

Aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Jens Fischer

**Die konzentrationsabhängige Bedeutung des  
Sphingosin-1-phosphat bei der Thrombozyten-  
Endothelzell-Interaktion**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Betül Knoop

2020

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Thomas Hohlfeld

Zweitgutachter: Frau Prof. Dr. Martina Krüger

## **Widmung**

Ich widme diese Arbeit meinen Eltern Ayşe und Mahmut Akyıldız.

## Zusammenfassung

Laut statistischem Bundesamt sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Deutschland mit Abstand die häufigste Todesursache. Erkrankungen, wie zum Beispiel der Herzinfarkt, Schlaganfall und die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) sind stark mit der Atherosklerose assoziiert. Thrombozyten spielen nicht nur bei der initialen Phase der Atherosklerose, sondern auch bei seinen Komplikationen, wie zum Beispiel den thromboembolischen Ereignissen eine entscheidende Rolle. Bei der Suche nach weiteren Therapieoptionen stellt das Sphingosin-1-Phosphat (S1P) ein vielversprechendes Target dar.

S1P ist ein biologisch aktives Sphingolipid, welches Einfluss auf grundlegende pathophysiologische Prozesse wie die Entzündung, die Immunität und das Herz-Kreislauf-System nimmt. S1P vermittelt seine Wirkung über fünf G-Proteingekoppelte Rezeptoren (S1P<sub>1-5</sub>). Der Einfluss von S1P auf die Atherosklerose ist bereits gut untersucht. Allerdings ist sein Einfluss auf die thrombotischen Prozesse, die bei der Atherosklerose von Bedeutung sind, nur unzureichend bekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es den Einfluss von S1P auf die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion zu untersuchen und den zugrundeliegenden Mechanismus zu ermitteln. In dieser Arbeit wurde zur Ermittlung der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion das Flusskammermodell der Firma I&L Biosystems etabliert. HUVEC- (*Human umbilical vein endothelial cells*) Endothelzellen wurden mit S1P unterschiedlicher Konzentration stimuliert und anschließend mit Vollblut perfundiert. Wir konnten zeigen, dass S1P konzentrationsabhängig die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion beeinflusst. So führte S1P in physiologisch relevanter Konzentration über den S1P<sub>1</sub>-Rezeptor zu einer Erniedrigung der Thrombozytenadhäsion, wohingegen S1P in höherer Konzentration über den S1P<sub>3</sub>-Rezeptor die Thrombozytenadhäsion steigerte.

Mittels Durchflusszytometrie wurde die P-Selektin-Expression auf der Endothelzelloberfläche ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass S1P eine Translokation von P-Selektin auf die Endothelzelloberfläche induziert.

Für den Effekt von S1P in höherer Konzentration konnten wir folgenden Mechanismus identifizieren: Die höhere S1P-Konzentration führt über den S1P<sub>3</sub>-Rezeptor Phospholipase C (PLC) abhängig zu einer Hochregulierung der P-Selektin Expression auf die Zelloberfläche mit einer Steigerung der Thrombozytenadhäsion auf dem Endothel. Der genaue Mechanismus für S1P in physiologisch relevanter Konzentration ist noch nicht ganz geklärt und bedarf noch weiterer Forschung.

Vor dem Hintergrund der Prävention wäre es sinnvoll höhere S1P-Konzentrationen im Organismus zu vermeiden. Möglich wären spezifische Modulatoren der Sphingosinkinase, S1P-Phosphatase und S1P-Lyase, um somit die Konzentration des bioaktiven S1P zu beeinflussen. Denkbar wäre auch die medikamentöse Anwendung von S1P-Rezeptoragonisten und S1P-Rezeptorantagonisten um gezielt bestimmte Signalwege zu beeinflussen.

## Summary

According to the Federal Statistical Office, cardiovascular diseases are by far the most common cause of death in Germany. Diseases such as heart attack, stroke and peripheral artery disease (PAD) are strongly associated with atherosclerosis. Platelets play a crucial role not only in the initial phase of atherosclerosis, but also in its complications, such as thromboembolic events. When looking for further therapy options, sphingosine-1-phosphate (S1P) is a promising target.

S1P is a biologically active sphingolipid, which influences fundamental pathophysiological processes such as inflammation, immunity and the cardiovascular system. S1P mediates its action via five G protein-coupled receptors (S1P1-5). The influence of S1P on atherosclerosis has been well studied. However, its influence on the thrombotic processes that are important in atherosclerosis is only poorly understood.

Aim of the present work was to investigate the influence of S1P on the platelet-endothelial cell interaction and to determine the underlying mechanism. In this work, the flow chamber model from I&L Biosystems was established to determine the platelet-endothelial cell interaction. HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells) were stimulated with S1P in different concentrations and then perfused with whole blood. We were able to show that S1P influences the platelet-endothelial cell interaction concentration-dependent. Thus, S1P in a physiologically relevant concentration led to a decrease in platelet adhesion via the S1P1 receptor, whereas S1P in a higher concentration increased platelet adhesion via the S1P3 receptor. P-selectin expression on the endothelial cell surface was determined by flow cytometry. It could be shown that S1P induces a translocation of P-selectin on the endothelial cell surface.

We were able to identify the following mechanism for the effect of S1P in higher concentration: The higher S1P concentration leads to an upregulation of P-selectin expression on the cell surface via the S1P3 receptor phospholipase C (PLC) with an increase in platelet adhesion on the endothelium. The exact mechanism for S1P in physiologically relevant concentration has not yet been fully clarified and requires further research.

Against the background of prevention, it would make sense to avoid higher S1P concentrations in the organism. One possibility would be to use specific modulators of sphingosine kinase, S1P phosphatase and S1P lyase in order to influence the concentration of the bioactive S1P. It would also be conceivable to use S1P receptor agonists and S1P receptor antagonists to influence specific signalling pathways.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat
<b>AMP</b>	Adenosinmonophosphat
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>Akt</b>	Protein kinase B (PKB)
<b>BSA</b>	Bovines Serum Albumin
<b>Calcein AM</b>	AM= Acetoxymethylester
<b>cAMP</b>	Cyclisches Adenosinmonophosphat
<b>cGMP</b>	Cyclisches Guanosinmonophosphat
<b>DMSO</b>	<i>Dimethylsulfoxid</i>
<b>ECBM</b>	<i>Endothelial Cell Basal Medium</i>
<b>ECGM</b>	<i>Endothelial Cell Growth Medium</i>
<b>ECGS</b>	<i>Endothelial Cell Growth Supplement</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EDG</b>	<i>Endothelial Differentiation Gene</i>
<b>EGF</b>	<i>Endothelial Growth Factor</i>
<b>ERK</b>	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
<b>FACS</b>	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
<b>FCS</b>	fetales Kälberserum
<b>GP</b>	Glykoprotein
<b>GTPasen</b>	Guanosintriphosphat
<b>HDL</b>	<i>High Density Lipoprotein</i>
<b>HS</b>	<i>Humanserum</i>
<b>HUVEC</b>	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
<b>ICAM-1, -2</b>	<i>Interzelluläre Zelladhäsionsmolekül 1, 2</i>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleukin- 1 $\beta$
<b>IUPHAR</b>	<i>International union of pharmacology</i>
<b>LDL</b>	<i>Low Density Lipoprotein</i>
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>MCP-1</b>	<i>monocyte chemotactic protein-1</i>
<b>mRNA</b>	messenger ribonucleic acid
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid

<b>PAR-1</b>	Protease-aktivierte Rezeptoren-1
<b>pAVK</b>	arterielle Verschlusskrankheit
<b>PBS</b>	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
<b>PECAM-1</b>	Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül-1
<b>PDGF</b>	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostazyklin
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol 3-Kinase
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>P/S</b>	Penicillin/Streptomycin
<b>Rac</b>	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>
<b>Ras</b>	<i>Rat sarcoma</i>
<b>Rho</b>	<a href="#"><u>Ras</u></a> homologue
<b>S1P</b>	Sphingosin-1-phosphat (S1P)
<b>SBS</b>	<a href="#"><u>Society for Biomolecular Screening</u></a>
<b>siRNA</b>	<i>Small interfering ribonucleic acid</i>
<b>Sphk</b>	Sphingosinkinase
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
<b>TNS</b>	<i>Trypsin Neutralizing Solution</i>
<b>VCAM-1</b>	<i>vaskuläre Zelladhäsionsmolekül-1</i>
<b>VE-cadherin</b>	<i>vascular endothelial- cadherin</i>
<b>VEGF</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
<b>VLDL</b>	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>
<b>vWF</b>	von-Willebrand-Faktor
<b>ZO-1</b>	<i>Zonula occludens-1</i>

# Inhaltsverzeichnis

## 1 Einleitung

1.1 Thrombozyten	1
1.2 Endothel	5
1.3 Sphingosin-1-phosphat (S1P)	7
1.3.1 Metabolismus	7
1.3.2 S1P- Rezeptoren	9
1.3.3 S1P Wirkung auf Endothelzellen	11
1.4 Klinischer Ausblick	15
1.5 Ziele der Arbeit	16

## 2 Material und Methoden

2.1 Material	17
2.2 Methodik	20
2.3 Gewinnung von humanem Vollblut	20
2.4 Färbung des Vollbluts	21
2.5 Gewinnung von Humanserum (HS)	21
2.6 Herstellung Sphingosine-1-phosphate (S1P)	21
2.7 Zellkultur	22
2.8 Bioflux 200	24
2.8.1 Prinzip	24
2.8.2 Kultivierung eines <i>konfluenten Endothelzell Monolayers</i> in den Bioflux Kanälen	26
2.8.3 Versuchsprotokoll	27
2.8.4 Dokumentation/ Auswertung	28
2.8.5 Experimentelle Gruppen	29
2.9 Durchflusszytometrie (FACS)	30
2.9.1 Kultivierung primärer humaner Endothelzellen in 12 well- Platten	30
2.9.2 Experimentelle Gruppen	31
2.10 Statistik	32

<b>3 Ergebnisse</b>	
3.1 Etablierung der Kultivierung eines konfluenten <i>Endothelzell-monolayers</i> in den Bioflux Kanälen	33
3.2 Einfluss von Thrombin auf die Thrombozytenadhäsion	36
3.3 Einfluss von S1P auf die Thrombozytenadhäsion	37
3.3.1 Rolle der S1P- Rezeptoren bei der Thrombozytenadhäsion	38
3.3.2 Rolle des P- Selektin Antikörpers bei der Thrombozytenadhäsion	41
3.3.3 Einfluss von S1P auf die P- Selektin Expression	43
3.3.4 Rolle des Phospholipase C (PLC)- Inhibitors auf die P-Selektin Expression	44
<b>4 Diskussion</b>	45
<b>5 Literatur</b>	58

# 1 Einleitung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind in Deutschland mit Abstand die häufigste Todesursache, gefolgt von Krebs und Krankheiten des Atmungssystems. Laut statistischem Bundesamt waren 2018 36,2% aller Sterbefälle auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen zurückzuführen (1). Erkrankungen, wie zum Beispiel der Herzinfarkt, Schlaganfall und die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) sind stark mit der Atherosklerose assoziiert. Bei der Pathogenese der Atherosklerose spielen die Endotheldysfunktion mit Ablagerung von Lipiden an die Gefäßwand und chronische Entzündungsreaktionen eine zentrale Rolle. Durch diese Prozesse entsteht initial ein atherosklerotischer Plaque. Mit Fortschreiten der Erkrankung kommt es zu progredienten Stenosen und thromboembolischen Ereignissen durch Plaqueruptur mit akutem Gefäßverschluss. Hierbei spielt die Atherothrombose mit der Thrombozytenadhäsion und Thrombozytenaggregation eine zentrale Rolle. Die Reduktion kardiovaskulärer Risikofaktoren und vor allem die medikamentöse Therapie mittels Lipidsenker und Thrombozytenaggregationshemmer sind bereits seit langem gut etablierte Therapieoptionen zur Prophylaxe (2). Dennoch kann in den meisten Fällen der Krankheitsprozess nicht vollständig aufgehalten werden. Diese Tatsache macht es notwendig weitere Therapiemöglichkeiten zu finden.

## 1.1 Thrombozyten

Thrombozyten sind nicht nur Hauptakteure in der Hämostase und der Thrombose, sie besitzen darüber hinaus eine Schlüsselrolle in einer Reihe von pathophysiologischen Prozessen wie der Immunabwehr, der Entzündungsreaktion und der Atherosklerose. Sie interagieren mit dem Endothel, rekrutieren Leukozyten an Orte der Gefäßverletzung und sezernieren sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische wie auch Faktoren der Angiogenese.

Eine Hauptaufgabe von Thrombozyten ist es, die Integrität der Gefäßwände zu sichern. Normalerweise haften Thrombozyten nicht an das intakte Endothel. Kommt es jedoch zu einer Gefäßverletzung wird die Hämostase, die in zwei Phasen abläuft, aktiviert. Während der primären Hämostase kommt es nach einer initialen Vasokonstriktion durch die Substanzen Serotonin und Thromboxan A<sub>2</sub>, die zu einer

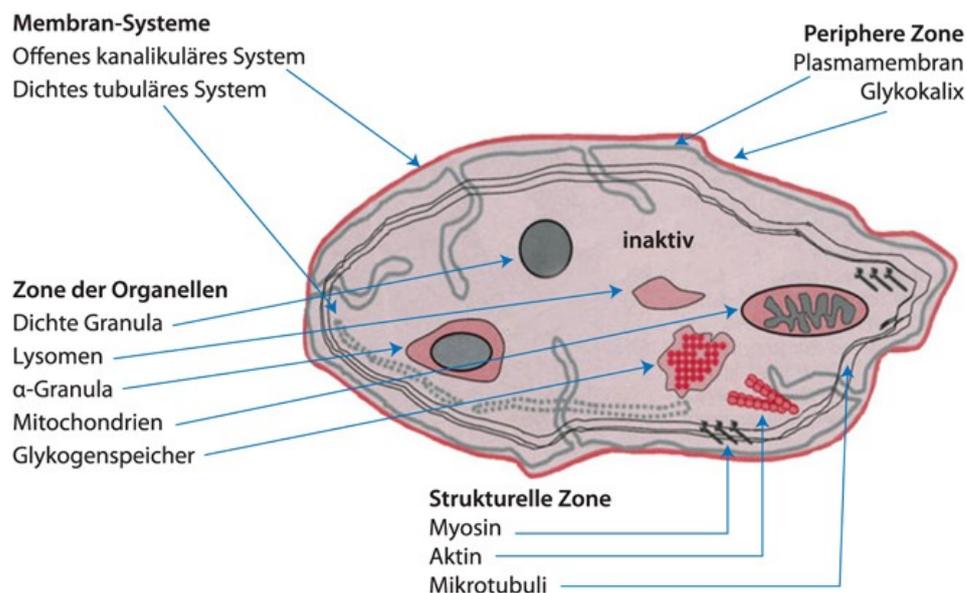
Verlangsamung des Blutstroms führt, zu einem Anheften der Thrombozyten an das verletzte Endothel. Diese Adhäsion bewirkt eine Thrombozytenaktivierung mit anschließender Zusammenlagerung der Thrombozyten, die auch als Thrombozytenaggregation bezeichnet wird. So bildet sich innerhalb kürzester Zeit ein Thrombus, der die Gefäßverletzung jedoch nur instabil verschließt. Die nachfolgende Aktivierung der Gerinnungskaskade, die die sekundäre Hämostase darstellt, bewirkt die Bildung eines Fibrinnetzes, mit Einlagerung von Blutzellen. Dies führt abschließend zu einer stabilen Abdichtung des Endothelschadens. Etwas verzögert wird ebenfalls die Wundheilung mit der Fibrinolyse initiiert. Dadurch wird gewährleistet, dass zwar die Blutung gestillt, aber die Gerinnungsbildung begrenzt wird (3).

## **Morphologie**

Thrombozyten werden im Knochenmark durch Abschnürungen von Megakaryozyten gebildet. Ihre Gesamtzahl beträgt 150.000- 300.000 pro Mikroliter, wobei nur zwei Drittel im Blut zirkulieren und ein Drittel in der Milz gespeichert sind. Die durchschnittliche Lebensdauer des Thrombozyten beträgt 7 Tage, anschließend werden sie im retikuloendothelialen System der Milz und Leber durch Makrophagen abgebaut. Die kernlosen Zellen haben im inaktivierten Zustand eine diskoide Form mit einem Durchmesser von 2- 3 µm. Sobald Sie aktiviert werden kommt es zur Ausbildung von Pseudopodien. Elektronenmikroskopisch lassen sich Thrombozyten in vier strukturelle Bereiche einteilen: die **Periphere Zone**, die **Strukturelle Zone**, die **Membransysteme** und die **Zone der Organellen**.

Die **periphere Zone** wird von der Plasmamembran, bestehend aus einer Phospholipid- Doppelschicht, die nach außen von einer Glykokalyx, einer dünnen Schicht bestehend aus Glykoproteinen und Proteoglykanen, bedeckt wird gebildet. Die Glykoproteine erfüllen die Funktion spezifischer Oberflächenrezeptoren. Diese Adhäsionsrezeptoren werden unterteilt in Integrine, Leucinreiche Glykoproteine, Selektine und Rezeptoren vom Immunglobulintyp. In der **strukturellen Zone** befinden sich submembranös Mikrotubuli und die kontraktile Filamente Aktin und Myosin, die für die Formgebung der Zelle und die Kontraktilität von großer Bedeutung sind. Das **Membransystem** besteht aus dem offenen kanalikulären System und dem dichten tubulären System. Bei dem offenen kanalikulären System

handelt es sich um schlauchartige Einstülpungen der Plasmamembran in den Zelleib. Diese Kanäle stehen über Porenöffnungen mit dem Extrazellulärraum in Verbindung und tragen zur Oberflächenvergrößerung bei. Das dichte tubuläre System, welches sich aus dem rauen endoplasmatischen Retikulum der Megakaryozyten entwickelt, stellt den Hauptspeicherort für Calcium dar und spielt somit eine zentrale Rolle bei der Thrombozytenaktivierung. Zu der **Zone der Organellen**, die sich im Zytoplasma befindet, gehören Mitochondrien, Glykogenpartikel und drei Typen von Speichergranula. Die mengenmäßig am häufigsten vorkommenden  **$\alpha$ -Granula**, enthalten Gerinnungsfaktoren (vWF, Fibrinogen, FV, XI, XII), Plättchenfaktor-4, Adhäsionsmoleküle wie Fibronectin, Vitronectin, Thrombospondin und P-Selektin, Wachstumsfaktoren (VEGF, EGF, PDGF) und Zytokine. **Dichte Granula** bestehen vor allem aus Adenosindiphosphat (ADP), Adenosintriphosphat (ATP), Calcium, Phosphat und Serotonin. Diese Substanzen sind besonders wichtig für die Thrombozytenaggregation und Vasokonstriktion. Ebenso sind Adhäsionsmoleküle wie P-Selektin, Glykoprotein IIb/IIIa (GP IIb/IIIa) und Glykoprotein Ib (GP Ib) zu finden. **Lysosomen** hingegen enthalten hydrolytische Enzyme und Kathepsin D und E (4-6) (Abb. 1).



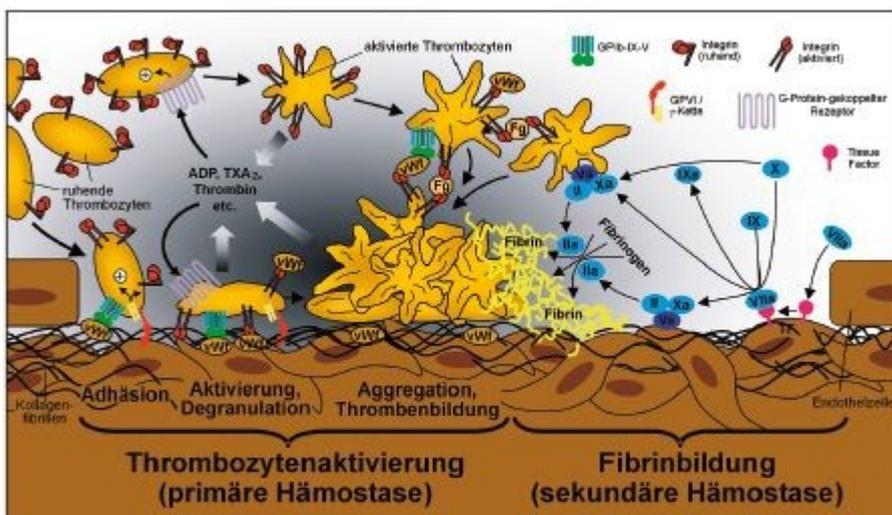
**Abb. 1: Schematische Darstellung der Ultrastruktur ruhender Thrombozyten**

Darstellung aus: Das Blutplättchen, Gawaz (4).

