechanism." *Circulation.* 1999 May 18; 99(19):2577-82.
30. Mitra P, Oskeritzian CA, Payne SG, Beaven MA, Milstien S, Spiegel S. "Role of ABCC1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells." *Proc Natl AcadSci USA* 2006; 103: 16394–9.
31. Moriyama T, Wada K, Oki M, Matsuura T, Kito M. "The mechanism of arachidonic acid release in collagen-activated human platelets." *Biosci Biotechnol Biochem.* 1994 Jan; 58(1):93-8.
32. Morris T, Stables M, Hobbs A, de Souza P, Colville-Nash P, Warner T, Newson J, Bellingan G, Gilroy DW. "Effects of low-dose aspirin on acute inflammatory responses in humans." *J Immunol* 2009; 183: 2089–2096
33. Murphy AJ, Sarrazy V, Wang N, Bijl N, Abramowicz S, Westerterp M, Welch CB, Schuetz JD, Yvan-Charvet L "Deficiency of ATP-binding cassette transporter B6 in megakaryocyte progenitors accelerates atherosclerosis in mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014; 34:751–758
34. Paul A, Calleja L, Camps J, et al. "The continuous administration of aspirin attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." *Life Sci.* 2000; 68:457–465.

35. Pappu R, Cheng AM, Li B, Gong Q, Chiu C, Griffin N, White M, Sleckman BP, Chan AC. "Requirement for B cell linker protein (BLNK) in B cell development." *Science*. 1999 Dec 3; 286(5446):1949-54
36. Pedersen AK, FitzGerald GA. "Dose-related kinetics of aspirin. Presystemic acetylation of platelet cyclooxygenase." *N Engl J Med*. 1984 Nov 8; 311(19):1206-11.
37. Pham TH, Baluk P, Xu Y, Grigorova I, Bankovich AJ, Pappu R, Coughlin SR, McDonald DM, Schwab SR, Cyster JG. "Lymphatic endothelial cell sphingosine kinase activity is required for lymphocyte egress and lymphatic patterning." *J Exp Med*. 2010 Jan 18;207(1):17-27. Epub 2009 Dec 21.
38. Pinedo HM, Verheul HM, D'Amato RJ, Folkman J. "Involvement of platelets in tumour angiogenesis?" *Lancet*. 1998 Nov 28; 352(9142):1775-7.
39. Reilly IA, FitzGerald GA. "Inhibition of thromboxane formation in vivo and ex vivo: implications for therapy with platelet inhibitory drugs." *Blood*. 1987 Jan; 69(1):180-6.
40. Rhee JS, Black M, Schubert U, Fischer S, Morgenstern E, Hammes HP, Preissner KT. "The functional role of blood platelet components in angiogenesis." *Thromb Haemost*. 2004 Aug; 92(2):394-402.
41. Rikitake Y, Hirata K, Yamashita T, Iwai K, Kobayashi S, Itoh H, Ozaki M, Ejiri J, Shiomi M, Inoue N, Kawashima S, Yokoyama M. "Expression of G2A, a receptor for lysophosphatidylcholine, by macrophages in murine, rabbit, and human atherosclerotic plaques." *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002 Dec 1;22(12):2049-53.
42. Rius M, Hummel-Eisenbeiss J, Keppler D. "ATP dependent transport of Leukotrienes B4 and C4 by the multidrug resistance protein ABCC4." *J Pharmacol Exp Ther*. 2008; 324(1):86-94
43. Rosenberg L, Louik C, Shapiro S. "Nonsteroidal antiinflammatory drug use and reduced risk of large bowel carcinoma." *Cancer*. 1998 Jun 15;82(12):2326-33.

44. Ross R1. "Atherosclerosis - an inflammatory disease." *N Engl J Med.* 1999 Jan 14; 340(2):115-26.
45. Sambrano GR1, Weiss EJ, Zheng YW, Huang W, Coughlin SR. "Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis." *Nature.* 2001 Sep 6; 413(6851):74-8.
46. Schrör K. "Aspirin and platelets: the antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis." *Semin Thromb Hemost.* 1997; 23(4):349-56.
47. Schaphorst KL, Chiang E, Jacobs KN, Zaiman A, Natarajan V, Wigley F, Garcia JG. "Role of sphingosine-1 phosphate in the enhancement of endothelial barrier integrity by platelet-released products." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003 Jul; 285(1):L258-67.
48. Steinhubl SR, Badimon JJ, Bhatt DL, Herbert JM, Luscher TF. "Clinical evidence for anti-inflammatory effects of antiplatelet therapy in patients with atherothrombotic disease." *Vasc Med* 2007; 12: 113–22.
49. Sungaran R, Markovic B, and Chong BH. "Localization and regulation of thrombopoietin mRNA expression in human kidney, liver, bone marrow and spleen using in situ hybridization." *Blood* 89: 101107, 1997.
50. Triplett DA. "Coagulation and bleeding disorders: review and update." *Clin Chem* 46: 12601269, 2000
51. Venkataraman K, Lee YM, Michaud J, Thangada S, Ai Y, Bonkovsky HL, Parikh NS, Habrukowich C, Hla T. "Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine-1-phosphate." *Circ Res.* 2008 Mar 28; 102(6):669-76.
52. Wang F, Van Brocklyn JR, Hobson JP, Movafagh S, Zukowska-Grojec Z, Milstien S, Spiegel S. "Sphingosine 1-phosphate stimulates cell migration through a G(i)-coupled cell surface receptor. Potential involvement in angiogenesis." *J Biol Chem.* 1999 Dec 10; 274(50):35343-50.