## Primäre Hämostase

Verletzungen der Endothelzellschicht oder pathologischen Veränderungen, wie zum Beispiel die Atherosklerose, führen zu einer Freilegung von Komponenten der subendothelialen extrazellulären Matrix, wie z. B. dem von-Willebrand-Faktor (vWF), Kollagen, Laminin und Fibronectin. An diese exponierte Matrix adhären nun Thrombozyten. Dies stellt den initialen Schritt der primären Hämostase dar. Zuerst binden Thrombozyten über den membranären Adhäsionsrezeptor Glykoprotein Ib/IX/V an den Kollagen gebundenen vWF. Diese instabile Adhäsion, die ein Rollen („*Tethering*“) der Thrombozyten entlang der Gefäßwand ermöglicht, ist besonders in Gefäßen mit hohen Scherkräften von großer Bedeutung (vor allem kleine Arterien und Arteriolen). Die nun entlang der freigelegten subendothelialen Matrix rollenden und daher verlangsamten Thrombozyten sind in der Lage Kollagen über den Glykoprotein VI Rezeptor zu binden und somit eine Thrombozytenaktivierung mit fester Adhäsion der Thrombozyten an die Endothelläsion zu induzieren (7, 8). Die Kollagen-GPVI-Bindung führt zu einer Aktivierung des thrombozytären Integrinrezeptors  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (GP IIb/IIIa), der an Fibrinogen bindet (9, 10) und des Rezeptors  $\alpha_2\beta_1$  (GP IIa/IIa), der an Kollagen bindet (10, 11). Desweiteren bewirkt die Kollagen-GPVI-Bindung die Freisetzung von ADP und Thromboxan A<sub>2</sub> (7). Zusätzlich kommt es zu der Bildung von Thrombin. Diese Mediatoren führen über die Stimulation G-Protein gekoppelter Rezeptoren zur vollständigen Aktivierung der Thrombozyten. Während der Aktivierung kommt es zum sogenannten „*shape change*“ des Thrombozyten mit Ausbildung von Pseudopodien, die durch eine besonders schnelle Reorganisation des Zytoskeletts hervorgerufen werden (12). Darüber hinaus bewirkt die Formänderung der Zellmembran eine Expression von negativ geladenen Phospholipiden, die für die sekundäre Hämostase von besonderer Relevanz sind, an die Zelloberfläche (13, 14). Zusätzlich werden weitere Mediatoren, Inhaltsstoffe der thrombozytären Granula freigesetzt, die wiederum durch positive Rückkopplung zur Aktivierung weiterer Thrombozyten führen. Dieser Prozess wird als Sekretion oder Degranulation bezeichnet. Die durch die Thrombozytenaktivierung hervorgerufene Konformationsänderung des Integrinrezeptors  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (GP IIb/IIIa) versetzt diesen von einem niedrigaffinen in einen hochaffinen Funktionszustand, der es ermöglicht nicht nur immobilisiertes, sondern auch in Plasma gelöstes Fibrinogen zu binden und

somit sowohl eine feste Verbindung mit der subendothelialen Matrix einzugehen, als auch weitere Thrombozyten an die Gefäßwand zu rekrutieren (7, 15). Es entstehen Zell- Zell- Kontakte über Fibrinogenbrücken mit Quervernetzung von Thrombozyten, die zu einer festen Aggregation führen. Die Fibrinogenbrücken kommen dadurch zu Stande, dass ein Fibrinogen- Molekül zwei Bindungsdomänen besitzt und daher zwei Thrombozyten über ihre Fibrinogen- Rezeptoren verbinden kann (7, 16). Durch die Thrombozytenaggregation entsteht ein dichtes zelluläres Netzwerk, welches „Thrombozyten- Pfropf“ bezeichnet wird (Abb. 2).



**Abb. 2: Blutgerinnung.** Darstellung aus: Pharmakologie und Toxikologie (17).

## 1.2 Endothel

Das Endothel kleidet als eine dünne Schicht aus Endothelzellen, die auch als Monolayer bezeichnet wird, das gesamte Gefäßsystem zum Lumen hin aus. Es hat vielfältige Funktionen. Es reguliert durch seine anti- thrombotische Oberfläche, den Blutfluss und hat somit Einfluss auf die Hämostase und Fibrinolyse. Zusätzlich spielt es bei zahlreichen Prozessen, wie der endothelialen Barriere, dem Transportmechanismus und dem Gefäßtonus eine wichtige Rolle. Funktionsstörungen des Endothels üben Einfluss auf viele Krankheitsprozesse, wie zum Beispiel die Atherosklerose, Sepsis und Entzündung (18). Das Endothel dient als Barriere zwischen dem umliegenden Gewebe und den im Blut zirkulierenden Zellen, Makromolekülen und Ionen (19). Für die Permeabilität sind die Zell-

Zellkontakte, die sich in Tight Junctions, Gap Junctions und Adherens Junctions unterteilen, von herausragender Bedeutung (20, 21). Vor allem die Tight Junctions, die den parazellulären Transport regulieren, sind besonders relevant (22). Auch die Glykokalix, die primär aus Proteoglykanen und Glykoproteinen besteht (23, 24), trägt zur vaskulären Barriere bei (25, 26). Sie überzieht die Außenfläche der Endothelzellen und stellt eine Schicht zwischen dem Endothel und dem zirkulierenden Blut dar (24, 27). Proteoglykane sind der Hauptbestandteil des Glykokalix- Grundgerüsts und bestehen aus einem Kernprotein mit daran gebundenen Glykosaminoglykan- Ketten, die für die negative Ladung verantwortlich sind (28, 29). Zu den wichtigsten Glykoproteinen zählen die Zelladhäsionsmoleküle die sich in drei Gruppen, die Selektine, bestehend aus P-Selektin und E-Selektin, die Integrine und die Immunglobuline unterteilen lassen. Die Integrine, wie z.B.  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$  und  $\alpha V\beta 3$  werden auf einer Vielzahl von Zellen, vor allem Endothelzellen, Thrombozyten und Leukozyten exprimiert (28, 30). Sie induzieren Thrombozyten- Endothelzell- Interaktionen über ihre Bindung an Kollagen, Laminin und Fibronectin in der subendothelialen Matrix (31). Zu den Immunglobulinen zählen das Interzelluläre Zelladhäsionsmolekül 1 und 2 (ICAM-1 und -2), das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) und das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül-1 (PECAM-1). Thrombozyten und Leukozyten können über ihre Integrine an diese binden und somit eine Adhäsion an das Endothel bewirken. Neben der Erhaltung der Barriere beeinflusst die Glykokalix somit auch die Zell-Endothelinteraktion. Wie bereits oben erwähnt zirkulieren Thrombozyten unter physiologischen Bedingungen im Blut, ohne an das Endothel zu adhären. Dies ist Folge der negativen Ladung der Glykokalix, die ein Anheften von Blutzellen verhindert (28, 30). Zudem liegen die Adhäsionsmoleküle in der Glykokalix-Schicht verborgen, so dass sie im Normalfall für die Blutzellen nicht zugänglich sind (32). Durch verschiedene pathophysiologische Bedingungen, z.B. durch die Freisetzung von Enzymen, Zytokinen und anderen Entzündungsmediatoren, oder durch die Ischämie/ Reperfusion kommt es zum Verlust der Glykokalix-Struktur, die zu einem Freilegen der Adhäsionsmoleküle mit anschließender Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten führt (28, 30, 33-37). Darüber hinaus wirkt das intakte Endothel durch die Synthese und Sekretion bestimmter Substanzen, wie Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin ( $PGI_2$ ) antithrombotisch und antikoagulatorisch. NO wird durch die NO-Synthase (38)

synthetisiert und inhibiert cGMP abhängig die Adhäsion, Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten (39). Dabei führt Stickstoffmonoxid zu einer Reduktion der freien intrazellulären Calcium-Konzentration, wodurch es zu einer Verringerung der für die Fibrinogenbindung notwendigen Konformationsänderung des Integrinrezeptors  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (GPIIb/ IIIa) kommt. Zusätzlich ist NO in der Lage die P-Selektin Expression herunter zu regulieren (40, 41). PGI<sub>2</sub>, ein Produkt des Arachidonsäure- Metabolismus (42) übt in einem cAMP abhängigen Signalweg ebenfalls Einfluss auf die Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten (43), ohne jedoch die Thrombozytenadhäsion zu beeinflussen (44). Des Weiteren wirkt die Ecto-ADPase, die auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert wird, antithrombotisch, indem es das für die Thrombozytenaktivierung essenzielle ADP in Adenosinmonophosphat (AMP) umwandelt (45). Weitere Gerinnungsregulierende Faktoren sind das Thrombomodulin (46) und der Tissue Factor Pathway Inhibitor (47, 48). Darüber hinaus regulieren NO und PGI<sub>2</sub> als vasoaktive Substanzen den Gefäßtonus. Während Stickstoffmonoxid und Prostazyklin gefäßerweiternd wirken, führen Endothelin-1 und der Plättchenaktivierende Faktor zu einer Vasokonstriktion (49, 50).

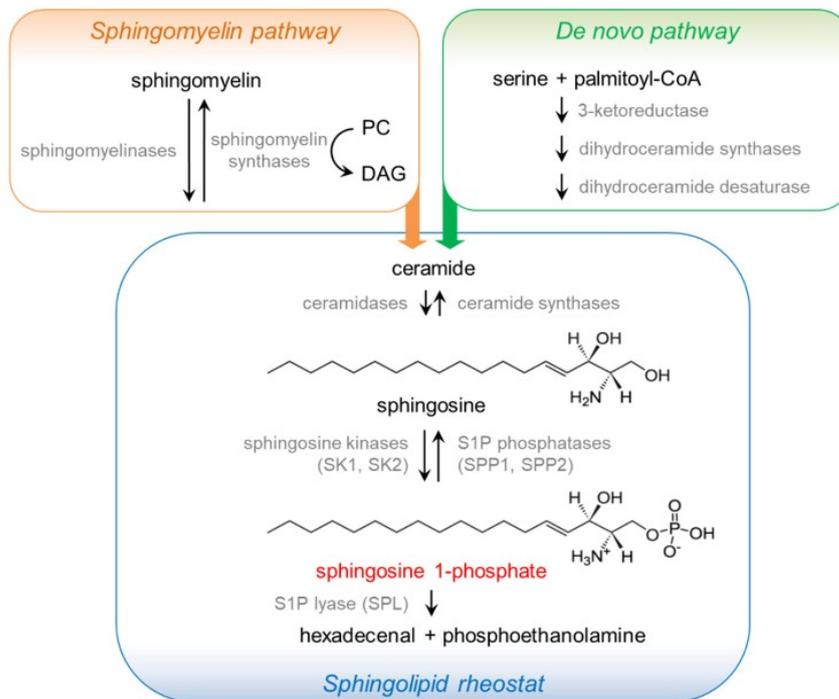
Auf diese Weise erfüllen das Endothel und das Blut mit seinen Zellen und plasmatischen Faktoren die besonders wichtige Aufgabe, im physiologischen Zustand die Thrombozytenaktivierung und Gerinnung zu unterbinden und die Fibrinolyse zu fördern, um die Fließfähigkeit des Blutes zu gewährleisten, bei Gefäßschäden oder inflammatorischen Einflüssen aber die Plättchenaktivierung zu fördern und die Gerinnung zu induzieren und so Blutungen entgegenzuwirken (51, 52).

### **1.3 Sphingosin-1-phosphat (S1P)**

#### **1.3.1 Metabolismus**

Sphingosin-1-phosphat (S1P) ist ein biologisch aktives Lysophospholipid, welches ein in der Natur weit verbreitetes Produkt des Sphingomyelin- Metabolismus ist. Ursprünglich galt S1P als intrazellulärer sekundärer Botenstoff. Mit der Entdeckung der G-Protein-gekoppelten S1P-Rezeptoren konnte seine wichtige Rolle als extrazellulärer Lipidmediator festgestellt werden. S1P- Rezeptoren sind in

Säugetieren weit verbreitet und für eine Vielzahl von Signalwegen verantwortlich (53). Somit wird dem S1P eine wichtige Rolle bei der Regulierung vieler zellulärer Prozesse, wie zum Beispiel der Immunität, der Entzündung und des Herz- Kreislauf- Systems zugeschrieben. S1P wurde erstmals 1883 von dem Wissenschaftler J. L. W. Tudichum entdeckt (54). Es wird intrazellulär durch die zwei Sphingosin Kinasen Sphingosinkinase1 (Sphk1) und Sphingosinkinase2 (Sphk2) aus Sphingosin hergestellt (55). Die Synthese von S1P ist eng verbunden mit der Synthese von Ceramid. Ceramid kann einerseits über die De-Novo-Synthese aus Serin, Palmitoyl-Coenzym A und Fettsäuren gebildet werden, oder durch den Abbau von in Plasmamembranen vorhandenem Sphingomyelin mittels Sphingomyelinasen entstehen (56). Die Ceramidase wandelt das Ceramid in Sphingosin um, welches anschließend mit Hilfe der zwei Sphingosinkinasen Sphk1 und Sphk2 zu Sphingosin-1-Phosphat phosphoryliert wird. Abgebaut wird S1P durch die Enzyme S1P-Phosphatase und S1P-Lyase. Die S1P-Phosphatase dephosphoryliert S1P zu Sphingosin (57), die sich im Endoplasmatischem Retikulum befindliche S1P-Lyase hingegen spaltet S1P irreversibel zu Ethanolaminphosphat und Hexadecenal (58). Für die Dephosphorylierung stehen einerseits die Lipid Phosphat Phosphatasen 1-3 (59), die sich auf der Zelloberfläche befinden und andererseits die im Endoplasmatischen Retikulum vorhandenen S1P-spezifischen Phosphatasen 1 und 2 zur Verfügung (60, 61). Im Plasma beträgt die Konzentration von S1P 200- 1000 nM (62), wobei nur 1-2 % des im Plasma vorhandenen S1P biologisch aktiv ist (63). Im Gewebe ist die Konzentration mit 0,5- 75 pmol/mg deutlich niedriger (64). Hauptquelle des S1P im Plasma sind Erythrozyten. Ungefähr 50% des S1P im Blut befinden sich beim Menschen im Erythrozyten (65). Aber auch Thrombozyten, Mastzellen, Leukozyten und Endothelzellen setzen S1P frei (64, 66). Innerhalb der Zelle kann sich S1P frei zwischen den Membranen bewegen, für den Export von S1P aus der Zelle werden allerdings spezielle Transporter benötigt. Für die meisten Zellen sind die Transportmechanismen noch unklar. Bekannt ist jedoch, dass ABC-Transporter und der Spinster 2- Transporter eine besondere Rolle spielen (67). Im Plasma liegt S1P primär an Proteine gebunden vor. Mit 50- 70% bindet S1P an das High Density Lipoprotein (HDL), 30% binden an Albumin und weniger als 10% an das Low Density Lipoprotein (LDL) und das Very Low Density Lipoprotein (VLDL) (62). Die Halbwertszeit des an Albumin gebundenen S1P beträgt weniger als 15 min (64) (Abb. 3).



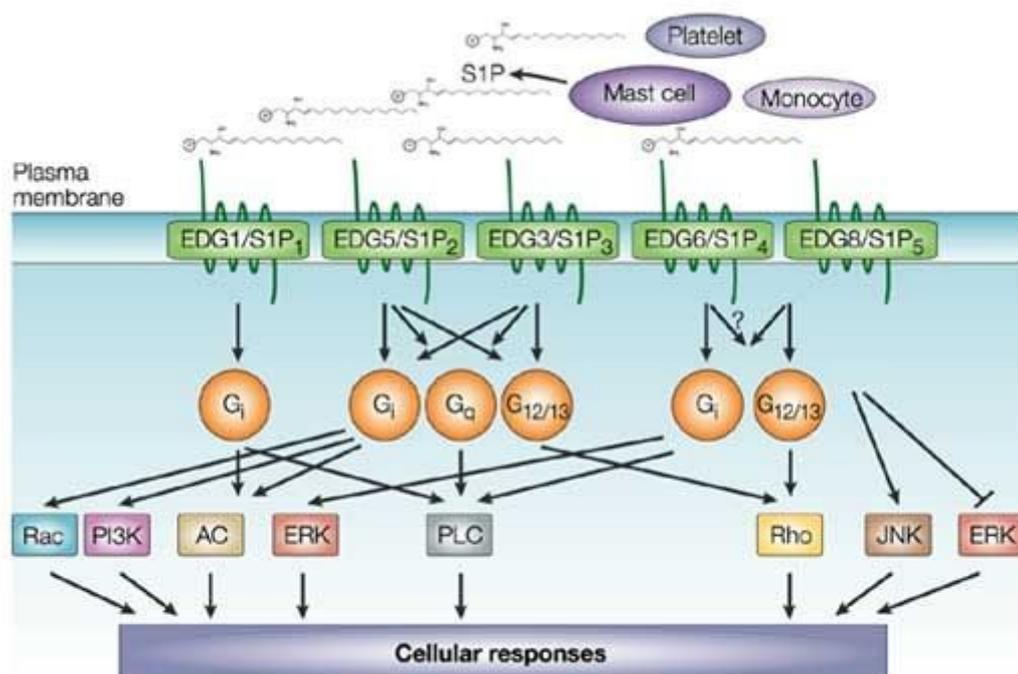
**Abb. 3: Sphingolipid-Metabolismus.** Darstellung aus El Jamal et. al (68).

Die meisten biologischen Funktionen übt S1P extrazellulär über die Kopplung an seine fünf Rezeptoren, die jeweils an verschiedene G-Proteine binden, aus. Abhängig vom Zelltyp auf dessen Oberfläche die Rezeptoren exprimiert werden, vom Rezeptortyp und dem Expressionsniveau des Rezeptors auf der jeweiligen Zelle werden verschiedene Signaltransduktionswege aktiviert

### 1.3.2 S1P- Rezeptoren

Die S1P-Rezeptoren<sub>1-5</sub>, die zu der Familie der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren gehören und ursprünglich den Namen EDG (*Endothelial Differentiation Gene*) trugen (69, 70), wurden 2002 nach der IUPHAR- (*International union of pharmacology*) Nomenklatur in S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub>, S1P<sub>3</sub>, S1P<sub>4</sub> und S1P<sub>5</sub> umbenannt (71). Das Gen für den S1P<sub>1</sub>-Rezeptor (ursprünglich EDG-1) wurde 1990 als erster der fünf S1P Rezeptoren in humanen Endothelzellen nachgewiesen (72). 1998 wurde S1P als Ligand mit hoher Affinität zum EDG-1-Rezeptor festgestellt (57, 73). Die Rezeptoren S1P<sub>1-3</sub> werden ubiquitär exprimiert, wohingegen der S1P<sub>4</sub>-Rezeptor in der Lunge sowie in lymphatischen Geweben wie dem Thymus und der Milz

vorkommt und der S1P<sub>5</sub>-Rezeptor lediglich im Gehirn, in der Haut und der Milz nachweisbar ist. Der S1P<sub>1</sub>-Rezeptor koppelt ausschließlich an das heterotrimere G-Protein G<sub>i</sub>. Die Rezeptoren S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> binden an die G-Proteine G<sub>i</sub>, G<sub>q</sub> und G<sub>12/13</sub>, wohingegen die Rezeptoren S1P<sub>4</sub> und S1P<sub>5</sub> mit den Proteinen G<sub>i</sub> und G<sub>12/13</sub> verknüpft sind. Über die Bindung an den G<sub>i</sub>-gekoppelten Rezeptor wird die Aktivierung des Ras/ERK-Signalweges, der die Proliferation fördert, induziert. Ebenso wird der PI3K/Akt-Signalweg aktiviert, welcher die Apoptose verhindert. Die Aktivierung des PI3K/Rac-Signalweges fördert das zytoskelettale Rearrangement und die Migration, die PhospholipaseC (PLC)-Aktivierung hingegen führt zur intrazellulären Calcium Mobilisierung und Hemmung der Adenylatcyclase. Die Aktivierung des G<sub>q</sub>-gekoppelten Signalweges führt ebenfalls zu einer Aktivierung der PLC, wohingegen es über G<sub>12/13</sub> zur Rho-Aktivierung und Migration kommt (Abb. 4).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Abb. 4.: Signalwege der G-Protein gekoppelten S1P-Rezeptoren (S1P<sub>1-5</sub>). Darstellung aus Spiegel et al. (74).

### **1.3.3 S1P Wirkung auf Endothelzellen**

Das vaskuläre Endothel ist als Wirkungsort S1P-induzierter Effekte von großer Bedeutung. Endothelzellen exprimieren die Rezeptoren S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub>, wobei die Expression von S1P<sub>1</sub> am stärksten und die der Rezeptoren S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> in etwa gleich ist (75). Es lässt sich beobachten, dass Endothelzellen, verschiedener Abstammung (Arterien, Kapillaren, Venen, Lymphgefäße) diese Rezeptoren unterschiedlich stark exprimieren. Ebenso weisen Endothelzellen aus verschiedenen Abschnitten des arteriellen Systems (aortal, zerebral, koronar, mesenterial und renal) Unterschiede im Expressionsmuster auf. Dieses Phänomen scheint von mehreren Faktoren abhängig zu sein, insbesondere dem lokalen Blutfluss, den Zytokinen und dem S1P-Plasmaspiegel. Demnach wird die S1P Wirkung vom spezifischen Besatz der Endothelzellen mit S1P-Rezeptoren bestimmt. Die Aktivierung dieser induziert unter anderem das Zellüberleben, die Proliferation, die Migration und Chemotaxis, die Angiogenese, die Zelladhäsion und kontrolliert über Zytoskelettveränderungen die Gefäßpermeabilität (76, 77).

### **Gefäßtonus**

Die Effekte von S1P auf den Gefäßtonus sind teilweise widersprüchlich und hängen von der Speziesart, dem Gefäßsystem, der unterschiedlichen S1P-Rezeptorexpression und der S1P-Konzentration ab. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass S1P über die Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase die Bildung von Stickstoffmonoxid stimuliert. In Endothelzellen induziert S1P über die Rezeptoren S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3</sub> eine NO-abhängige Vasodilatation, wohingegen die S1P<sub>2</sub>- und S1P<sub>3</sub>-Rezeptoren an den vaskulären glatten Muskelzellen vasokonstriktorisch wirken (78-81). Mit Hilfe von Experimenten am Myographen konnte festgestellt werden, dass S1P an Mesenterial-, Renal-, Zerebral-, Basilararterien und an Arterien der Plazenta vasokonstriktorisch wirkt, hingegen in großen Leitungsarterien, wie z.B. der Aorta eine Vasodilatation, der zuvor vasokonstringierten Gefäße induziert (82). Dass die Effekte vom jeweiligen Rezeptorsubtyp abhängen konnten Salomone et al. und Szczepaniak et al. zeigen, denn in Zerebralarterien führt die Aktivierung des S1P<sub>3</sub>-Rezeptors, aber nicht des S1P<sub>2</sub>-Rezeptors zu einer Vasokonstriktion (83). Wohingegen der S1P<sub>2</sub>-Rezeptor,

aber nicht der S1P<sub>3</sub>-Rezeptor eine Vasokonstriktion in Pulmonalgefäßen bewirkt (84).

### **Endotheliale Barrierefunktion (endotheliale Permeabilität und Adhäsion)**

Störungen in der Gefäßintegrität führen zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität, die zu einer vermehrten Diapedese von Zellen führt. Dieses Phänomen ist besonders relevant bei Entzündungen, Tumormetastasen, der Atherosklerose und Angiogenese. Die wichtigsten Regulatoren für die Barrierefunktion sind die kleinen GTPasen Rac und Rho. In HUVEC (*Human umbilical vein endothelial cells*) führt S1P über den G<sub>i</sub> gekoppelten S1P<sub>1</sub>-Rezeptor zu einer Aktivierung von Rac, die eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und eine Translokation von VE-Cadherin und β-Catenin an die Zelloberfläche der endothelialen Kontaktstellen zusammen mit der Anordnung von Adherens junctions bewirkt (85). Ebenso spielt S1P eine besondere Rolle bei der Bildung von Tight- Junctions. Über den S1P<sub>1</sub>/G<sub>i</sub>/Akt/Rac-Weg kommt es zu einer Aktivierung des Tight-Junctions assoziierten Proteins Zonula occludens-1 (ZO-1) und anschließend zur Umlagerung an die Lamellipodien und die Kontaktstellen aneinandergrenzender Endothelzellen. ZO-1 scheint bei der Barriereeregulation von großer Bedeutung zu sein, da das Ausschalten des Gens mit Hilfe der siRNA zu einer Verringerung der Barrierefunktion führt (86). Garcia et al. konnten zusätzlich zeigen, dass S1P zu einer schnellen und konzentrationsabhängigen Erhöhung des transendothelialen elektrischen Widerstandes in humanen und bovinen Endothelzellen der Pulmonalarterie führt. Zusätzlich war S1P in der Lage die Thrombin-induzierte Erhöhung der Gefäßpermeabilität wieder rückgängig zu machen (87). Mehrere in vivo Experimente konnten ebenfalls den protektiven Effekt von S1P auf die Barrierefunktion bestätigen. In Nagetieren schützt die Gabe von S1P und dessen Agonisten SEW-2871 und FTY720 vor Lipopolysaccharid (LPS)-induzierter Lungenschädigung und Barrierestörung (88, 89). Des Weiteren verhindert das synthetische Rezeptoranalogen FTY720 die VEGF-induzierte Erhöhung der Gefäßpermeabilität in der Maus (90). Hingegen führt die Gabe eines S1P-Antagonisten bei der Maus zu Störungen der Gefäßintegrität in der Lunge und der Haut (91). Die Effekte auf die Barrierefunktion und das *zytoskeletale rearrangement* sind abhängig von der genauen S1P Konzentration. Physiologische S1P-

Konzentrationen (10 nM- 2  $\mu$ M) bewirken eine schnelle Aktivierung der Rac-GTPase und haben durch die erhöhte Gefäßintegrität einen barriereprotektiven Effekt. Höhere S1P-Konzentrationen hingegen führen zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität und vermindern somit die Barrierefunktion (92). Dieser Effekt wird über die S1P<sub>3</sub>-abhängige Aktivierung der Rho-GTPase vermittelt, wodurch es zur Formierung von Stressfasern und der Zerstörung der Adherens Junctions kommt (93).

## Migration

Die Zellmigration spielt in vielen biologischen Prozessen wie der Entzündungsreaktion, der Embryogenese, der Wundheilung, dem Austritt von Lymphozyten und dem Krebsfortschritt eine wichtige Rolle. Für die Migration ist eine dynamische Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts entscheidend. Für dieses Phänomen sind ebenfalls die kleinen GTPasen Rac-1 und Rho unerlässlich, die durch die Rezeptoren S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3</sub> aktiviert werden und somit die Migration induzieren (94, 95). Der S1P<sub>1</sub>-Rezeptor bewirkt über die G<sub>i</sub> gekoppelte Aktivierung von Rac die Ausbildung fokaler Kontakte, ein *membrane ruffling* und eine Formation des kortikalen Aktinnetzwerkes. Hingegen induziert die G<sub>q</sub> gekoppelte Aktivierung von RhoA über den S1P<sub>3</sub>-Rezeptor die Ausbildung von Stressfasern (96). Im Gegensatz zu den Rezeptoren S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3</sub> hat der S1P<sub>2</sub>-Rezeptor eine anti-migratorische Wirkung. Inoki et al. konnten nachweisen, dass in murinen Gefäßendothelzellen (*Mouse vascular endothelial cells*), die die Rezeptorsubtypen S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> exprimieren, S1P konzentrationsabhängig die Migration stimuliert. Die Gabe des selektiven S1P<sub>1</sub>- und S1P<sub>3</sub>- Rezeptorantagonisten VPC-23019 hebt diese Wirkung wieder auf, wohingegen der selektive S1P<sub>2</sub>-Rezeptorantagonist JTE-013 die Migration erhöht. Ferner konnte in S1P<sub>2</sub>-überexprimierenden murinen Gefäßendothelzellen eine Inhibition der Migration beobachtet werden (97).

## Entzündung und Koagulation

Das durch die Entzündungsreaktion aktivierte Endothel induziert die Hochregulierung der Expression von Adhäsionsmolekülen und proinflammatorischen Zytokinen wie TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PAR-1, LPS und Thrombin (98, 99), die durch die Aktivierung der Sphk1 zu einer Erhöhung der S1P-Konzentration im Entzündungsareal führen (98, 100). In Endothelzellen induzieren proinflammatorische Zytokine die Expression und Präsentation von zellulären Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche, wie zum Beispiel dem ICAM-1 und den Selektinen E-Selektin und P-Selektin (101-103). Zusätzlich kommt es zur Freisetzung der prokoagulatorischen Substanz von vWF. Während der S1P<sub>1</sub>-Rezeptor eine antiinflammatorische Wirkung besitzt, indem es die Expression von zellulären Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Endothelzellen und die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen herabsetzt, verstärken S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> die Entzündungsreaktion. Galvani et al. konnten zeigen, dass die Deletion des S1P<sub>1</sub>-Rezeptors zu einer Erhöhung der ICAM-1 und VCAM-1 in Aortenendothelzellen der Maus führt, wohingegen die Überexpression des endothelzellspezifischen S1P<sub>1</sub>-Rezeptors eine Erniedrigung dieser bewirkt (104). Dass der S1P<sub>1</sub>-Rezeptor die Expression proinflammatorischer Zytokine vermindert, konnte in einem Ischämie-/Reperfusion-Modell in der Lunge der Maus ermittelt werden. Die Gabe des nicht-selektiven S1P-Rezeptor-Agonisten FTY720 und von VPC01091, einem selektiven S1P<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonisten und S1P<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten führt zu einer verringerten Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine, wie zum Beispiel IL-6 und TNF $\alpha$  (105). Den Einfluss des S1P<sub>1</sub>-Rezeptors auf die Adhäsion legten Bolick et al. und Whetzel et al. näher dar. Der S1P<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonist SEW2871 inhibiert sowohl die TNF $\alpha$ -induzierte Adhäsion von Monozyten an Aortenendothelzellen, als auch die Monozyten-Endothelinteraktion bei Mäusen mit Typ1-Diabetes (106, 107). Wie bereits erwähnt besitzen der S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub>-Rezeptor gegenüber dem S1P<sub>1</sub>-Rezeptor entgegengesetzte Wirkungen. Die Aktivierung sowohl von S1P<sub>2</sub> als auch von S1P<sub>3</sub> führt zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen wie auch von proinflammatorischen und prokoagulatorischen Substanzen (108). Der Knockout des S1P<sub>2</sub>-Rezeptors in der Maus führt zu einer Erniedrigung der mRNA-Level von Adhäsionsmolekülen, wie E-Selektin, ICAM-1, VCAM-1, des proinflammatorischen Zytokins MCP-1 (*monocyte*

*chemotactic protein-1*) und der prokoagulatorischen Substanz *Tissue Factor* während der LPS induzierten Inflammation in Lunge, Leber und der Niere. Zusätzlich kann durch die Hemmung des Rezeptors mit Hilfe des selektiven S1P<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten JTE-013 die Monozytenadhäsion an das Endothel verhindert werden (109). Des Weiteren führt der S1P<sub>3</sub>-Rezeptor in einem PLC-abhängigen Weg zu einer Exozytose von Weibel-Palade-Körperchen in Endothelzellen und somit zu einer Hochregulierung der P-Selektin Expression auf der Endothelzelloberfläche (108, 110, 111). Nussbaum et al. konnten zusätzlich zeigen, dass der S1P<sub>3</sub>-Rezeptor ein P-Selektin abhängiges *Leukozytenrolling* auf HUVEC-Endothelzellen vermittelt (112).

Bei Thrombozyten induziert das auf der Endothelzelle exprimierte P-Selektin ebenfalls ein Rollen unter erhöhtem Scherstress.

#### **1.4 Klinischer Ausblick**

Wie bereits eingangs erwähnt stellen Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Deutschland mit 36,2% aller Sterbefälle die häufigste Todesursache dar. Die Tatsache, dass trotz gut etablierter Therapieoptionen Krankheiten wie der Herzinfarkt, Schlaganfall und die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) nicht vollständig aufgehalten werden können macht es notwendig weitere Therapiemöglichkeiten zu finden. S1P könnte hierbei ein mögliches Target darstellen, da bereits bekannt ist, dass bei der Atherosklerose neben der Hypercholesterinämie, proinflammatorische und prothrombotische Prozesse eine bedeutende Rolle spielen und S1P sowohl Einfluss auf die Inflammation als auch Koagulation nimmt.

## 1.5 Ziele der Arbeit

S1P ist ein biologisch aktives Sphingolipid, welches Einfluss auf grundlegende pathophysiologische Prozesse wie die Entzündung, die Immunität und das Herz-Kreislauf-System nimmt. S1P vermittelt seine Wirkung über fünf G-Proteingekoppelte Rezeptoren (S1P<sub>1-5</sub>). Der Einfluss von S1P auf die Atherosklerose ist bereits gut untersucht. So hat S1P sowohl pro- als auch antiatherogene Eigenschaften (62, 113). Allerdings ist sein Einfluss auf die thrombotischen Prozesse, die bei der Atherosklerose von Bedeutung sind, nur unzureichend untersucht. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es den Einfluss von S1P auf die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion zu untersuchen. Des Weiteren soll der zugrundeliegende Mechanismus ermittelt werden.

Im ersten Abschnitt der Studie soll dazu ein Flusskammermodell etabliert werden, welches ein realitätsnahes in-vitro Modell zu Visualisierung und Quantifizierung der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion darstellt.

Anschließend sollen folgende Fragen geklärt werden:

1. Welche Art von Interaktion erfolgt zwischen Thrombozyten und dem Endothel in der Flusskammer?
2. Welchen Einfluss hat S1P auf die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion?
3. Gibt es konzentrationsabhängige Unterschiede?
4. Welche S1P-Rezeptoren spielen hierbei eine Rolle?
5. Welchen Einfluss hat das P-Selektin bei der durch S1P vermittelten Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

**Tabelle 1: Stimulanzen und Inhibitoren**

<b>Substanz</b>	<b>Firma</b>
Human Alpha- Thrombin	Sekisui Diagnostics
Sphingosine-1-phosphate, D-erythro (S1P)	Enzo Life Sciences
TY 52156	Biomol
U-73122 hydrate	Sigma Aldrich
U-73343	Sigma Aldrich
W146 (trifluoroacetate salt)	Biomol

**Tabelle 2: Weitere Reagenzien**

<b>Substanz</b>	<b>Firma</b>
Calcein AM (AM= Acetoxymethylester)	Thermo Fisher
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Ethanol, absolute	Merck
Methanol	VWR

**Tabelle 3: Antikörper**

<b>Substanz</b>	<b>Firma</b>
Anti-CD62P (human), clone G1	Biomol
Anti-Human/Mouse CD62P (P-Selectin), PE- (Clone: Psel.KO2.3)	Ebioscience
Mouse IgG1 K Isotype Control, PE - (Clone: P3.6.2.8.1)	Ebioscience

**Tabelle 4: Reagenzien für die Zellkultur**

<b>Substanz</b>	<b>Firma</b>
Accutase solution	Promocell
Bovines Serum Albumin, Fractin V (BSA)	Serva
Collagen I, equine	Probe & Go
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma- Aldrich
Endothelial Cell Growth Medium	Promocell
Fibronectin, bovine plasma	Sigma- Aldrich
Gelatin solution	Sigma- Aldrich
Glucose	Probe & Go
Hepes (1M solution)	Thermo Fisher
Penicillin- Streptomycin (10,000 U/ml) (P/S)	Thermo Fisher
Trypanblau- Lösung (0,4%)	Sigma- Aldrich
Trypsin/ EDTA (0,04%/ 0.03%)	Promocell
Trypsin Neutralizing Solution (TNS)	Promocell

**Tabelle 5: Zelltypen**

<b>Substanz</b>	<b>Firma</b>
<b>HUVEC:</b> Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen ( <i>Human umbilical vein endothelial cells</i> )	Promocell

**Tabelle 6: Medien**

---

**Endothelial Cell Growth Medium (ECGM):**

---

Endothelial Cell Basal Medium (ECBM)	
2%	fetales Kälberserum (FCS)
0,4%	Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS)
90 µg/ml	Heparin
0,1 ng/ml	Epidermal Growth Factor
1 ng/ml	Basic Fibroblast Growth Factor
1 µg/ml	Hydrocortison
+ 100 U/ml	Penicillin- Streptomycin (P/S)

---

**Modifiziertes Endothelial Cell Growth Medium:**

---

ECGM	
+ 25 mM	Hepes
+ 100 U/ml	P/S

---

**Inkubationsmedium:**

---

ECBM	
+ 25 mM	Hepes
+ 100 U/ml	P/S

---

**Wachstumsmedium-1:**

---

ECBM	
+ 20%	HS
+ 0,4%	ECGS
+ 90 µg/ml	Heparin
+ 25 mM	Hepes
+ 100 U/ml	P/S

---

**Wachstumsmedium-2/ Waschlösung:**

---

ECBM	
+ 2%	HS
+ 25 mM	Hepes
+ 100 U/ml	P/S

---

## 2.2 Methodik

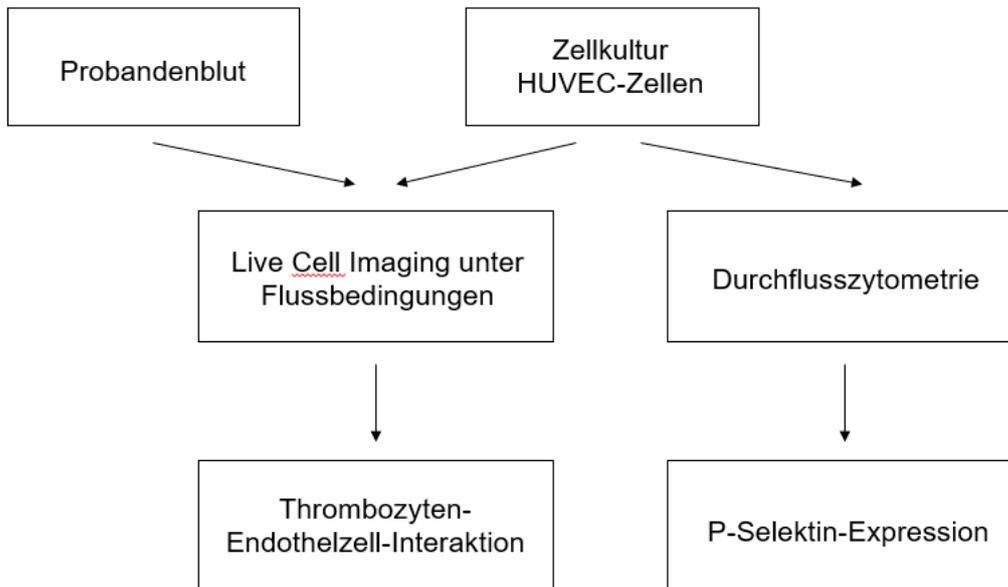


Abb. 5: Übersicht der Methodik

## 2.3 Gewinnung von humanem Vollblut

Zur Gewinnung von humanem Vollblut wurde das BD Vacutainer® Blutabnahmesystem (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Mit Hilfe einer *Butterfly* Kanüle wurde eine kurzzeitig gestaute Cubitalvene punktiert und das Blut in 2,7 ml Citratröhrchen, mit 3,2% Tri-Natrium-Citrat als Antikoagulanzen versetzt, aufgenommen.

Die Blutentnahme war von der Ethikkommission der Heinrich- Heine- Universität genehmigt (Studennummer: 5245). Die Probanden wurden mündlich und schriftlich aufgeklärt und anschließend gebeten, eine schriftliche Einverständniserklärung zu unterschreiben. Als Probanden standen gesunde einwilligungsfähige Personen über 18 Jahre zur Verfügung. Als Ausschlusskriterium wurde eine bekannte Störung oder Erkrankung der Hämostase definiert.

## 2.4 Färbung des Vollbluts

30 Minuten vor Verwendung des Vollbluts in der Flusskammer wurde das Blut mit Calcein-AM angefärbt. Dazu wurde das Blut in einem Verhältnis von 1:1000 mit einer 4 mM Calcein-AM-Lösung, in DMSO gelöst, versetzt. Anschließend wurde das angefärbte Blut 30 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Bei Calcein-AM handelt es sich um eine Substanz, die durch die Zellmembran in die vitale Zelle transportiert wird. In der Zelle wird Calcein-AM anschließend durch Esterasen in Calcein gespalten. Calcein wiederum komplexiert Calciumionen und führt somit zu einer grünen Fluoreszenz. Diese Färbemethode bietet die Möglichkeit, Thrombozyten aus Vollblut unter dem Mikroskop als grün fluoreszierende Signale dargestellt.

## 2.5 Gewinnung von Humanserum (HS)

Die Blutentnahme wurde analog zur Gewinnung von humanem Vollblut durchgeführt. Für diese Methode wurden Serumröhrchen mit Trenngel verwendet. Zur vollständigen Gerinnung wurden die Röhrchen für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das geronnene Blut für 10 Minuten bei 2000 g zentrifugiert (Hettich, Tuttlingen, Deutschland), das Serum in 15 ml Röhrchen (Greiner Bio- One, Kremsmünster, Österreich) überführt und bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

## 2.6 Herstellung Sphingosine-1-phosphate (S1P)

Für die Herstellung einer S1P-Lösung wurde 1 mg Sphingosine-1-phosphate, D-erythro in 2 ml Methanol aufgenommen. Zur Steigerung Löslichkeit wurde das Gemisch im Wasserbad (VWR, Darmstadt, Deutschland) auf 65°C erwärmt und zwischenzeitlich in ein Ultraschallbad (Bandelin, Berlin, Deutschland) gestellt. Nach vollständig erreichter Lösung des S1P wurden *Aliquots* in Reagiergefäße (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) gefüllt. Anschließend wurde das Methanol mit Hilfe von Stickstoffgas abgedampft, sodass ein Film des S1P am Rand des Reagiergefäßes zurückblieb. Die *Aliquots* wurden bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Um eine 125 µM S1P-Lösung herzustellen, wurde das S1P in PBS mit 4 mg/ml *Bovines*

Serum Albumin (BSA) gelöst. Zur besseren Löslichkeit wurde das Gemisch bei 37°C inkubiert und ebenfalls zwischenzeitlich in das Ultraschallbad gestellt.

## **2.7 Zellkultur**

### **Kultivierung primärer humaner Endothelzellen**

Für die Versuche wurden Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVECs) verwendet. Die Zellen wurden von der Firma Promocell bezogen. Hierbei handelt es sich um kryokonservierte gepoolte Zellen von bis zu vier kaukasischen Spenderinnen. Bis zur Verwendung wurden die Zellen in Flüssigstickstoff bei -196°C aufbewahrt.

Für die Aussaat wurden 75cm<sup>2</sup> Kulturflaschen (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) mit 20 ml Endothelial Cell Growth Medium (ECGM) (Tabelle 6) versetzt und für 30 Minuten bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank (Heraeus, Meerbusch, Deutschland) äquilibriert. Dadurch wurde ein optimaler pH und eine optimale Temperatur gewährleistet. Ein *Cryovial* mit mehr als 500.000 Zellen wurde im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, bis sich 90% des Inhalts verflüssigte. Die resuspendierten Zellen wurden in die Zellkulturflasche überführt und im Brutschrank inkubiert. Nach 16-20 h erfolgte ein Mediumwechsel. Dafür wurde das Medium aus der Flasche mittels Pasteurpipette (Brand, Wertheim, Deutschland) abgesaugt und durch neues Medium ersetzt. Weitere Medienwechsel wurden alle 2-3 Tage durchgeführt.

### **Passagieren**

Das *Passagieren* der Zellen erfolgte, nachdem eine 90%ige Subkonfluenz erreicht wurde. Unter *Passagieren* versteht man das Herauslösen der Zellen aus dem *Monolayer* durch enzymatische Verdauung. Die abgelösten Zellen werden in Suspension gebracht, verdünnt und in ein neues Kulturgefäß überführt. Für die Passage wurden alle Lösungen bei 37°C verwendet. Als erstes wurde das verbrauchte Kulturmedium abgesaugt und die Zellkulturflasche mit 10 ml PBS gespült. Anschließend wurde 3 ml Trypsin/ EDTA (0,04%/ 0,03%) auf die Zellen

gegeben. Nach 2-3 Minuten lösten sich die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche. Gegebenenfalls wurde mit dem Handballen seitlich an die Flasche geklopft, um noch anhaftende Zellen zu lösen. Um das Trypsin zu inaktivieren wurde 3 ml Trypsin Neutralizing Solution (TNS: 0,05% Trypsin Inhibitor in 0,1% BSA) hinzugefügt. Die homogenisierte Zellsuspension wurde in ein 50 ml Röhrchen (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) überführt und für 5 Minuten bei 400 g mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in ECGM resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:4 beziehungsweise 10.000 Zellen/ cm<sup>2</sup> auf neue Zellkulturflaschen überführt.

### **Bestimmung der Zellzahl und Vitalität**

Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zellkammer. Um die Vitalität der Zellen zu erfassen, wurden die Zellen mit einer 0,4% Trypanblau-Lösung angefärbt. Trypanblau ist ein Farbstoff, der durch die poröse Membran toter Zellen in das Zytoplasma eintritt und diese blau anfärbt, von lebenden Zellen hingegen nicht aufgenommen wird. Für die Berechnung wurden 4 große Eckquadrate ausgezählt und der Mittelwert pro Eckquadrat ermittelt. Mitthilfe folgender Formel wurde die Zellzahl/ ml berechnet.