53. Weis T, Völker W, Holtwick R, Al Chahaf M, Schmidt A. "Sphingosine 1-phosphate (S1P) induces expression of E-selectin and adhesion of monocytes via intracellular signalling pathways in vascular endothelial cells." *Eur J Cell Biol.* 2010 Oct; 89(10):733-41.
54. White JG. Anatomy and structural organization of the platelet. "In: Colman RW, Hirsch J, Marder VJ, Salzman EW, eds. *Hemostasis and Thrombosis Basic Principles and Clinical Practice (3rd Ed).*" Philadelphia, PA: Lippincott; 1994:397-413
55. *Basic Principles and Clinical Practice (3rd Ed).* Philadelphia, PA: Lippincott; 1994:397-413
56. Wolber EM and Jelkmann W. "Interleukin-6 increases thrombopoietin production in human hepatoma cells HepG2 and Hep3B." *J Interferon Cytokine Res* 20: 499-506, 2000.
57. Xia P, Wang L, Gamble JR, Vadas MA. "Activation of sphingosine kinase by tumor necrosis factor-alpha inhibits apoptosis in human endothelial cells." *J Biol Chem.* 1999 Nov 26; 274(48):34499-505.
58. Xiao H, Siddiqui RA, Al-Hassani MH, Sliva D, Kovacs RJ. "Phospholipids released from activated platelets improve platelet aggregation and endothelial cell migration." *Platelets.* 2001 May; 12(3):163-70
59. Yatomi Y, Ruan F, Hakomori S, Igarashi Y. "Sphingosine-1-phosphate: a platelet-activating sphingolipid released from agonist-stimulated human platelets." *Blood* 1995; 86: 193-202.
60. Yatomi Y, Ohmori T, Rile G, Kazama F, Okamoto H, Sano T, Satoh K, Kume S, Tigyi G, Igarashi Y, Ozaki Y. "Sphingosine 1-phosphate as a major bioactive lysophospholipid that is released from platelets and interacts with endothelial cells." *Blood.* 2000 Nov 15; 96(10):3431-8
61. Zimmermann N, Wenk A, Kim U, Kienzle P, Weber AA, Gams E, Schrör K, Hohlfeld T. "Functional and biochemical evaluation of platelet aspirin resistance after coronary artery bypass surgery." *Circulation.* 2003 Aug 5; 108(5):542-7. Epub 2003 Jul 21

6 Publikationen und Kongressbeiträge

6.1 Originalarbeiten

Release of sphingosine-1-phosphate from human platelets is dependent on thromboxane formation

Ulrych T, Böhm A, Polzin A, Daum G, Nüsing RM, Geisslinger G, Hohlfeld T, Schrör K, Rauch BH.

Journal of Thrombosis and Haemostasis.2011 Apr;9(4):790-8.

6.2 Kongressbeiträge

Polzin A, Bohm A, Ulrych T, Rosenkranz A, Schror K, Rauch BH. „Aspirin attenuates endothelial cell migration induced by platelet supernatants via reduced platelet sphingosine-1-phosphate release”. *Naunyn-SchmiedebergsArchives of Pharmacology*, Volume 383 Pages:4-4 Supplement (2011)

77th Annual Meeting on German-Society-for-Experimental-and-Clinical-Pharmacology-and-Toxicology Frankfurt

Polzin A, Bohm A, Ulrych T, Rosenkranz AC, Hohlfeld T, Schroer, K, Rauch BH (2011). Sphingosine-1-Phosphate is Thromboxane-dependently Released from Platelets and Modulates Chemotaxis of Human Monocytes. *Circulation* Volume 122 Issue 21 122:A16950

Rauch BH, Ulrych T, Bohm A, Rosenkranz AC, Geisslinger G, Hohlfeld T, Schror K (2010). “Inhibition of platelet-derived sphingosine-1-phosphate release by acetylsalicylic acid is associated with attenuated monocyte migration”. *Naunyn-SchmiedebergsArchives of Pharmacology* Volume 381 Pages 88-88 Supplement 1

51st Annual Meeting of the Deutsche-Gesellschaft-fur-Experimentelle-und-Klinische-Pharmakologie-und-Toxikologie, Mainz

Bohm A, Ulrych T, Rosenkranz AC, Daum G, Geisslinger G, Hohlfeld T, Schror K, Rauch BH (2009). „Release of Sphingosine-1-Phosphate From Platelets Requires Thromboxane Synthesis and Thromboxane Receptor Activation”. *Circulation* Volume 120 Issue 18 Pages S1080-S1080 Supplement 2

82nd Scientific Session of the American-Heart-Association, Orlando

Ulrych T, Rosenkranz AC, Hohlfeld T, Schror K, Rauch BH (2009). „Acetylsalicylic acid inhibits the release of sphingosine-1-phosphate from human platelets”. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* Volume 379 Pages 96-96 Meeting Abstract: 485

50th Annual Meeting of the Deutsche-Gesellschaft-fur-Experimentelle-und-Klinische-Pharmakologie-und-Toxikologie, Mainz

Rauch BH, Ulrych T, Rosenkranz AC, Hohlfeld T, Schror K (2008). “Aspirin inhibits release of sphingosine-1-phosphate from human platelets”. *Arteriosclerosis thrombosis and vascular biology* Volume 28 Issue 6 Pages E104-E104 Meeting Abstract P391

9th Annual Conference on Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, Atlanta

7 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

6.04.2016 Thomas Ulrych