Zellzahl/ml= Mittelwert der Eckquadrate \* Verdünnungsfaktor\* 10<sup>4</sup>.

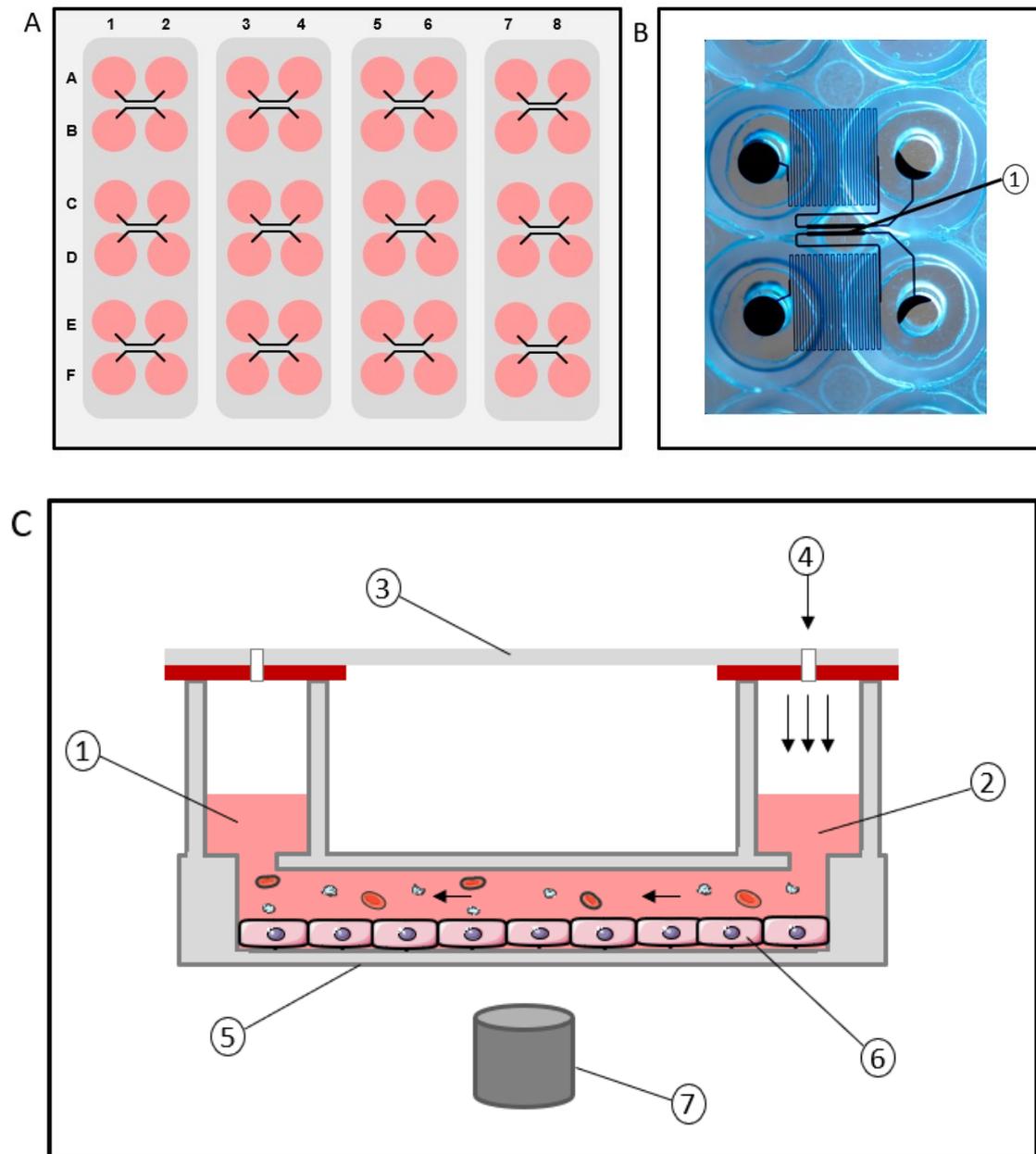
Der Faktor 10<sup>4</sup> errechnet sich dadurch, dass die Fläche eines Eckquadrats 1 mm<sup>2</sup> und die Kammerhöhe 0,1 mm beträgt. Pro Eckquadrat ergibt sich somit ein Volumen von 0,1 µl.

## 2.8 Bioflux 200

### 2.8.1 Prinzip

Da Endothelzellen in Blutgefäßen *in vivo* mechanischen Scherkräften ausgesetzt sind, ist es besonders wichtig auch *in vitro* Versuche unter Flussbedingungen durchzuführen. Das Bioflux 200 (I&L Biosystems, Königswinter, Deutschland) bietet die Möglichkeit unter kontrollierten Bedingungen flussbasierte Assays durchzuführen. Das System ermöglicht standardisierte Flussbedingungen bei besonders geringem Volumen mit bis zu 24 gleichzeitig durchführbaren Assays. Das Bioflux 200-System besteht aus folgenden Komponenten. Einem Controller (*Controller*), einem Druckverteiler (*Interface*), einer Heizplatte (*Heater*), den Bioflux-Platten und der zugehörigen Bioflux Software (Abb. 6). Der *Controller* erzeugt mit Hilfe eines Kompressors einen Druck, der über Verbindungsschläuche auf den Druckverteiler (*Interface*) übertragen wird. Der Druckverteiler wird über vier Schrauben an der Platte befestigt, wodurch kontrolliert Druck auf die Platten übertragen werden kann. Für das Bioflux 200 stehen 3 verschiedene Plattenvarianten zur Verfügung: *24-Well* Platten (0-20 dyne/cm<sup>2</sup>), *48-Well low shear* Platten (0-20 dyne/cm<sup>2</sup>) und *48-Well high shear* Platten (0-200 dyne/cm<sup>2</sup>). Für die Endothelzell-Versuche wurden *48- Well low shear* Platten verwendet. Die Bioflux Platte besteht aus einer Mikrotiterplatte mit integrierter Mikrofluidik. In eine Standard *SBS-48 Well* Platte sind 24 paarig angeordnete Kanäle integriert, wobei je zwei Wells (*input-well/ output-well*) über einen Kanal miteinander verbunden sind. Den Boden der Platte bildet eine Glasplatte mit einer Stärke von 180 µm, der auch den Boden der Kanäle darstellt. Reagenzien und Zellen werden in die Vertiefungen der *Wells* pipettiert und können über den angelegten Druck in die Kanäle gedrückt werden. Die Flüssigkeit sammelt sich dann im entgegengesetzten Well des verbindenden Kanals. Das System wird über die Bioflux-Software gesteuert, mit welcher unter anderem der „*wall shear stress*“, der Flussmodus (*constant/ pulsatile*), die Flusszeit, die Flussrichtung und die Temperatur eingestellt werden kann. Der „*wall shear stress*“ bezeichnet die Wandscherkraft, die die Kraft pro Fläche, die durch das fließende, visköse Blut auf die Gefäßoberfläche wirkt, darstellt (114). Über 24 Beobachtungsfenster, die je zwei Kanäle abbilden, kann mit Hilfe des Mikroskops (Nicon Eclipse TE 2000-4, Nikon, Düsseldorf, Germany) das Livebild

beobachtet und dieses durch die an das Mikroskop angeschlossene Kamera (Nicon DS- Qi2) dokumentiert werden.



**Abb. 6: Übersicht der Kanäle des Bioflux 200- Systems**

A: Blick auf die Platte mit den 24 paarig angeordneten Kanälen

B: Darstellung aus il-biosystems (115). Vergrößerte Darstellung 2 paarig angeordneter Kanäle.

[1] Gesichtsfeld

C: Querschnitt eines einzelnen Kanals

[1] *Input-well*, [2] *Output-well*, [3] Druckverteiler (*Interface*), [4] über den Controller (*Controller*) aufgebauter Druck, [5] Boden aus einer Glasplatte, [6] Endothelzell-*Monolayer*, [7] Mikroskop

## 2.8.2 Kultivierung eines *konfluenten Endothelzell Monolayers* in den Bioflux Kanälen

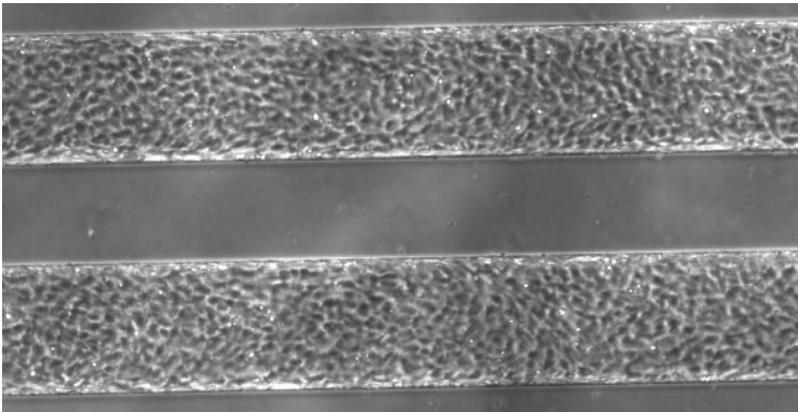
Zur Etablierung des Bioflux-Systems wurden die optimalen Bedingungen für das Kultivieren der Zellen in den Kanälen ermittelt. Um einen geeigneten Adhäsionsfaktor zu ermitteln, wurden folgende drei Reagenzien untersucht.

- Fibronectin: 100 µg/ml
- Kollagen: 100 µg/ml
- Gelatine: 0,1%

Beurteilt wurden das Wachstumsverhalten und die Verteilung der Zellen im Kanal nach 5h, 24h, 48h und 72h. Zusätzlich wurde nach 24h, 48h und 72h untersucht, ob nach Anlegen eines Flusses von 2 dyne/cm<sup>2</sup>, 5 dyne/cm<sup>2</sup> und 10 dyne/cm<sup>2</sup> für jeweils zehn Minuten die Endothelzellen noch adhärent waren. Hierfür wurde berechnet, wieviel Prozent der Kanäle vor und nach angelegtem Fluss mit Endothelzellen bewachsen waren.

Für die Kultivierung der Endothelzellen wurde nach Etablierung der optimalen Wachstumsbedingungen der Boden der Kanäle mit Fibronectin beschichtet. 50 µl einer Fibronectin-Lösung, mit einer Konzentration von 100 µg/ml in PBS, wurden in das *output-well* pipettiert und mit 2 dyne/cm<sup>2</sup> durch die Kanäle geleitet, bis sich ein kleiner Tropfen im *input-well* bildete. Anschließend wurde die Platte für 1 bis 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Beschichtung wurde die restliche Beschichtungslösung abgesaugt und die Wells mit PBS gewaschen. Hierfür wurde 500 µL PBS in das *input-*, und *output-well* pipettiert und sofort wieder entnommen. Im nächsten Schritt wurden die Kanäle gespült. Für diesen Vorgang wurde 500 µl Waschlösung (Tabelle 6) in das *output-well* pipettiert, für 15 Minuten bei 5 dyne/cm<sup>2</sup> und für weitere 30 Minuten bei 2 dyne/cm<sup>2</sup> durch die Kanäle geleitet. Nach dem Waschschrift wurde die restliche Flüssigkeit aus den Wells abgesaugt. Als nächstes wurden die Zellen angeimpft. Hierfür wurden die Zellen wie zuvor beschrieben passagiert und in einer Konzentration von 3-10x 10<sup>6</sup> Zellen/ml in modifiziertem Wachstumsmedium oder Wachstumsmedium-1 (Tabelle 6) resuspendiert. 40 µl dieser Zellsuspension wurden in das *output-well* pipettiert. Um durch eine

Kapillarsogwirkung einen vorzeitigen und ungleichmäßigen Fluss in die Kanäle zu verhindern wurde die gleiche Menge an Volumen zuvor in das *input-well* pipettiert. Als Lösung wurde das gleiche Medium verwendet, in dem die Zellen resuspendiert wurden. Im nächsten Schritt wurden die Zellen unter Mikroskopkontrolle bei 2 dyne/cm<sup>2</sup> in die Kanäle gezogen, bis der Kanal gleichmäßig gefüllt war. Anschließend wurde der Druck sofort ausgeschaltet und die Platte für 4- 5 Stunden im Brutschrank inkubiert, damit sich die Zellen auf dem Boden des Kanals anheften konnten. Nach der Inkubation wurde ein „*gravity flow*“ erzeugt, indem 900µl modifiziertes Wachstumsmedium oder Wachstumsmedium-1 in das *input-well* pipettiert wurde und das *output-well* komplett geleert wurde. Zum Entleeren des *output-wells* wurden die restlichen Zellen, die sich auf dem Boden des *Wells* befanden, mechanisch gelöst und anschließend mit der restlichen Flüssigkeit abgesaugt. Beim „*gravity flow*“ wird das Medium durch Kapillarkräfte vom *input-well* durch die Kanäle in das *output-well* geleitet. Anschließend wurden die Zellen bis zum Versuch bei 37°C im Brutschrank inkubiert (Abb. 7).



**Abb. 7: Konfluent Monolayer von Endothelzellen, 4x Vergrößerung.**

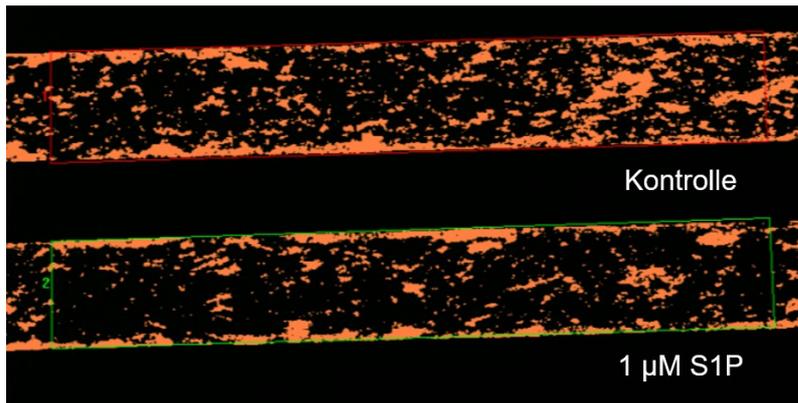
### **2.8.3 Versuchsprotokoll**

Vor der Durchführung des Versuchs wurden die Kanäle mikroskopisch auf ihre Konfluenz und ihr gleichmäßiges Wachstum kontrolliert. Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten wurden für den Kontrollansatz und Versuchsansatz jeweils die beiden Kanäle verwendet, die im gleichen Beobachtungsfenster verlaufen. Für den Versuch wurden die Zellen als erstes im serumfreien Inkubationsmedium (Tabelle 6) gehungert und anschließend stimuliert. Hierzu wurde die jeweilige Substanz

(Thrombin, S1P) im Inkubationsmedium gelöst, in das *input-well* pipettiert, für 5 Minuten bei 2 dyne/cm<sup>2</sup> in die Kanäle geleitet und für weitere 5 Minuten im Brutschrank bei 37°C nachinkubiert. Um die stimulierende Substanz wieder zu entfernen wurden die *Wells* gespült. Dafür wurde das Medium abgesaugt, 300 µl Inkubationsmedium in das *input-*, und *output-well* pipettiert und sofort wieder entnommen. Im Anschluss wurde erneut 300 µl Inkubationsmedium in das *output-well* pipettiert und für 3 Minuten bei 2 dyne/cm<sup>2</sup> in Richtung *input-well* gewaschen. Je nach Versuchsansatz wurden dem Inkubationsmedium Inhibitoren oder Antikörper zugestetzt. Für die Messung der Thrombozytenadhäsion wurde Citrat-Vollblut nach oben beschriebenem Protokoll mit Calcein-AM gefärbt und 350 µl des gefärbten Bluts in das *output-well* pipettiert und anschließend für 10 Minuten bei 10 dyne/cm<sup>2</sup> bei *pulsatilem flow* mit 2Hz über die Endothelzellen geleitet. Nach der Perfusion mit Vollblut wurden die nicht adhärenen Blutzellen aus dem Kanal entfernt, indem das *input-* und *output-well* 3-mal mit PBS gewaschen wurde. Zusätzlich wurde im letzten Waschschrift PBS aus dem *output-well* in Richtung *input-well* geleitet, bis die Kanäle frei von nicht *adhärenen* Blutzellen waren.

#### **2.8.4 Dokumentation/ Auswertung**

Für die Dokumentation der Versuche wurden die Kanäle nach dem Waschschrift mit der Kamera als Durchlichtbild und Fluoreszenzbild bei vierfacher Vergrößerung aufgenommen. Hierbei war es wichtig, dass Kontrollkanal und Versuchskanal, die in einem Beobachtungsfenster verlaufen, auf einem Bild abgebildet wurden. Die Fluoreszenzbilder wurden mit Hilfe der Bioflux Montage Software ausgewertet. Als Maßzahl für die Adhäsion der Thrombozyten auf den Endothelzellen, wurde die „*area coverage*“ in Prozent verwendet. Zu diesem Zweck wurde zunächst der gesamte Kanal markiert, und anschließend ermittelt, wieviel Prozent der Fläche des Kanals, und somit des *Endothelzellmonolayers*, mit fluoreszierenden Thrombozyten bedeckt war (Abb. 8).



**Abb. 8:** Beispielhafte Darstellung einer Auswertung, 4x Vergrößerung.

### 2.8.5 Experimentelle Gruppen

#### **Einfluss von Thrombin auf die Thrombozytenadhäsion**

Für die Versuche mit Thrombin wurden die Zellen für 48 Stunden in modifiziertem Endothelial Cell Growth Medium im Brutschrank kultiviert. Vor dem Versuch wurden die Zellen für eine Stunde gehungert und anschließend mit Thrombin unterschiedlicher Konzentration (0,2 U/ml, 1 U/ml, 2 U/ml) stimuliert. Als Kontrolle wurde das Inkubationsmedium verwendet.

#### **Einfluss von S1P auf die Thrombozytenadhäsion**

Um den Effekt von S1P zu untersuchen, wurden die Zellen für 72 Stunden kultiviert. Nach 50 stündigem Wachstum in Wachstumsmedium-1, wurden das Medium auf Wachstumsmedium-2 (Tabelle 6) gewechselt. Vor Versuchsbeginn wurden die Zellen für zwei Stunden gehungert und anschließend mit 3 unterschiedlichen S1P Konzentrationen (0,1 µM, 1 µM, 10 µM) stimuliert. Als Kontrolle diente das Inkubationsmedium mit PBS plus 4 mg/ml BSA, in der Konzentration wie es zum Lösen von S1P verwendet wurde.

#### **Rolle der S1P- Rezeptoren bei der Thrombozytenadhäsion**

Um einen möglichen Rezeptor zu ermitteln, über den der S1P- Effekt vermittelt wird, wurde der S1P<sub>1</sub>-Rezeptorantagonist W146 und der S1P<sub>3</sub>-Rezeptorantagonist TY52156 eingesetzt. Die Endothelzellen wurden zuerst für 30 Minuten mit dem S1P-Rezeptorantagonisten inkubiert und anschließend mit S1P stimuliert. Beide S1P-Rezeptorantagonisten wurden in einer Konzentration von 10 µM verwendet. Als

Kontrolle diene eine äquivalente Menge des Lösungsmittels Ethanol in Inkubationsmedium.

### **Rolle des P- Selektin Antikörpers bei der Thrombozytenadhäsion**

Um die Rolle des P-Selektins zu untersuchen, wurde der P-Selektin-Antikörper Anti-CD62P verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Antikörper, der das aktivierte Endothel blockieren kann. Hierfür wurden die Zellen gleichzeitig mit S1P und dem Antikörper in einer Konzentration von 10 µg/ml stimuliert. Der Antikörper wurde auch während des nachfolgenden Waschschrilles in der Lösung belassen. Als Kontrolle wurde das Inkubationsmedium verwendet.

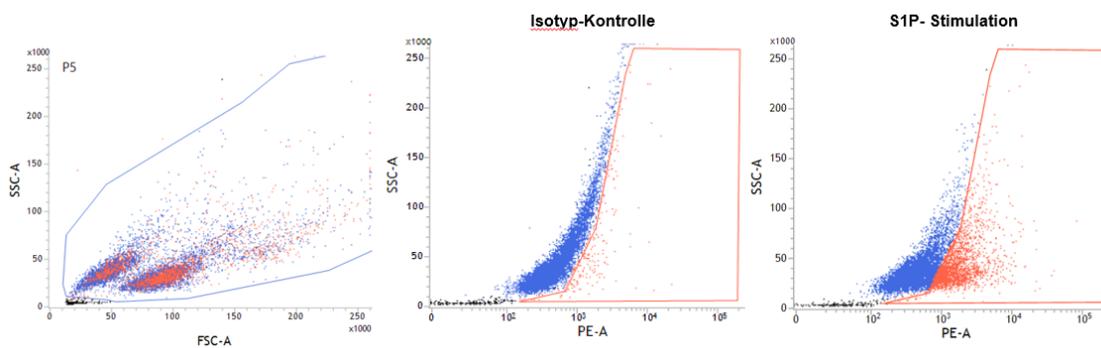
## **2.9 Durchflusszytometrie (FACS)**

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren, bei dem Zellen einzeln durch eine dünne Messkammer fließen. Durch verschiedene Laserstrahlen angeregt, wird ein charakteristisches Streulicht erzeugt, das Aufschluss über Form, Größe und Struktur der Zellen gibt. Mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern bietet das FACS ebenfalls die Möglichkeit Oberflächenantigene auf den Zellen zu ermitteln. Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um eine in unserem Labor bereits etablierte Methode. Die Versuche wurden am BD FACSVerser (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode wurde die P- Selektin Expression auf der Endothelzelloberfläche ermittelt.

### **2.9.1 Kultivierung primärer humaner Endothelzellen in 12 well- Platten**

Für die Durchflusszytometrierversuche wurden die Endothelzellen in einem Verhältnis von 1:4,5 in Fibronektin- beschichteten (Konzentration: 15 µg/ml in PBS) 12-well Gewebekulturplatten (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) angezüchtet. Die Kultivierung erfolgte unter denselben Bedingungen wie in den Bioflux-Platten. Nach 72 stündigem Anwachsen wurden die Zellen für 2 Stunden gehungert und anschließend mit S1P mit und ohne Zusätze stimuliert. Nach der Stimulation wurden die Zellen mit 1,4 µl pro 100 µl Endothelial Cell Basal Medium eines Phycoerythrin gekoppeltem P-Selektin-Antikörpers (Anti-Human/Mouse

CD62P, PE) für 10 Minuten bei 37°C gefärbt. Zur Abgrenzung unspezifischer Antigen- Antikörper Bindungen wurde eine Isotyp-Kontrolle (Mouse IgG1 K Isotype Control, PE) mitbestimmt. Im nächsten Schritt wurden die Endothelzellen zweimal mit PBS gewaschen und mit Hilfe von 400µl Accutase nach 5-10 Minuten bei 37°C gelöst. Die gelösten Zellen wurden in 1,5ml Reagiergefäße überführt und zweimal für 10 Minuten bei 4°C und 400g zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 250µl PBS+ 1% BSA resuspendiert und mit Hilfe des BD FACSVerse gemessen. Die Daten aus 10.000 Ereignissen wurden analysiert. Dargestellt wurden CD62P-positiv angefärbte Endothelzellen als Prozent der Gesamtendothelzellen. Das entsprechende Gating Schema für CD62P ist in Abb. 9 gezeigt.



**Abb. 9: Gating- Schema der HUVEC-Endothelzellen**

## 2.9.2 Experimentelle Gruppen

### Einfluss von S1P auf die P-Selektin Expression

Um zu ermitteln, ob S1P die P- Selektin- Expression beeinflusst, wurden die Zellen für 7 Minuten mit 1 µM und 10 µM S1P stimuliert. Als Kontrolle diente eine äquivalente Menge des Lösungsmittels PBS mit 4 mg/ml BSA in Inkubationsmedium.

### Rolle des Phospholipase C (PLC)-Inhibitors auf die P-Selektin Expression

Um zu untersuchen, ob der PLC- Signalweg einen Einfluss auf die P-Selektin- Expression hat, wurden die Endothelzellen 15 Minuten vor und während der Stimulation mit 10 µM S1P mit dem PLC- Inhibitor U-73122 in einer Konzentration von 3 µM behandelt. U-73343 wurde als Negativkontrolle in gleicher Konzentration

verwendet. U-73343 ist ein inaktives Struktur analogon, welches PLC nicht inhibiert. Als Kontrolle wurde das Lösungsmittel DMSO in Inkubationsmedium verwendet.

## **2.10 Statistik**

Für die statistische Auswertung und die graphische Darstellung der Daten wurde das Programm GraphPad Prism 5 verwendet. Abgebildet sind die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen (SD: standard deviation). Zur Bestimmung der Signifikanz wurden die Mittelwerte unter Annahme einer Normalverteilung der Daten mit Hilfe des t-Test für abhängige Stichproben überprüft. Eine statistische Signifikanz wird angenommen bei einem p- Werte  $<0,05$ . Ein p-Wert  $<0,01$  wird als sehr signifikant und ein p- Wert  $<0,001$  als höchst signifikant definiert.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Etablierung der Kultivierung eines konfluenten *Endothelzellmonolayers* in den Bioflux Kanälen

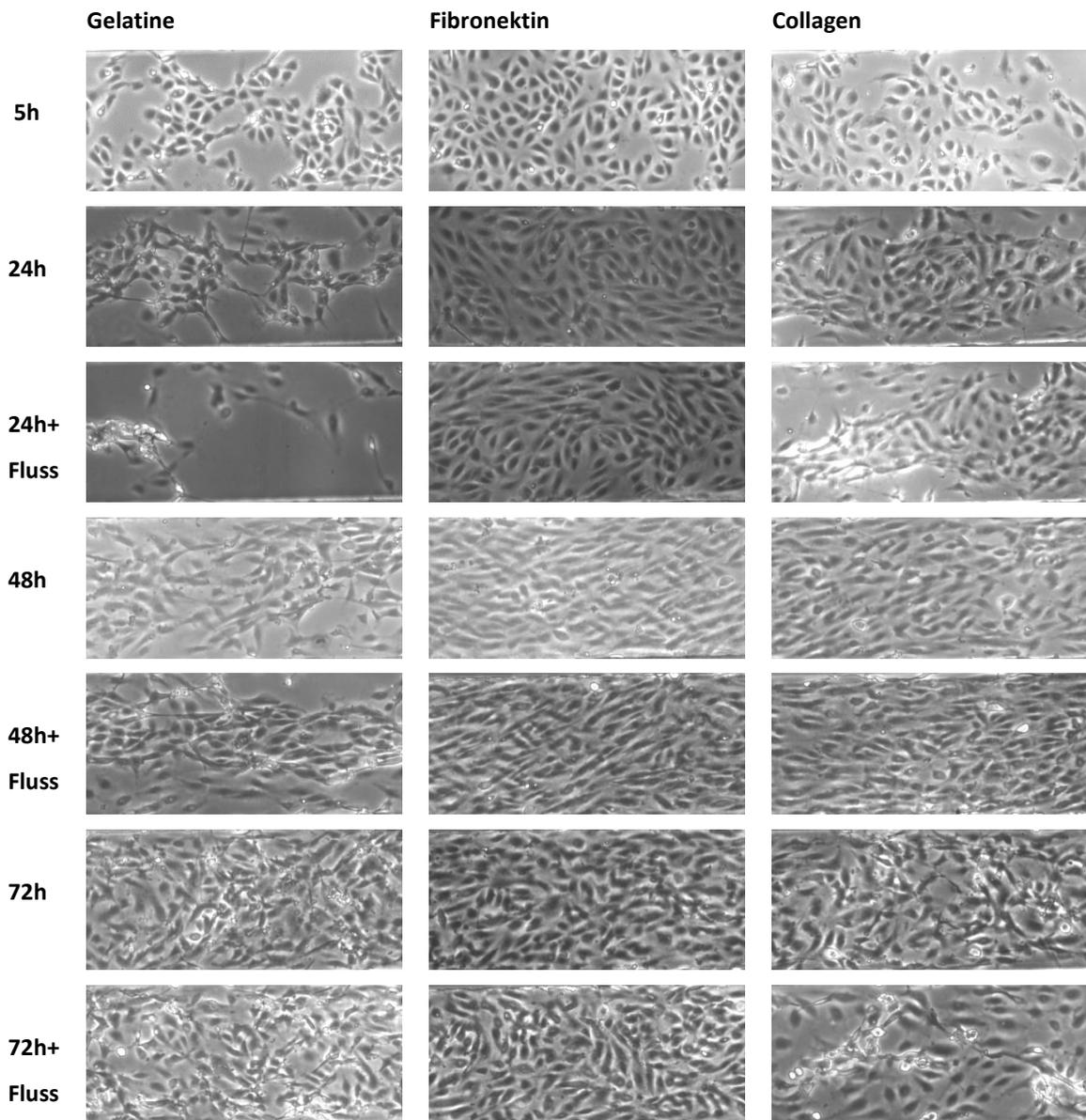
Um die Adhäsion von Thrombozyten entlang des Endothels aussagekräftig beurteilen zu können, war es besonders wichtig, einen konfluenten *Monolayer* an Endothelzellen anzuzüchten. Folgende Kriterien waren hierbei von besonderer Bedeutung. Die Zellen sollten gleichmäßig wachsen und adhärent sein. Besonders wichtig war zudem, dass die Zellen auch nach angelegtem Fluss von  $10 \text{ dyne/cm}^2$  ihre Adhärenz nicht verlieren. Da HUVEC-Endothelzellen nicht gut auf Glas anwachsen, wurden die Kanäle zuvor beschichtet. Hierfür wurden folgende drei Reagenzien miteinander verglichen.

- Fibronectin:  $100 \mu\text{g/ml}$
- Collagen:  $100 \mu\text{g/ml}$
- Gelatine: 0,1%

Ließ man die Endothelzellen, nach Lösen von der Zellkulturflasche, in die Kanäle einlaufen, konnte man beobachten, dass sich die Zellen bei allen drei Beschichtungen gleichmäßig in den Kanälen verteilten. Nach 5h Inkubation im Brutschrank waren die Endothelzellen adhärent. Die durch das Ablösen von der Kulturflasche zuvor abgekugelten Zellen zeigten ein *Spreiten* auf dem Boden der Kanäle. Bei der Gelatine-Beschichtung konnte man jedoch erkennen, dass einige Zellen noch abgekugelt und demnach nicht gut angeheftet waren, während bei der Fibronectin- und der Collagen-Beschichtung alle Zellen gut adhärten. Zusätzlich hatten sich die Zellen bei der Gelatine-Beschichtung teilweise in die Mitte des Kanals gezogen, wohingegen sich die Zellen bei der Fibronectin- und der Collagen-Beschichtung gleichmäßig im Kanal verteilten (Abb. 10). Darüber hinaus wurde beurteilt, wieviel Prozent der Kapillaren mit Endothelzellen bewachsen waren. Nach 5h konnte man feststellen, dass bei allen drei Beschichtungen eine annähernd gleich große Fläche mit Endothelzellen besetzt war. Bei Gelatine nahmen die Zellen 47,2%, bei Fibronectin 45% und bei Collagen 42% der Fläche des Kanalbodens ein.

Nach 24h Wachstum im Brutschrank vermehrten sich die Endothelzellen bei allen drei Beschichtungen. Wobei die Kanäle mit der Collagen-Beschichtung mit 52,4% am dichtesten waren, gefolgt von den mit der Fibronectin-Beschichtung mit 48,4%. Die Zellen mit der Gelatine-Beschichtung waren mit 46,1% am wenigsten proliferiert und hatten sich zusätzlich in die Mitte des Kanals gezogen. Auch die Zellen mit der Collagen-Beschichtung waren teilweise in der Mitte des Kanals angeordnet, wohingegen sich die Zellen mit der Fibronectin-Beschichtung gleichmäßig auf dem gesamten Boden des Kanals verteilten. Nach 48h konnte man beobachten, dass die Zellen bei allen drei Beschichtungen deutlich proliferiert waren. Bei der Fibronectin-Beschichtung waren 69,4%, bei der Gelatine-Beschichtung 64,4% und bei der Collagen-Beschichtung 60,6% des Kanals bewachsen, wobei die Zellen bei der Gelatine- und Collagen- Beschichtung teilweise immer noch in die Mitte gezogen waren. Nach 72h ließ sich nochmals eine Vermehrung der Zellen bei der Gelatine-Beschichtung (78,5%), der Fibronectin-Beschichtung (78,3%) und der Collagen-Beschichtung (76,8%) beobachten. Morphologisch waren die Zellen vergleichbar mit den Zellen nach 48h Wachstum. Da die Thrombozytenadhäsion auf Endothelzellen nach angelegtem Blutfluss über einen *Endothelzellmonolayer* beurteilt werden sollte, war es nicht nur wichtig, dass die Zellen sich gleichmäßig im Kanal vermehrten, sondern auch nach dem Blutfluss noch adhärent waren. Beurteilte man den *Endothelzellmonolayer* nach angelegtem Fluss beginnend mit einer Geschwindigkeit von 2 dyne/cm<sup>2</sup> und anschließender Steigerung auf 5 dyne/cm<sup>2</sup> und 10 dyne/cm<sup>2</sup> für jeweils zehn Minuten, konnte man sehen, dass sich nach 24h bei der Gelatine-Beschichtung viele Zellen vom Boden des Kanals lösten und aus dem Kanal geschwemmt wurden (vorher 46,1% versus nachher 35,9%). Bei der Collagen-Beschichtung lösten sich auch einige Zellen, wobei viele Zellen in die Mitte des Kanals gezogen wurden (vorher 52,4% versus nachher 52,2%). Bei der Fibronectin-Beschichtung hatte der Fluss keinen Einfluss auf die Zellen (vorher 48,4% versus nachher 52,4%). Bei einem Fluss nach 48h verhielten sich die Zellen bei der Gelatine- (vorher 64,4% versus nachher 50,9%), Collagen- (vorher 60,6% versus nachher 57,4%) und Fibronectin- (vorher 69,4% versus nachher 71,8%) Beschichtung wie nach 24h. Nach 72h lösten sich die Zellen bei der Gelatine-Beschichtung weniger ab, verlagerten sich aber etwas mehr in die Mitte (vorher 78,5% versus nachher 77,8%). Bei der Collagen-Beschichtung hingegen lösten sich deutlich mehr Zellen ab (vorher 76,8% versus nachher 63,3%). Der *Monolayer* bei

der Fibrinogen-Beschichtung blieb wie bei allen anderen Zeitpunkten vollständig erhalten (vorher 78,3% versus nachher 80,7%).

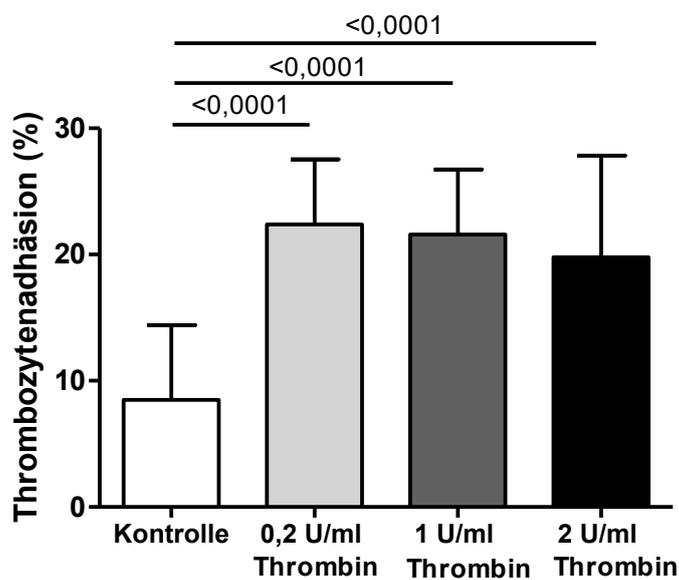


**Abb.10: Vergleich der unterschiedlichen Beschichtungen**, n= 4.

Dargestellt ist der Endothelzellmonolayer nach einer Inkubationszeit von 5h nach Aussaat der Zellen und einer Wachstumszeit von 24, 48 und 72h vor und nach angelegtem Fluss von 2 dyne/cm<sup>2</sup>, 5 dyne/cm<sup>2</sup> und 10 dyne/cm<sup>2</sup> für jeweils 10 min. Verglichen wurde die Konfluenz der Zellen, die Verteilung der Zellen im Kanal und die Adhärenz vor und nach angelegtem Fluss für die Beschichtungsmedien Gelatine (0,1%), Fibronektin (100 µg/ml) und Collagen (100 µg/ml).

### 3.2 Einfluss von Thrombin auf die Thrombozytenadhäsion

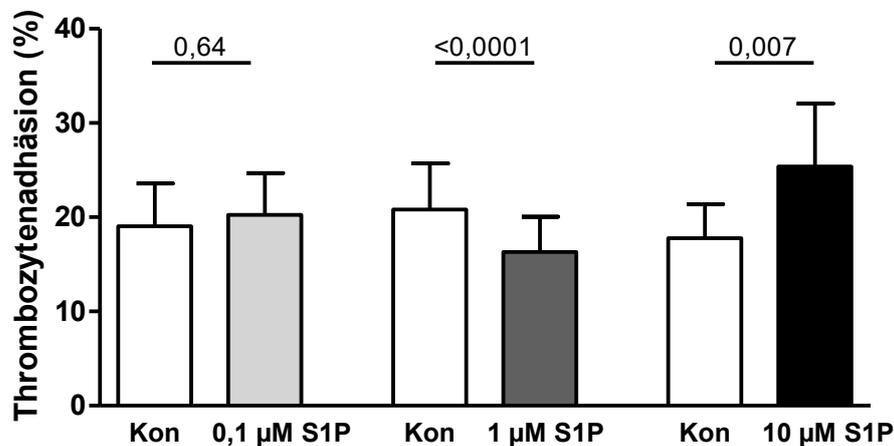
Die Inkubation der Endothelzellen mit 0,2 U/ml Thrombin führte zu einer Adhäsion von Thrombozyten entlang des *Endothelzellmonolayers* (Beschichtung mit Fibronectin: 100µg/ml) von 22,4% ± 5,1%. Bei einer Stimulation von 1 U/ml betrug die Adhäsion 21,6% ± 5,2% und bei 2 U/ml 19,8% ± 8,0%. Im Vergleich zur Kontrolle mit 8,4% ± 5,9% adhären Thrombozyten führte die Stimulation mit Thrombin bei allen drei Konzentrationen zu einer signifikanten Erhöhung der Adhäsion (Abb. 11).



**Abb. 11:** Dargestellt sind Thrombozytenadhäsion in Prozent, nach Stimulation der Endothelzellen mit Thrombin unterschiedlicher Konzentration (0,2 U/ml, 1 U/ml, 2 U/ml). Die Werte sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung. n=6.

### 3.3 Einfluss von S1P auf die Thrombozytenadhäsion

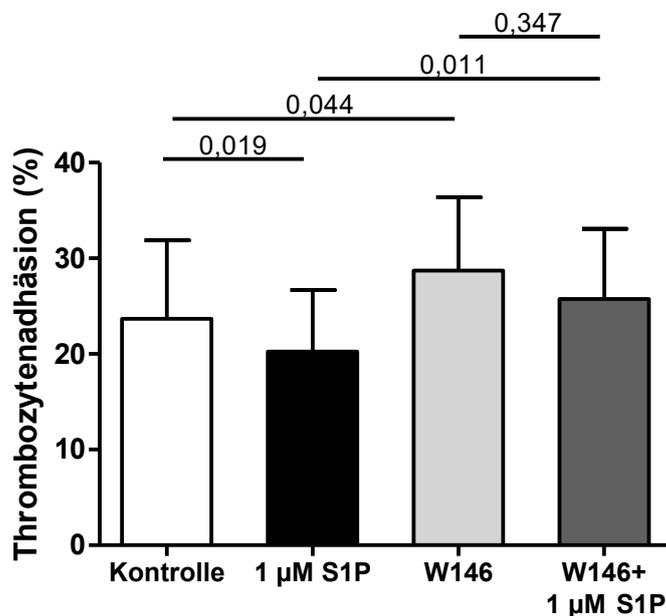
Inkubierte man die Endothelzellen mit 1  $\mu\text{M}$  S1P verringerte sich die Adhäsion auf  $16,3\% \pm 3,7\%$  versus Kontrolle  $20,8\% \pm 4,9\%$ . Die Stimulation mit 10  $\mu\text{M}$  S1P bewirkte eine Erhöhung der Adhäsion auf  $25,4\% \pm 6,7\%$  versus Kontrolle  $17,8\% \pm 3,6\%$ . Sowohl die Erniedrigung als auch die Erhöhung der Adhäsion durch die S1P Gabe waren signifikant. Versetzte man die Zellen hingegen mit 0,1  $\mu\text{M}$  S1P kam es zu keiner signifikanten Veränderung der Adhäsion. Verglichen zur Kontrolle ( $19,1\% \pm 4,5\%$ ) waren  $20,2\% \pm 4,4\%$  des *Endothelzellmonolayers* mit Thrombozyten besetzt (Abb. 12).



**Abb. 12:** Die Abb. zeigt die Thrombozytenadhäsion in Prozent, nach Stimulation der Endothelzellen mit 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  S1P. Die Werte sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. n=7- 12. Kon= Kontrolle.

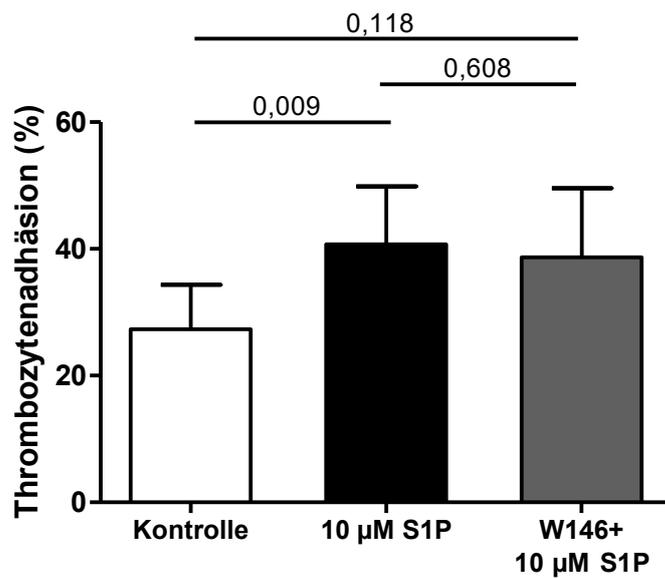
### 3.3.1 Rolle der S1P-Rezeptoren bei der Thrombozytenadhäsion

Zur Ermittlung der vermittelnden Rezeptoren wurde zuerst der Effekt des S1P<sub>1</sub>-Rezeptors untersucht. Wurden die Endothelzellen vor Stimulation mit S1P mit dem S1P<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten W146 inkubiert, konnte folgendes beobachtet werden. Die Inkubation von 1  $\mu$ M S1P mit W146 führte zu einer erhöhten Adhäsion verglichen zur Inkubation mit S1P allein. Die Thrombozytenadhäsion stieg signifikant von 20,3%  $\pm$  6,4% mit 1  $\mu$ M S1P auf 25,8%  $\pm$  7,3% durch den Zusatz des Inhibitors. Inkubierte man die Zellen nur mit W146, ohne S1P Stimulation, konnte man ebenfalls einen signifikanten Anstieg der Adhäsion auf 28,7%  $\pm$  7,7% versus Kontrolle 23,7%  $\pm$  8,2% beobachten (Abb. 13).



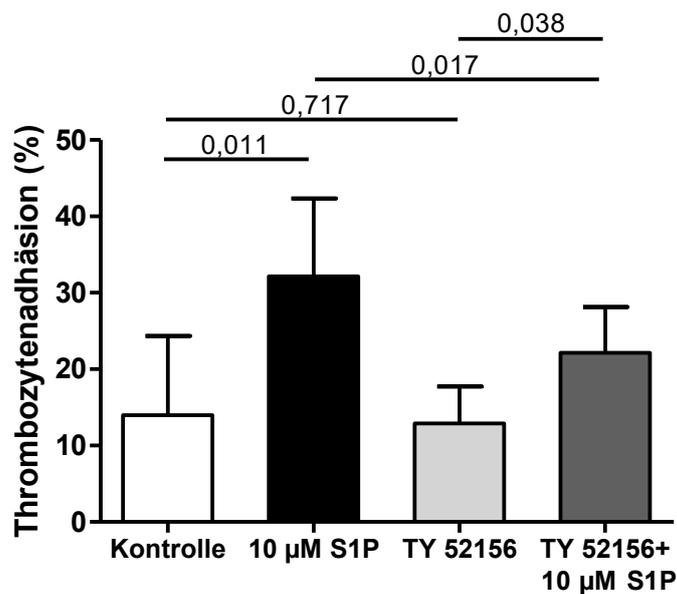
**Abb. 13:** Dargestellt sind Thrombozytenadhäsion in Prozent. HUVEC-Endothelzellen wurden mit 1  $\mu$ M S1P mit und ohne Vorinkubation des S1P<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten W146 (10  $\mu$ M) stimuliert. Die Werte sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. n=7.

Die Inkubation von W146 mit 10  $\mu$ M S1P bewirkte keine signifikante Veränderung der Adhäsion im Vergleich zur Inkubation mit S1P allein. Nach dem Zusatz von W146 waren 38,7%  $\pm$  10,9% des *Endothelzellmonolayers* mit Thrombozyten besetzt, wohingegen die Gabe von 10 $\mu$ M S1P eine Adhäsion von 40,7%  $\pm$  9,2% zeigte (Abb. 14).



**Abb. 14:** Gezeigt wird die Thrombozytenadhäsion in Prozent. HUVEC-Endothelzellen wurden mit 10  $\mu$ M S1P mit und ohne Vorinkubation des S1P<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten W146 (10  $\mu$ M) stimuliert. Die Werte sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. n=6.

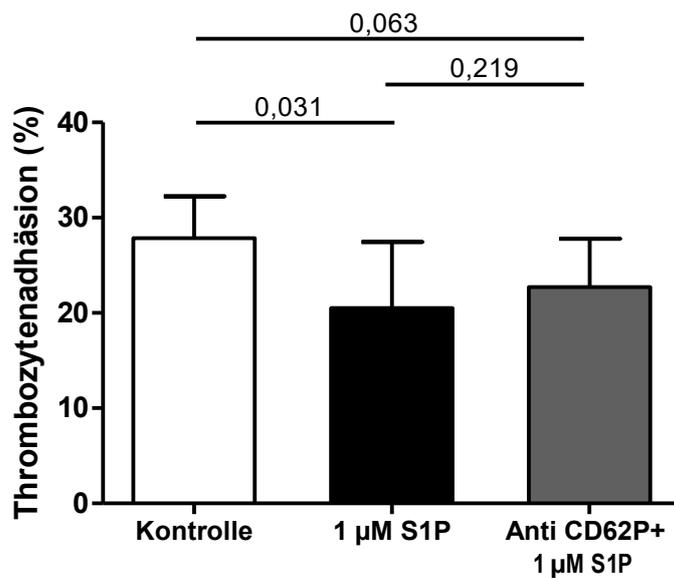
Im nächsten Schritt wurde die Rolle des S1P<sub>3</sub>-Rezeptors untersucht. Wurden HUVEC-Endothelzellen vor der Stimulation mit 10 µM S1P mit dem S1P<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten TY 52156 versetzt, adhärten weniger Thrombozyten auf dem Endothel als bei der Inkubation mit S1P allein. Die Thrombozytenadhäsion fiel signifikant von 32,1% ± 10,2% mit 10µM S1P auf 22,2% ± 6,0% durch den Zusatz von TY 52156. Die Gabe des S1P<sub>3</sub>- Rezeptorantagonisten allein hatte keinen Einfluss auf die Adhäsion gegenüber der Kontrolle (Abb. 15).



**Abb. 15:** Abgebildet wird die Thrombozytenadhäsion in Prozent. HUVEC-Endothelzellen wurden mit 10 µM S1P mit und ohne Vorinkubation des S1P<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten TY 52156 (10 µM) stimuliert. Die Werte sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung. n=5.

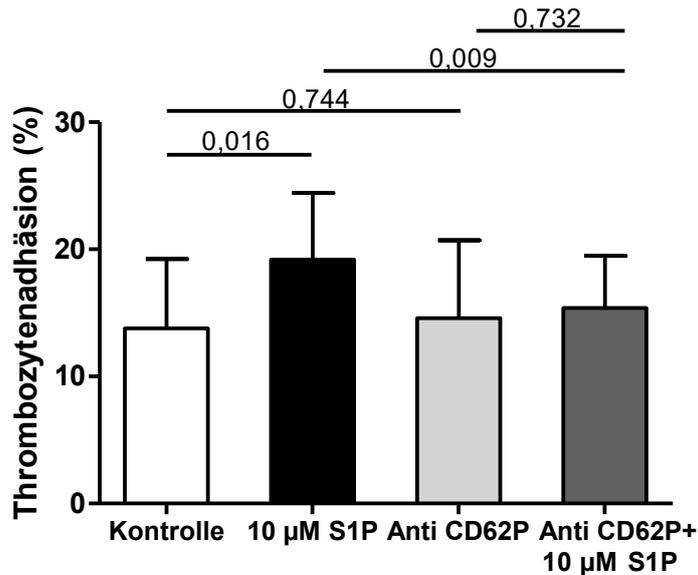
### 3.3.2 Rolle des P- Selektin Antikörpers bei der Thrombozytenadhäsion

Wurden die Zellen sowohl mit 1  $\mu\text{M}$  S1P als auch mit dem P-Selektin-Antikörper, Anti-CD62P inkubiert, kam es zu keiner signifikanten Veränderung der Thrombozytenadhäsion. Durch den Zusatz des Antikörpers adhärten auf  $20,5\% \pm 7,0\%$  des *Endothelzellmonolayers* Thrombozyten, wohingegen bei der Stimulation mit 1  $\mu\text{M}$  S1P Thrombozyten auf  $22,7\% \pm 5,1\%$  adhärten (Abb. 16).



**Abb. 16:** Dargestellt sind Thrombozytenadhäsion in Prozent. Endothelzellen wurden mit 1  $\mu\text{M}$  S1P mit und ohne Zusatz des P-Selektin-Antikörpers Anti-CD62P (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) inkubiert. Die Werte sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.  $n=6$ .

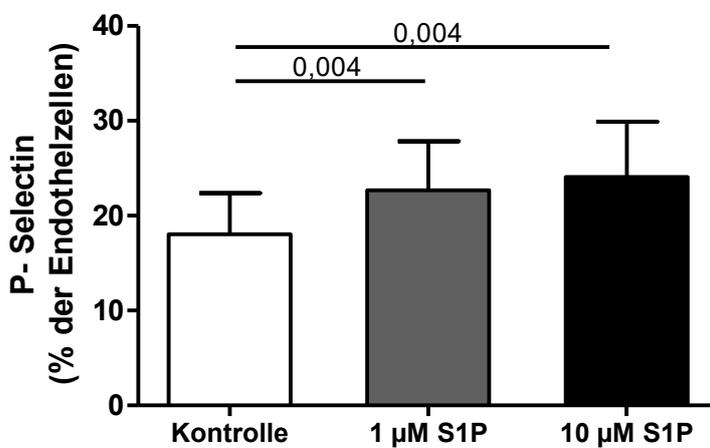
Die Inkubation der Endothelzellen mit 10  $\mu\text{M}$  S1P und dem Anti-CD62P zeigte eine Erniedrigung der Thrombozytenadhäsion verglichen zur Stimulation mit 10  $\mu\text{M}$  S1P allein. Die Adhäsion fiel signifikant von 19,2%  $\pm$  5,2% mit 10 $\mu\text{M}$  S1P auf 15,4%  $\pm$  4,1% durch den Zusatz des Antikörpers. Der Zusatz des P-Selektin-Antikörpers allein hatte keinen Einfluss auf die Adhäsion verglichen zur Kontrolle (Abb. 17).



**Abb. 17:** Dargestellt sind Thrombozytenadhäsion in Prozent. HUVEC-Endothelzellen wurden mit 10  $\mu\text{M}$  S1P mit und ohne Zusatz des P-Selektin-Antikörpers Anti-CD62P (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) inkubiert. Die Werte sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. n=6.

### 3.3.3 Einfluss von S1P auf die P- Selektin Expression

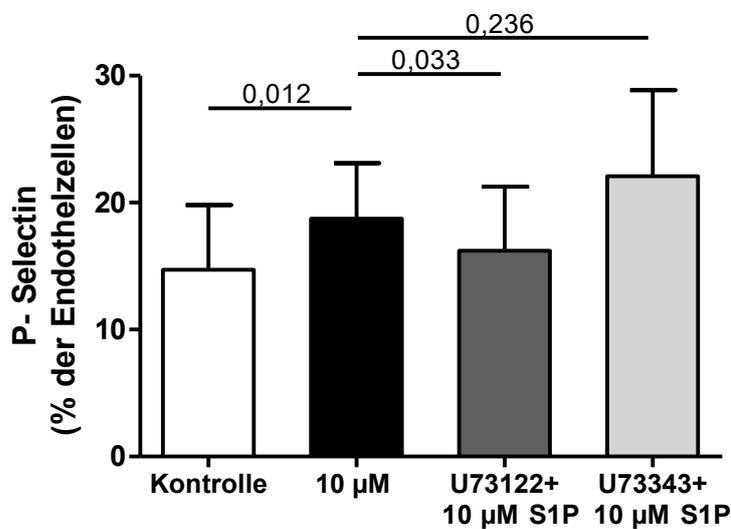
Wurden die Huvec-Endothelzellen mit 1  $\mu\text{M}$  S1P stimuliert, konnte eine Erhöhung der P-Selektin-Expression auf den Endothelzellen festgestellt werden. Die P-Selektin-Expression stieg signifikant von  $17,9\% \pm 3,8\%$  auf  $22,7\% \pm 5,1\%$ . Auch die Inkubation der Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  S1P ergab eine signifikant höhere Expression gegenüber der Kontrolle. Es kam zu einer Steigerung der Expression von  $18,2\% \pm 5,2\%$  auf  $24,1\% \pm 5,8\%$  (Abb. 18).



**Abb. 18:** P-Selektin-Expression auf Endothelzellen nach Stimulation der Zellen mit 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  S1P. Die Werte sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. n=6.

### 3.3.4 Rolle des Phospholipase C (PLC)-Inhibitors auf die P- Selektin-Expression

Die Inkubation der mit 10  $\mu\text{M}$  stimulierten Zellen mit dem Phospholipase C-Inhibitor U-73122 führte zu einer signifikanten Reduktion der P-Selektin-Expression. Sie stieg von 18,7%  $\pm$  4,4% mit 10  $\mu\text{M}$  S1P allein auf 16,2%  $\pm$  5,1%. Durch den Zusatz der Negativkontrolle U-73343 war keine signifikante Veränderung der Expression erkennbar (Abb. 19).



**Abb. 19:** Messung der P-Selektin-Expression auf Endothelzellen. HUVEC-Endothelzellen wurden mit 10  $\mu\text{M}$  S1P mit und ohne Vorinkubation des PLC-Inhibitors U-73122 (3  $\mu\text{M}$ ) und der Negativkontrolle U-73343 (3  $\mu\text{M}$ ). Die Werte sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. n=5.

## 4 Diskussion

### Das Bioflux-Modell zur Beurteilung der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion

Bei der Entstehung von Erkrankungen wie der Artherosklerose, der Thrombose und Entzündungsreaktionen sind Interaktionen von Thrombozyten mit dem Endothel und der endothelialen Matrix von großer Relevanz. Für die Untersuchung der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion kommen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Modelle zum Einsatz. Zwar können mit Hilfe von *in vivo*-Modellen am ehesten die tatsächlichen physiologischen und pathophysiologischen Prozesse in Gefäßen dargestellt werden, allerdings bieten sie kaum die Möglichkeit einzelne Parameter zu beeinflussen. Durch *in vitro*-Modelle können stark vereinfacht einzelne Aspekte dieser Prozesse untersucht werden. Viele *in vitro*-Versuche sind allerdings unter statischen Bedingungen durchgeführt. So werden die in den Blutgefäßen wirkenden Scherkräfte, die bei der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion eine besondere Rolle spielen, nicht berücksichtigt (16, 116). Diesen Verhältnissen kann das Flusskammermodell eher gerecht werden. Allerdings waren diese Modelle in der Vergangenheit besonders dadurch limitiert, dass relativ wenige Versuchsansätze parallel durchgeführt werden konnten und es daher an einer guten Reproduzierbarkeit mangelte. Zusätzlich waren große Volumina an Zellen und Reagenzien erforderlich. Diese Limitierungen machen es notwendig, weitere Flusskammermodelle zu etablieren, die diese Voraussetzungen besser erfüllen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Flusskammer der Firma I&L Biosystems (Königswinter, Deutschland) verwendet. Grundsätzlich zeigt sich, dass das Bioflux 200-System für die Untersuchung der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion geeignet ist. Ziel der Etablierung eines neuen Flusskammermodells war es, die physiologischen Verhältnisse in Gefäßen realitätsnah nachzustellen. Da in Blutgefäßen die Wand, insbesondere die Intima, die die innerste Schicht der Gefäßwand darstellt und aus einer einzelnen Lage aus Endothelzellen besteht, eine herausragende Bedeutung besitzt, war es besonders wichtig einen gleichmäßigen *Monolayer* an Endothelzellen in den Bioflux-Kapillaren zu generieren. HUVEC-

Endothelzellen sind für die Simulation physiologischer Bedingungen von Blutgefäßen *in vitro* besonders geeignet, da sie menschlichen Ursprungs sind und noch fast alle morphologischen, funktionellen und immunologischen Eigenschaften von ursprünglichen Endothelzellen aufweisen (117). Bei der Etablierung des Modells der Flusskammer zeigte sich, dass HUVEC-Endothelzellen die bestmöglichen Wachstumseigenschaften bei der Beschichtung der Kapillaren mit Fibronektin aufwiesen. Zwar war die Zellproliferation bei den Beschichtungen mit Collagen und Gelatine ähnlich gut, allerdings konnte man ein ungleichmäßiges Wachstum entlang der Kapillaren und ein Ablösen der adhären Zellen unter Flussbedingungen feststellen (Abb. 10). Da allerdings die dynamische Komponente im Gefäßsystem von besonderer Relevanz ist, ist die Beschichtung mit Fibronektin für die Generierung eines *Endothelzellmonolayers* besser geeignet. Endothelzellen sind je nach Art und Größe des Gefäßes unterschiedlichen Flussbedingungen ausgesetzt, sodass arteriell und venös ein unterschiedlich starker Scherstress [ $\text{dyne/cm}^2$ ] vorherrscht (116). Da die vorliegende Versuchsreihe das Ziel hatte, die pathophysiologischen Verhältnisse im arteriellen System näher darzulegen, wurde mit  $10 \text{ dyne/cm}^2$  ein Scherstress gewählt, der einer Flussgeschwindigkeit, wie sie im arteriellen System des Körpers vorliegt, entspricht. Des Weiteren konnte durch die Verwendung einer *pulsatilen* Perfusion eine besonders realitätsnahe arterielle Flusssituation nachgestellt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit der Etablierung des Bioflux 200-Systems ein Flusskammermodell zur Verfügung steht, das unter möglichst *in vivo*-nahen Bedingungen den Fluss in Blutgefäßen simuliert. Versuche in den Bioflux-Kanälen können bereits mit Volumina von  $50 \mu\text{l}$  durchgeführt werden. Besondere Vorteile des Bioflux-Systems gegenüber bereits etablierten Flusskammermodellen sind vor allem die kontrolliert standardisierten Flussbedingungen mit bis zu 24 gleichzeitig durchführbaren Versuchsansätzen. Vor allem die Möglichkeit Scherkräfte im Bereich von  $0-200 \text{ dyne/cm}^2$  anzuwenden, erlaubt es ebenfalls pathologische Bedingungen, wie sie bei Gefäßerkrankungen vorkommen nachzustellen.

## **Thrombin induziert eine Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion**

Der folgende Versuchsansatz hatte das Ziel, eine Stimulation der HUVEC-Endothelzellen zu induzieren und dadurch eine Interaktion zwischen Thrombozyten und dem Endothel zu erzielen. Mit dieser Untersuchung sollte gezeigt werden, dass Thrombozyten aus Vollblut unter Flussbedingungen in den Bioflux-Kanälen mit dem stimulierten Endothel interagieren können. Zusätzlich war es wichtig zu erkennen, wie sich diese Interaktion darstellte und ob es möglich war Unterschiede zwischen den Bedingungen „unstimuliert“, also der Kontrollbedingung und „stimuliert“ festzustellen. Diesem Versuch liegt die Überlegung zu Grunde, dass die Inkubation der Endothelzellen mit Thrombin eine Mobilisierung von P-Selektin an die Endothelzelloberfläche bewirkt, über die nachfolgend eine Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion vermittelt wird. Wie bereits aus früheren Versuchen bekannt ist, führt Thrombin zu einer Translokation von P-Selektin an die Zelloberfläche. Sugama et al. konnten in ihren Versuchen nachweisen, dass sich die P-Selektin Mobilisierung nach einer Stimulation der Zellen mit Thrombin innerhalb weniger Minuten vollzieht und konzentrationsabhängig ist (118).

In dem vorliegenden Versuchsansatz verstärkte die Inkubation der HUVEC-Endothelzellen mit Thrombin unterschiedlicher Konzentration die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion verglichen zur Kontrolle. Zusätzlich war zu beobachten, dass mit steigender Thrombinkonzentration auch die Interaktion zunahm (Abb. 11). Die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion wurde in der vorliegenden Untersuchung mit Hilfe der Fläche des Endothelzellmonolayers, die mit Thrombozyten besetzt ist ermittelt („*area coverage*“). Hierbei lässt sich allerdings nicht sicher differenzieren, ob es sich um eine reine Adhäsion oder um eine zusätzliche Aggregation handelt. Im Folgenden wird die beobachtete Interaktion als Thrombozytenadhäsion definiert und im weiteren Verlauf der Diskussion näher erläutert. Es wurde somit gezeigt, dass das in dieser Arbeit etablierte Flusskammermodell ein geeignetes Modell darstellt, um Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen zu untersuchen.

## **S1P beeinflusst konzentrationsabhängig die Thrombozytenadhäsion**

Die Rolle von S1P bei der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion wurde bereits in verschiedenen Arbeiten untersucht. Wie bereits in der Einleitung erläutert, ist aus mehreren Studien bekannt, dass S1P die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle, wie zum Beispiel dem ICAM-1 und den Selektinen E-Selektin und P-Selektin reguliert. So beeinflusst es rezeptortypabhängig die Adhäsion von Monozyten an das Endothel. Versuche von Nussbaum et al. (112) konnten belegen, dass S1P ebenfalls ein *Leukozytenrolling* auf HUVEC-Endothelzellen induziert, indem es die P-Selektin-Expression auf der Endothelzelloberfläche hochreguliert. Untersuchungen bezüglich des Effekts von S1P auf die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion gibt es hingegen wenige. Die meisten der in der Literatur berichteten Arbeiten befassen sich mit dem direkten Effekt von S1P auf die Thrombozyten. So wiesen Urtz et al. (119) eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Thrombozytenaggregation nach S1P Zugabe nach. Sie konnten zeigen, dass Thrombozyten aus Vollblut verglichen zur Kontrolle mehr aggregierten, wenn sie mit 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  S1P stimuliert wurden. Allerdings sind auch Arbeiten zu finden, die dem S1P eine aggregationshemmende Wirkung zuschreiben (120). Urtz et al. befassten sich nicht nur mit dem Effekt von exogen zugeführtem S1P auf die Thrombozyten, sondern auch mit dem Effekt von in Thrombozyten durch die Sphingosinkinase2 gebildetem und anschließend sezerniertem S1P. Sie wiesen nach, dass Sphingosinkinase2 defiziente Thrombozyten in ihrer Aggregationsfähigkeit beeinträchtigt waren, wobei die Adhäsion dieser erhalten blieb. In einem *in vivo*-Thrombosemodell, indem eine Gefäßschädigung durch Eisen-(III)-chlorid induziert wurde, stellten sie zusätzlich eine Verminderung der Thrombusformation in Sphingosinkinase2-defizienten Mäusen fest (119). Demgegenüber gibt es kaum Untersuchungen, die darlegen wie sich Thrombozyten auf mit S1P stimuliertem Endothel verhalten. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen eine konzentrationsabhängige Veränderung der Thrombozytenadhäsion an das Endothel, nach Inkubation der HUVEC-Endothelzellen mit exogenem S1P. Die in dieser Studie verwendeten S1P-Konzentrationen wurden so festgelegt, dass sowohl der physiologische als auch der pathologische Bereich abgedeckt wurde. Dabei wurde mit 1  $\mu\text{M}$  S1P eine physiologische, mit 0,1  $\mu\text{M}$  eine Konzentration unterhalb und mit 10  $\mu\text{M}$  S1P eine

Konzentration oberhalb des physiologischen Bereiches gewählt (62). Während exogenes S1P in physiologisch relevanten Konzentrationen eine signifikant reduzierte Thrombozytenadhäsion bewirkte, konnte durch die höhere S1P Konzentration eine signifikante Steigerung der Adhäsion festgestellt werden. Die Inkubation des *Endothelzellmonolayers* mit 0,1  $\mu\text{M}$  S1P führte hingegen zu keiner signifikanten Veränderung der Adhäsion (Abb. 12). Die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Verminderung der Thrombozytenadhäsion steht im Einklang mit den Ergebnissen von Hsia et al., die eine verringerte Thrombogenität bei S1P behandelten rezellularisierten Prothesen der Nabelschnurvene feststellten. In Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen, führte die physiologische Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  S1P zu einer Erniedrigung der Thrombozytenadhäsion an S1P behandelte HUVEC-Endothelzellen (121). Die Auswirkungen von S1P in höheren Konzentrationen beziehungsweise in Konzentrationen unterhalb des physiologischen Bereiches wurden in dieser Arbeit allerdings nicht untersucht. Wenn auch auf die Fähigkeit zur Thrombozytenaggregation bezogen, bestätigen die Ergebnisse von Urtz et al. ebenfalls, dass S1P in der Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  keinen Effekt zeigt (119). Dies lässt vermuten, dass ein bestimmtes Konzentrationsniveau an S1P vorherrschen muss, damit es eine Wirkung erzielen kann. Konzentrationsabhängig gegensätzliche Effekte des S1P sind in der Literatur allerdings bei einigen Funktionen, wie zum Beispiel der Migration und der Barrierefunktion beschrieben. Shikata et al. zeigten, dass eine S1P-Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  einen barriereprotektiven Effekt auf das Endothel hat, wohingegen S1P-Konzentrationen über 5  $\mu\text{M}$  zu einer Verringerung der Barrierefunktion führen (92). Diese gegensätzlichen Ergebnisse lassen sich darauf zurückführen, dass S1P abhängig von der Konzentration entweder den S1P<sub>1</sub>-Rezeptor oder den S1P<sub>3</sub>-Rezeptor stimuliert (122, 123). Einen weiteren rezeptortypabhängigen Effekt konnten Nussbaum et al. darstellen, indem sie belegten, dass der S1P<sub>1</sub>-Rezeptor eine inhibitorische Wirkung auf das *Leukozytenrolling* hat, welches sie durch ein gesteigertes *Rolling* in *S1P<sub>1</sub>-Rezeptor-defizienten* Mäusen nachweisen konnten. Demgegenüber steht der Haupteffekt der Arbeit von Nussbaum et al., bei dem S1P über die Aktivierung des S1P<sub>3</sub>- Rezeptors zu einem vermehrten *Leukozytenrolling* führt (112). Basierend auf diesen Beobachtungen ist es denkbar, dass durch die in dieser Arbeit gewählten S1P-Konzentrationen ebenfalls unterschiedliche

Rezeptoren aktiviert werden. Diese Hypothese wurde in nachfolgenden Versuchen durch die Inhibierung der Rezeptoren durch S1P-Rezeptorantagonisten untersucht.

### **Die physiologische S1P-Konzentration führt über den S1P<sub>1</sub>-Rezeptor zu einer verminderten Thrombozytenadhäsion**

Da S1P seine extrazellulären Funktionen über die fünf S1P-Rezeptoren vermittelt, war ein Ziel dieser Arbeit, diejenigen Rezeptoren, die für die beobachteten Veränderungen der Thrombozytenadhäsion eine Rolle spielen, zu identifizieren. Die fünf S1P-Rezeptoren und ihre Funktionen wurden bereits in der Einleitung näher erläutert. HUVEC-Endothelzellen exprimieren lediglich die Rezeptoren S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3</sub> (97), daher wurden nur diese bei der Ermittlung der vermittelnden Rezeptoren betrachtet. Um den S1P<sub>1</sub>-Rezeptor zu inhibieren wurde der S1P<sub>1</sub>-Rezeptorantagonist W146 verwendet, während für die Blockierung des S1P<sub>3</sub>-Rezeptors der S1P<sub>3</sub>-Rezeptorantagonist TY 52156 zur Anwendung kam. In der vorliegenden Untersuchung führte die Zugabe von W146 zu den mit 1 µM S1P stimulierten Zellen, im Vergleich zur Inkubation der HUVEC-Endothelzellen mit S1P allein, zu einer höheren Adhäsion der Thrombozyten auf dem Endothel. Die fehlende Verringerung der Thrombozytenadhäsion weist darauf hin, dass für die Vermittlung des Effektes von 1 µM S1P der S1P<sub>1</sub>-Rezeptor eine entscheidende Rolle spielt (Abb. 13). Es fällt allerdings auf, dass der S1P<sub>1</sub>-Rezeptorantagonist nicht nur die verminderte Adhäsion rückgängig macht, sondern auch die Thrombozytenadhäsion über das Kontrollniveau hinaus erhöht. Eine Begründung hierfür könnte das im Plasma endogen vorhandene S1P sein, welches physiologisch in einer Konzentration von 0,2- 1 µM vorliegt (62). Das endogene S1P ist insofern von Bedeutung, da HUVEC-Endothelzellen in dieser Arbeit nach Stimulation mit exogenem S1P, beziehungsweise unstimulierte Zellen, die als Kontrolle dienen, anschließend mit Vollblut (Citrat- Plasma) perfundiert werden. Dies bedeutet, dass während des Perfusionsschrittes, bei dem die Thrombozyten mit den Endothelzellen interagieren, zusätzlich S1P auf das Endothel wirkt. Ausgehend davon, dass S1P in dieser Konzentration über den S1P<sub>1</sub>- Rezeptor eine Verminderung der Thrombozytenadhäsion bewirkt, ist es möglich, dass in diesem Schritt das endogene S1P ebenfalls eine Wirkung zeigt, die allerdings nicht zur Geltung kommt, da dieser Effekt in allen Ansätzen vorhanden ist und hier die

Änderung der Adhäsion im Vergleich zur Kontrolle relevant ist. Inhibiert man nun den S1P<sub>1</sub>-Rezeptor vor der Stimulation mittels des S1P<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten W16, so werden nicht nur die Rezeptoren blockiert, an die das exogen hinzugegebene S1P bindet, sondern auch das S1P, welches im Probandenplasma vorhanden ist. Diese Theorie könnte begründen, warum die Zugabe des S1P<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten zum Kontrollansatz eine Steigerung der Adhäsion bewirkt. Ob das S1P, welches während des Perfusionsschrittes auf das Endothel wirkt, denselben Effekt hat, wie das exogene S1P, mit dem die Zellen inkubiert werden, ist allerdings nicht sicher, da das S1P wirkt, während bereits Thrombozyten an das Endothel adhären. Denkbar wäre es jedoch, da die Perfusionszeit 10 Minuten beträgt und gezeigt wurde, dass bereits Stimulationszeiten von wenigen Minuten ausreichen, um einen Effekt des S1P zu erzielen.

### **Die höhere S1P-Konzentration bewirkt über den S1P<sub>3</sub>-Rezeptor eine Steigerung der Thrombozytenadhäsion**

Der S1P<sub>1</sub>-Rezeptorantagonist W146 war zwar in der Lage den Effekt von 1 µM S1P zu verhindern, hatte jedoch keinen Einfluss auf den Effekt von 10 µM S1P (Abb. 14). Es konnte jedoch festgestellt werden, dass durch den S1P<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten TY-52156 die Erhöhung der Thrombozytenadhäsion teilweise rückgängig gemacht werden konnte. Da die Gabe von TY52156 zu den mit 10 µM S1P stimulierten Zellen, im Vergleich zur Inkubation der HUVEC-Endothelzellen mit S1P allein, zu einer signifikanten Veränderung der Adhäsion führte, kann man daraus schließen, dass für die Vermittlung des Effektes der S1P<sub>3</sub>-Rezeptor von großer Relevanz ist (Abb. 15). Da sich die Erhöhung der Adhäsion nicht vollständig verhindern ließ, besteht die Möglichkeit, dass weitere Mechanismen hierbei eine Rolle spielen.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass S1P in physiologisch relevanter Konzentration durch Stimulation des S1P<sub>1</sub>-Rezeptors eine Verringerung der Adhäsion bewirkt, die hohe S1P-Konzentrationen allerdings über den S1P<sub>3</sub>-Rezeptor zu einer vermehrten Adhäsion führt. Diese Ergebnisse entsprechen den Beobachtungen von Nussbaum et al., die eine Verminderung des *Leukozytenrollings* durch den S1P<sub>1</sub>-Rezeptor und im Gegensatz dazu eine S1P<sub>3</sub>-

Rezeptor-abhängige Erhöhung des *Rollings* nachweisen konnten (112). Entgegen der in dieser Arbeit ermittelten Daten, wo durch die Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  S1P der S1P<sub>1</sub>-Rezeptor aktiviert wird, führt S1P in dieser physiologischen Konzentration bei Nussbaum et al. zu einer Aktivierung des S1P<sub>3</sub>-Rezeptors. Demgegenüber wird die Aktivierung des S1P<sub>3</sub>-Rezeptors in dieser Arbeit bei einer S1P-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  erreicht. Bei welcher Konzentration genau die untersuchten Rezeptoren jeweils aktiviert werden, kann in dieser Arbeit nicht ermittelt werden, da lediglich die beiden Konzentrationen verwendet wurden. Um diese Fragestellung genauer beantworten zu können, müssten weitere Konzentrationen zwischen 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  eingesetzt werden. Die zwischen beiden Arbeiten ermittelten Unterschiede könnten möglicherweise in der Verwendung unterschiedlicher Methoden begründet sein. In dieser Arbeit kam zur Ermittlung der Thrombozytenadhäsion das *in vitro*-Biofluxmodell zur Anwendung, Nussbaum et al. hingegen verwendeten für die Untersuchung des *Leukozytenrollings* ein *in vivo*-Modell der Maus (*postcapillary venules of the cremaster muscle*). Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass für die Aktivierung des S1P<sub>3</sub>-Rezeptors in humanen Zellen höhere S1P-Konzentrationen benötigt werden als in murinen Zellen. Dagegen sprechen allerdings die weiterführenden Ergebnisse von Nussbaum et al., die zusätzlich zum Mausmodell, die P-Selektin-Expression in HUVEC-Endothelzellen am Durchflusszytometer gemessen haben. Die Tatsache, dass die durch 1  $\mu\text{M}$  S1P induzierte Steigerung der P-Selektinexpression, durch Zugabe des S1P<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten teilweise inhibiert werden konnte, deutet darauf hin, dass 1  $\mu\text{M}$  S1P bei den Versuchen von Nussbaum et al. in humanen Zellen ebenfalls den S1P<sub>3</sub>-Rezeptor aktiviert.

### **Die Erhöhung der Thrombozytenadhäsion ist P-Selektin abhängig**

Da die fünf S1P-Rezeptorsubtypen in der Lage sind verschiedene Signalwege zu aktivieren, sollten in dieser Arbeit, nicht nur die vermittelnden Rezeptoren ermittelt, sondern auch der zugrundeliegende Mechanismus dargestellt werden. In Anlehnung an die Ergebnisse von Nussbaum et al., die nachwiesen, dass S1P zu einer Translokation von P-Selektin an die Endothelzelloberfläche führt (112), wurde im nachfolgenden der Einfluss von P-Selektin auf die Thrombozytenadhäsion untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die Verwendung des P-Selektin-

Antikörpers, die durch 10  $\mu\text{M}$  S1P induzierte Erhöhung der Thrombozytenadhäsion verhindern konnte. Daraus lässt sich schließen, dass P-Selektin bei der durch die höhere S1P-Konzentration vermittelten Thrombozyten-Endothel-Interaktion von großer Bedeutung ist (Abb. 17). Dass das endotheliale P-Selektin Einfluss auf die Thrombozytenadhäsion nimmt, wurde bereits in den Versuchen von Tseng et al. und Galbusera et al. bestätigt (124, 125). Dagegen hatte der P-Selektin-Antikörper Anti-CD62P keinen definitiven Einfluss auf den Effekt, der über die niedrigere S1P-Konzentration erzielt wurde. Es konnte zwar eine leichte Erhöhung der Adhäsion durch Zugabe des Antikörpers auf S1P stimulierte Zellen beobachtet werden, diese Veränderung war allerdings nicht signifikant.

### **S1P induziert eine Translokation von P-Selektin auf die Endothelzelloberfläche**

Um den Effekt des P-Selektins näher darlegen zu können, wurde die P-Selektin Oberflächenexpression auf HUVEC-Endothelzellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Hier zeigte sich, dass das S1P Einfluss auf die P-Selektin-Oberflächenexpression nimmt. Erstaunlicherweise führte nicht nur die Inkubation von 10  $\mu\text{M}$  S1P, dessen P-Selektin-Einfluss mittels Inhibierung durch den P-Selektin-Antikörper nachgewiesen werden konnte, zu einer signifikanten Steigerung des P-Selektins auf der Endotheloberfläche, sondern auch die physiologische Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  S1P (Abb. 18). Bei der Frage, ob es sich hierbei um eine Mobilisierung von in Weibel-Palade-Körperchen gespeichertem P-Selektin an die Zelloberfläche oder um eine Neusynthese handelt, kann man mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgehen, dass die Stimulation der Zellen mit S1P zu einer schnellen Translokation von P-Selektin auf die Oberfläche führt. Studien zeigen, dass eine Neusynthese von P-Selektin durch Stimulantien, wie zum Beispiel TNF-alpha (Tumornekrosefaktor) und LPS (Lipopolysaccharid) Inkubationszeiten von 2- 4 Stunden in Anspruch nimmt (102, 126). Demnach wäre die in dieser Arbeit verwendete Inkubationszeit von 5 Minuten (zuzügliche 5 Minuten Nachinkubation) für eine Neusynthese zu kurz. Darüber hinaus gibt es bereits mehrere Arbeiten, die eine schnelle Mobilisierung von P-Selektin an die Zelloberfläche innerhalb weniger Minuten durch Mediatoren wie Thrombin und Histamin beschreiben (127, 128). Matsushita et al. zeigten des Weiteren, dass S1P die Exozytose von Weibel-Palade-

Körperchen und damit die Freisetzung von P-Selektin und dem vWF stimuliert (110). Van Hooren et al. konnten sogar belegen, dass der S1P<sub>3</sub>-Rezeptor, jedoch nicht der S1P<sub>1</sub>-Rezeptor in diesem Mechanismus mit involviert ist (111). Daher liegt es nahe, dass die in dieser Arbeit festgestellte Hochregulierung der P-Selektin-Expression über die Exozytose der Weibel-Palade-Körperchen stattfindet. Vergleicht man die in dieser Arbeit dargestellte P-Selektin-Oberflächenexpression mit der Expression, die von Nussbaum et al. nachgewiesen werden konnte (112), so kann man feststellen, dass die in dieser Arbeit ermittelten Werte deutlich niedriger ausfallen. In beiden Arbeiten wurde die Expression des P-Selektins auf der Oberfläche von HUVEC-Endothelzellen ermittelt. Unterschiede finden sich in der Kultivierung der Zellen, die möglicherweise einen Einfluss auf die Expression nimmt. Da die Thrombozytenadhäsion in den Bioflux-Kanälen ermittelt wurde und die Kultivierung der Endothelzellen in diesen sehr anspruchsvoll ist, musste dem Kulturmedium der Wachstumsfaktor *Endothelial Cell Growth Supplement* sowie Heparin zugesetzt werden. Um die Bedingungen nicht zu verändern, wurden diese Zusätze auch in den Versuchen am Durchflusszytometer eingesetzt, verglichen zu Nussbaum et al., die ohne zusätzliche Wachstumsfaktoren auskamen. Minter et al. konnten zeigen, dass *Endothelial Cell Growth Supplement* und Heparin Einfluss auf die Freisetzung von Substanzen wie Prostazyklin, vWF und den Gewebespezifischen Plasminogenaktivator (*tissue plasminogen activator*) in HUVEC-Zellen nehmen (129). Vor diesem Hintergrund könnte die unterschiedliche Kultivierung bereits Einfluss auf die Stärke der Expression nehmen. Zusätzlich fällt auf, dass bei der Arbeit von Nussbaum et al. die Zell-Passagen 2-4 verwendet wurden. In dieser Arbeit hingegen wurden aus technischen Gründen die Passagen 3-4 verwendet. Die Ergebnisse von Kameda et al. zeigen allerdings, dass die Passage der HUVEC-Zellen großen Einfluss auf die P-Selektin-Oberflächenexpression nach Thrombin-Stimulation nimmt. So konnte bereits ab Passage 2 eine deutliche Reduktion der Oberflächenexpression in Thrombin-stimulierten Endothelzellen festgestellt werden (130).

## **Die P-Selektin-Expression findet über einen Phospholipase C-abhängigen-Weg statt**

Der Mechanismus der Exozytose von Weibel-Palade-Körperchen ist sehr komplex. Bekannt ist, dass die Phospholipase C abhängige Calcium- Erhöhung in diesem Mechanismus mitwirkt (131). Wir konnten nachweisen, dass der Phospholipase C-Inhibitor U-73122 die S1P abhängige Erhöhung der P-Selektin-Expression verhindern kann. Damit zeigt sich, dass die in dieser Arbeit ermittelte Hochregulierung der P-Selektin-Expression nach S1P Stimulation der Endothelzellen über den Phospholipase C-Weg stattfindet (Abb. 19). Diese Beobachtung findet sich auch in der Arbeit von Nussbaum et al. wieder, die ebenfalls einen hemmenden Effekt des Phospholipase C-Inhibitors nachweisen konnten. Darüber hinaus ermittelten Nussbaum et al., dass die Hemmung der SERCA durch Thapsigargin und Komplexierung von Calcium durch EGTA ebenfalls zu einer Reduktion, der durch S1P hochregulierten P-Selektin-Oberflächenexpression führt (112), was die Bedeutung des Phospholipase C-Wegs bei der Exozytose von Weibel-Palade-Körperchen unterstreicht.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die in dieser Arbeit durchgeführte Stimulation der Endothelzellen mit S1P zu einer Aktivierung der Phospholipase C und somit zu einer Exozytose von Weibel-Palade-Körperchen mit Freisetzung von P-Selektin und anschließender Translokation dieser an die Zelloberfläche führt. Die Aktivierung der Phospholipase C induziert wahrscheinlich die Erhöhung der Calciumkonzentration, welches noch in weiterführenden Versuchen untersucht werden sollte.

### **Limitation dieser Arbeit**

Eine Limitation der in dieser Arbeit verwendeten Methode ist, dass nicht genau differenziert werden kann, welcher Schritt der in dieser Arbeit dargestellten Thrombozyten-Endothel-Interaktion durch das S1P vermittelt wird. Um relativ *in vivo*- nahe Bedingungen darzustellen, wurde in dieser Arbeit Vollblut (Plasma) anstelle von Plättchenreichem Plasma (PRP) verwendet. Vor allem die *Margination* der Thrombozyten an die Gefäßwand, die dadurch entsteht, dass die im Vollblut vorhandenen Erythrozyten Thrombozyten an die Gefäßwand drängen, ist von

großer Bedeutung für die Thrombozyten-Endothel-Interaktion (132). Aus mehreren Studien ist bekannt, dass Thrombozyten nicht nur an verletzte Gefäßareale adhären, sondern auch mit dem intakten, jedoch aktivierten Endothel interagieren. Initial kommt es zu einem Anheften („*tethering*“) der Zellen mit anschließendem Rollen („*rolling*“) dieser über das Endothel und zum Schluss zu einer festen Adhäsion der Thrombozyten an die Gefäßwand (16). Das initiale Rolling der Thrombozyten wird über die Selektine vermittelt. Frenette et al. konnten sowohl in Arteriolen als auch in Venolen ein P-Selektin abhängiges Rolling der Thrombozyten bei inflammatorischen Prozessen zeigen (133, 134). Für die feste Adhäsion hingegen sind die Integrine zuständig, bei der vor allem den  $\beta_3$ -Integrinen ( $\alpha_{IIb}\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_3$ ) eine besondere Rolle zugeschrieben wird (135, 136). Demgegenüber zeigten Kandoga et al. in einem Ischämie-/Reperfusion-Modell in der Leber der Maus, dass endotheliales P-Selektin sowohl Einfluss auf das Rollen als auch auf die feste Adhäsion der Thrombozyten in Arteriolen und Venolen nimmt (137). Wir konnten zeigen, dass die Stimulation der Endothelzellen mit S1P eine Hochregulierung der P-Selektin Oberflächenexpression bewirkt. Über das P-Selektin könnte S1P auf den initialen Kontakt zwischen Thrombozyten und dem Endothel Einfluss nehmen. Es ist möglich, dass durch das stärker exprimierte P-Selektin auf den Endothelzellen, mehr Thrombozyten auf dem Endothel rollen und anschließend über eine verminderte Fließgeschwindigkeit des Thrombozyten die weitere Adhäsion und Aggregation ermöglichen. Ob S1P nur Einfluss auf das Rollen nimmt oder auch die Adhäsion direkt beeinflusst, ist in dem bei dieser Arbeit verwendeten Versuchsmodell nicht sicher zu klären, da in dieser Arbeit, die Thrombozyten-Endothel-Interaktion nach Anlegen eines Blutflusses für 10 min und anschließendem Waschschrift betrachtet wird. Um diese Fragestellung genauer zu klären, müsste die Thrombozyten-Endothel-Interaktion während des Flussvorganges genauer beobachtet werden. Hierbei wäre die Frage zu klären, ob es verglichen zur Kontrolle initial zu einem stärkeren *Thrombozytenrolling* kommt.

## **Ausblick**

Die Wirkung von S1P auf das kardiovaskuläre System ist sehr komplex. Es beeinflusst nicht nur die Atherosklerose, sondern auch die Koagulation. Da die fünf S1P-Rezeptoren auf verschiedenen Zellarten unterschiedlich stark exprimiert werden, weist das S1P verschiedene teilweise entgegengesetzte Wirkungen auf. Diese Tatsache macht die Forschung um das S1P sehr schwierig. Weitere Grundlagenforschung zur Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen und Signalwege ist nötig. Ziel ist es neue Therapieansätze bei der Prävention der Atherosklerose und seiner Folgeerkrankungen zu finden. Möglich wären spezifische Modulatoren der Sphingosinkinase, S1P-Phosphatase und S1P-Lyase, um somit die Konzentration des bioaktiven S1P zu beeinflussen. Denkbar wäre auch die medikamentöse Anwendung von S1P-Rezeptoragonisten und S1P-Rezeptorantagonisten um gezielt bestimmte Signalwege zu beeinflussen. Das Sphingosin-1-phosphat-Analogon Fingolimod (FTY-720) zum Beispiel kommt bereits bei dem Krankheitsbild der Multiplen Sklerose zur Anwendung (138).

Wir konnten zeigen, dass S1P konzentrationsabhängig die Thrombozyten-Endothelzellinteraktion beeinflusst. So führt S1P in physiologisch relevanter Konzentration zu einer Erniedrigung der Thrombozytenadhäsion, wohingegen S1P in höherer Konzentration die Thrombozytenadhäsion erhöht. Vor dem Hintergrund der Prävention wäre es sinnvoll höhere S1P-Konzentrationen im Organismus zu vermeiden.

## Literaturverzeichnis

1. Destatis- Statistisches Bundesamt: Gesundheit- Todesursachen [updated: 09.07.2020]; [https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/\\_inhalt.html](https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html).
2. Amboss: Atherosklerose und kardiovaskuläre Prävention [updated: 09.07.2020]; <https://next.amboss.com/de/article/s70tMh#Z139361cb7eef098487c30705ba4a7975>.
3. Behrends J, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S. Duale Reihe–Physiologie. Thieme Verlag 2012.
4. Gawaz M. Das Blutplättchen, Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und Therapie bei koronarer Herzerkrankung. Thieme Verlag. 1999.
5. Rumbaut RE, Thiagarajan P. Integrated Systems Physiology: from Molecule to Function to Disease. Platelet-Vessel Wall Interactions in Hemostasis and Thrombosis. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010.
6. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*. 2001;12(5):261-73.
7. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(3):403-12.
8. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med*. 2002;8(11):1227-34.
9. Arya M, Lopez JA, Romo GM, Cruz MA, Kasirer-Friede A, Shattil SJ, et al. Glycoprotein Ib-IX-mediated activation of integrin alpha(IIb)beta(3): effects of receptor clustering and von Willebrand factor adhesion. *J Thromb Haemost*. 2003;1(6):1150-7.
10. Kasirer-Friede A, Ware J, Leng L, Marchese P, Ruggeri ZM, Shattil SJ. Lateral clustering of platelet GP Ib-IX complexes leads to up-regulation of the adhesive function of integrin alpha IIb beta 3. *J Biol Chem*. 2002;277(14):11949-56.
11. Kahn ML. Platelet-collagen responses: molecular basis and therapeutic promise. *Semin Thromb Hemost*. 2004;30(4):419-25.
12. Hartwig JH. Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation. *J Cell Biol*. 1992;118(6):1421-42.
13. Rand ML, Leung R, Packham MA. Platelet function assays. *Transfus Apher Sci*. 2003;28(3):307-17.
14. Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM. Lipid-protein interactions in blood coagulation. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1376(3):433-53.
15. Bennett JS. Platelet-fibrinogen interactions. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;936:340-54.
16. Siegel-Axel D, Langer H, Lindemann S, Gawaz M. [Role of platelets in atherosclerosis and inflammation]. *Med Klin (Munich)*. 2006;101(6):467-75.
17. Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S. Pharmakologie und Toxikologie, Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie. Springer 2012.
18. Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth*. 2004;93(1):105-13.
19. Baldwin AL, Thurston G. Mechanics of endothelial cell architecture and vascular permeability. *Crit Rev Biomed Eng*. 2001;29(2):247-78.
20. Dejana E, Corada M, Lampugnani MG. Endothelial cell-to-cell junctions. *Faseb j*. 1995;9(10):910-8.
21. Schnittler HJ. Structural and functional aspects of intercellular junctions in vascular endothelium. *Basic Res Cardiol*. 1998;93 Suppl 3:30-9.
22. Sawada N, Murata M, Kikuchi K, Osanai M, Tobioka H, Kojima T, et al. Tight junctions and human diseases. *Med Electron Microsc*. 2003;36(3):147-56.
23. Becker BF, Chappell D, Jacob M. Endothelial glycocalyx and coronary vascular permeability: the fringe benefit. *Basic Res Cardiol*. 2010;105(6):687-701.
24. Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. The endothelial surface layer. *Pflugers Arch*. 2000;440(5):653-66.

25. Henry CB, Duling BR. Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan. *Am J Physiol.* 1999;277(2):H508-14.
26. Vink H, Duling BR. Capillary endothelial surface layer selectively reduces plasma solute distribution volume. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278(1):H285-9.
27. Pries AR, Kuebler WM. Normal endothelium. *Handb Exp Pharmacol.* 2006(176 Pt 1):1-40.
28. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MA, oude Egbrink MG. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch.* 2007;454(3):345-59.
29. Barajas-Espinosa A, Ramiro-Diaz J, Briones-Cerecero E, Chi-Ahumada E, De la Rosa AB, Arroyo-Flores B, et al. Involvement of endothelial Man and Gal-binding lectins in sensing the flow in coronary arteries. *Front Biosci.* 2008;13:5421-31.
30. Alphonso CS, Rodseth RN. The endothelial glycocalyx: a review of the vascular barrier. *Anaesthesia.* 2014;69(7):777-84.
31. Ruegg C, Mariotti A. Vascular integrins: pleiotropic adhesion and signaling molecules in vascular homeostasis and angiogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60(6):1135-57.
32. Nieuwdorp M, Meuwese MC, Vink H, Hoekstra JB, Kastelein JJ, Stroes ES. The endothelial glycocalyx: a potential barrier between health and vascular disease. *Curr Opin Lipidol.* 2005;16(5):507-11.
33. Henry CB, Duling BR. TNF-alpha increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279(6):H2815-23.
34. Vink H, Constantinescu AA, Spaan JA. Oxidized lipoproteins degrade the endothelial surface layer : implications for platelet-endothelial cell adhesion. *Circulation.* 2000;101(13):1500-2.
35. Mulivor AW, Lipowsky HH. Inhibition of glycan shedding and leukocyte-endothelial adhesion in postcapillary venules by suppression of matrixmetalloprotease activity with doxycycline. *Microcirculation.* 2009;16(8):657-66.
36. Becker BF, Zahler S, Kupatt C, Seligmann C, Heindl B, Kowalski C. Cardiovascular actions of adenosine. Granulocyte and blood platelet adhesion in the reperfused myocardium. *Adv Exp Med Biol.* 1998;431:73-8.
37. Heindl B, Zahler S, Welsch U, Becker BF. Disparate effects of adhesion and degranulation of platelets on myocardial and coronary function in postischaemic hearts. *Cardiovasc Res.* 1998;38(2):383-94.
38. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science.* 1992;258(5090):1898-902.
39. Loscalzo J, Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis.* 1995;38(2):87-104.
40. Michelson AD, Benoit SE, Furman MI, Breckwoldt WL, Rohrer MJ, Barnard MR, et al. Effects of nitric oxide/EDRF on platelet surface glycoproteins. *Am J Physiol.* 1996;270(5 Pt 2):H1640-8.
41. Murohara T, Parkinson SJ, Waldman SA, Lefer AM. Inhibition of nitric oxide biosynthesis promotes P-selectin expression in platelets. Role of protein kinase C. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15(11):2068-75.
42. Vane JR, Botting RM. Pharmacodynamic profile of prostacyclin. *Am J Cardiol.* 1995;75(3):3a-10a.
43. Stamler JS, Vaughan DE, Loscalzo J. Synergistic disaggregation of platelets by tissue-type plasminogen activator, prostaglandin E1, and nitroglycerin. *Circ Res.* 1989;65(3):796-804.
44. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol.* 1987;92(1):181-7.
45. Marcus AJ, Safier LB, Broekman MJ, Islam N, Fliessbach JH, Hajjar KA, et al. Thrombosis and inflammation as multicellular processes: significance of cell-cell interactions. *Thromb Haemost.* 1995;74(1):213-7.
46. Esmon CT, Fukudome K. Cellular regulation of the protein C pathway. *Semin Cell Biol.* 1995;6(5):259-68.
47. Broze GJ, Jr. Tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost.* 1995;74(1):90-3.

48. Kato H. Regulation of functions of vascular wall cells by tissue factor pathway inhibitor: basic and clinical aspects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(4):539-48.
49. Jin RC, Voetsch B, Loscalzo J. Endogenous mechanisms of inhibition of platelet function. *Microcirculation.* 2005;12(3):247-58.
50. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood.* 1998;91(10):3527-61.
51. Pearson JD. Endothelial cell function and thrombosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol.* 1999;12(3):329-41.
52. Bombeli T, Mueller M, Haerberli A. Anticoagulant properties of the vascular endothelium. *Thromb Haemost.* 1997;77(3):408-23.
53. Ohanian J, Ohanian V. Sphingolipids in mammalian cell signalling. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58(14):2053-68.
54. Solving the Riddle of the Role of Sphingolipids in Cell Signaling. *J Biol Chem.* 2016;291(21):11460-1.
55. Maceyka M, Payne SG, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1585(2-3):193-201.
56. Le Stunff H, Milstien S, Spiegel S. Generation and metabolism of bioactive sphingosine-1-phosphate. *J Cell Biochem.* 2004;92(5):882-99.
57. Le Stunff H, Peterson C, Liu H, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate and lipid phosphohydrolases. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1582(1-3):8-17.
58. Zhou J, Saba JD. Identification of the first mammalian sphingosine phosphate lyase gene and its functional expression in yeast. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;242(3):502-7.
59. Pyne S, Long JS, Ktistakis NT, Pyne NJ. Lipid phosphate phosphatases and lipid phosphate signalling. *Biochem Soc Trans.* 2005;33(Pt 6):1370-4.
60. Mandala SM, Thornton R, Galve-Roperh I, Poulton S, Peterson C, Olivera A, et al. Molecular cloning and characterization of a lipid phosphohydrolase that degrades sphingosine-1-phosphate and induces cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(14):7859-64.
61. Ogawa C, Kihara A, Gokoh M, Igarashi Y. Identification and characterization of a novel human sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase, hSPP2. *J Biol Chem.* 2003;278(2):1268-72.
62. Okajima F. Plasma lipoproteins behave as carriers of extracellular sphingosine 1-phosphate: is this an atherogenic mediator or an anti-atherogenic mediator? *Biochim Biophys Acta.* 2002;1582(1-3):132-7.
63. Murata N, Sato K, Kon J, Tomura H, Yanagita M, Kuwabara A, et al. Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions. *Biochem J.* 2000;352 Pt 3:809-15.
64. Venkataraman K, Lee YM, Michaud J, Thangada S, Ai Y, Bonkovsky HL, et al. Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate. *Circ Res.* 2008;102(6):669-76.
65. Ito K, Anada Y, Tani M, Ikeda M, Sano T, Kihara A, et al. Lack of sphingosine 1-phosphate-degrading enzymes in erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;357(1):212-7.
66. Pappu R, Schwab SR, Cornelissen I, Pereira JP, Regard JB, Xu Y, et al. Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science.* 2007;316(5822):295-8.
67. Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(2):139-50.
68. El Jamal A, Bougault C, Mebarek S, Magne D, Cuvillier O, Brizuela L. The role of sphingosine 1-phosphate metabolism in bone and joint pathologies and ectopic calcification. *Bone.* 2020;130:115087.
69. Fukushima N, Ishii I, Contos JJ, Weiner JA, Chun J. Lysophospholipid receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:507-34.
70. Kluk MJ, Hla T. Signaling of sphingosine-1-phosphate via the S1P/EDG-family of G-protein-coupled receptors. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1582(1-3):72-80.

71. Chun J, Goetzl EJ, Hla T, Igarashi Y, Lynch KR, Moolenaar W, et al. International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol Rev.* 2002;54(2):265-9.
72. Hla T, Maciag T. An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem.* 1990;265(16):9308-13.
73. Zondag GC, Postma FR, Etten IV, Verlaan I, Moolenaar WH. Sphingosine 1-phosphate signalling through the G-protein-coupled receptor Edg-1. *Biochem J.* 1998;330 ( Pt 2):605-9.
74. Spiegel S, Milstien S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(5):397-407.
75. Alewijnse AE, Peters SL. Sphingolipid signalling in the cardiovascular system: good, bad or both? *Eur J Pharmacol.* 2008;585(2-3):292-302.
76. Rosen H, Gonzalez-Cabrera PJ, Sanna MG, Brown S. Sphingosine 1-phosphate receptor signaling. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:743-68.
77. Hla T. Physiological and pathological actions of sphingosine 1-phosphate. *Semin Cell Dev Biol.* 2004;15(5):513-20.
78. Kerage D, Brindley DN, Hemmings DG. Review: novel insights into the regulation of vascular tone by sphingosine 1-phosphate. *Placenta.* 2014;35 Suppl:S86-92.
79. Takuwa Y, Okamoto Y, Yoshioka K, Takuwa N. Sphingosine-1-phosphate signaling and biological activities in the cardiovascular system. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1781(9):483-8.
80. Igarashi J, Michel T. Sphingosine-1-phosphate and modulation of vascular tone. *Cardiovasc Res.* 2009;82(2):212-20.
81. Schuchardt M, Tolle M, Prufer J, van der Giet M. Pharmacological relevance and potential of sphingosine 1-phosphate in the vascular system. *Br J Pharmacol.* 2011;163(6):1140-62.
82. Hemmings DG. Signal transduction underlying the vascular effects of sphingosine 1-phosphate and sphingosylphosphorylcholine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2006;373(1):18-29.
83. Salomone S, Potts EM, Tyndall S, Ip PC, Chun J, Brinkmann V, et al. Analysis of sphingosine 1-phosphate receptors involved in constriction of isolated cerebral arteries with receptor null mice and pharmacological tools. *Br J Pharmacol.* 2008;153(1):140-7.
84. Szczepaniak WS, Pitt BR, McVerry BJ. S1P2 receptor-dependent Rho-kinase activation mediates vasoconstriction in the murine pulmonary circulation induced by sphingosine 1-phosphate. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2010;299(1):L137-45.
85. Lee MJ, Thangada S, Claffey KP, Ancellin N, Liu CH, Kluk M, et al. Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell.* 1999;99(3):301-12.
86. Lee JF, Zeng Q, Ozaki H, Wang L, Hand AR, Hla T, et al. Dual roles of tight junction-associated protein, zonula occludens-1, in sphingosine 1-phosphate-mediated endothelial chemotaxis and barrier integrity. *J Biol Chem.* 2006;281(39):29190-200.
87. Garcia JG, Liu F, Verin AD, Birukova A, Dechert MA, Gerthoffer WT, et al. Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *J Clin Invest.* 2001;108(5):689-701.
88. Peng X, Hassoun PM, Sammani S, McVerry BJ, Burne MJ, Rabb H, et al. Protective effects of sphingosine 1-phosphate in murine endotoxin-induced inflammatory lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;169(11):1245-51.
89. Sammani S, Moreno-Vinasco L, Mirzapioazova T, Singleton PA, Chiang ET, Evenoski CL, et al. Differential effects of sphingosine 1-phosphate receptors on airway and vascular barrier function in the murine lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010;43(4):394-402.
90. Sanchez T, Estrada-Hernandez T, Paik JH, Wu MT, Venkataraman K, Brinkmann V, et al. Phosphorylation and action of the immunomodulator FTY720 inhibits vascular endothelial cell growth factor-induced vascular permeability. *J Biol Chem.* 2003;278(47):47281-90.

91. Sanna MG, Wang SK, Gonzalez-Cabrera PJ, Don A, Marsolais D, Matheu MP, et al. Enhancement of capillary leakage and restoration of lymphocyte egress by a chiral S1P1 antagonist in vivo. *Nat Chem Biol*. 2006;2(8):434-41.
92. Shikata Y, Birukov KG, Garcia JG. S1P induces FA remodeling in human pulmonary endothelial cells: role of Rac, GIT1, FAK, and paxillin. *J Appl Physiol* (1985). 2003;94(3):1193-203.
93. Spindler V, Schlegel N, Waschke J. Role of GTPases in control of microvascular permeability. *Cardiovasc Res*. 2010;87(2):243-53.
94. Arikawa K, Takuwa N, Yamaguchi H, Sugimoto N, Kitayama J, Nagawa H, et al. Ligand-dependent inhibition of B16 melanoma cell migration and invasion via endogenous S1P2 G protein-coupled receptor. Requirement of inhibition of cellular RAC activity. *J Biol Chem*. 2003;278(35):32841-51.
95. Paik JH, Chae S, Lee MJ, Thangada S, Hla T. Sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cell migration requires the expression of EDG-1 and EDG-3 receptors and Rho-dependent activation of alpha vbeta3- and beta1-containing integrins. *J Biol Chem*. 2001;276(15):11830-7.
96. Ridley AJ. Rho GTPase signalling in cell migration. *Curr Opin Cell Biol*. 2015;36:103-12.
97. Inoki I, Takuwa N, Sugimoto N, Yoshioka K, Takata S, Kaneko S, et al. Negative regulation of endothelial morphogenesis and angiogenesis by S1P2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;346(1):293-300.
98. Tauseef M, Kini V, Knezevic N, Brannan M, Ramchandaran R, Fyrst H, et al. Activation of sphingosine kinase-1 reverses the increase in lung vascular permeability through sphingosine-1-phosphate receptor signaling in endothelial cells. *Circ Res*. 2008;103(10):1164-72.
99. Hait NC, Oskeritzian CA, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1758(12):2016-26.
100. Ledgerwood LG, Lal G, Zhang N, Garin A, Esses SJ, Ginhoux F, et al. The sphingosine 1-phosphate receptor 1 causes tissue retention by inhibiting the entry of peripheral tissue T lymphocytes into afferent lymphatics. *Nat Immunol*. 2008;9(1):42-53.
101. Leeuwenberg JF, Smeets EF, Neefjes JJ, Shaffer MA, Cinek T, Jeunhomme TM, et al. E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro. *Immunology*. 1992;77(4):543-9.
102. Gotsch U, Jager U, Dominis M, Vestweber D. Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF-alpha in vivo. *Cell Adhes Commun*. 1994;2(1):7-14.
103. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol*. 2008;214(2):149-60.
104. Galvani S, Sanson M, Blaho VA, Swendeman SL, Obinata H, Conger H, et al. HDL-bound sphingosine 1-phosphate acts as a biased agonist for the endothelial cell receptor S1P1 to limit vascular inflammation. *Sci Signal*. 2015;8(389):ra79.
105. Stone ML, Sharma AK, Zhao Y, Charles EJ, Huerter ME, Johnston WF, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor 1 agonism attenuates lung ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015;308(12):L1245-52.
106. Bolick DT, Srinivasan S, Kim KW, Hatley ME, Clemens JJ, Whetzel A, et al. Sphingosine-1-phosphate prevents tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated monocyte adhesion to aortic endothelium in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(5):976-81.
107. Whetzel AM, Bolick DT, Srinivasan S, Macdonald TL, Morris MA, Ley K, et al. Sphingosine-1-phosphate prevents monocyte/endothelial interactions in type 1 diabetic NOD mice through activation of the S1P1 receptor. *Circ Res*. 2006;99(7):731-9.
108. Kimura T, Tomura H, Mogi C, Kuwabara A, Damirin A, Ishizuka T, et al. Role of scavenger receptor class B type I and sphingosine 1-phosphate receptors in high density lipoprotein-induced inhibition of adhesion molecule expression in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2006;281(49):37457-67.
109. Zhang G, Yang L, Kim GS, Ryan K, Lu S, O'Donnell RK, et al. Critical role of sphingosine-1-phosphate receptor 2 (S1PR2) in acute vascular inflammation. *Blood*. 2013;122(3):443-55.
110. Matsushita K, Morrell CN, Lowenstein CJ. Sphingosine 1-phosphate activates Weibel-Palade body exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(31):11483-7.

111. van Hooren KW, Spijkers LJ, van Breevoort D, Fernandez-Borja M, Bierings R, van Buul JD, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor 3 mediates sphingosine-1-phosphate induced release of weibel-palade bodies from endothelial cells. *PLoS One*. 2014;9(3):e91346.
112. Nussbaum C, Bannenberg S, Keul P, Graler MH, Goncalves-de-Albuquerque CF, Korhonen H, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor 3 promotes leukocyte rolling by mobilizing endothelial P-selectin. *Nat Commun*. 2015;6:6416.
113. Sattler K, Levkau B. Sphingosine-1-phosphate as a mediator of high-density lipoprotein effects in cardiovascular protection. *Cardiovasc Res*. 2009;82(2):201-11.
114. Kroll MH, Hellums JD, McIntire LV, Schafer AI, Moake JL. Platelets and shear stress. *Blood*. 1996;88(5):1525-41.
115. Il-Biosystems: Live Cell Imaging unter Flussbedingungen [updated 09.07.2020]; <https://il-biosystems.com/de/produkte/mikrobiologie/59/bioflux-200>.
116. Coenen DM, Mastenbroek TG, Cosemans J. Platelet interaction with activated endothelium: mechanistic insights from microfluidics. *Blood*. 2017;130(26):2819-28.
117. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest*. 1973;52(11):2745-56.
118. Sugama Y, Tiruppathi C, offakidevi K, Andersen TT, Fenton JW, 2nd, Malik AB. Thrombin-induced expression of endothelial P-selectin and intercellular adhesion molecule-1: a mechanism for stabilizing neutrophil adhesion. *J Cell Biol*. 1992;119(4):935-44.
119. Urtz N, Gaertner F, von Bruehl ML, Chandraratne S, Rahimi F, Zhang L, et al. Sphingosine 1-Phosphate Produced by Sphingosine Kinase 2 Intrinsically Controls Platelet Aggregation In Vitro and In Vivo. *Circ Res*. 2015;117(4):376-87.
120. Nugent D, Xu Y. Sphingosine-1-phosphate: characterization of its inhibition of platelet aggregation. *Platelets*. 2000;11(4):226-32.
121. Hsia K, Yang MJ, Chen WM, Yao CL, Lin CH, Loong CC, et al. Sphingosine-1-phosphate improves endothelialization with reduction of thrombosis in recellularized human umbilical vein graft by inhibiting syndecan-1 shedding in vitro. *Acta Biomater*. 2017;51:341-50.
122. Komarova YA, Mehta D, Malik AB. Dual regulation of endothelial junctional permeability. *Sci STKE*. 2007;2007(412):re8.
123. Wang L, Dudek SM. Regulation of vascular permeability by sphingosine 1-phosphate. *Microvasc Res*. 2009;77(1):39-45.
124. Tseng CN, Chang YT, Yen CY, Lengquist M, Kronqvist M, Eriksson EE, et al. Early Inhibition of P-Selectin/P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 Reduces Intimal Hyperplasia in Murine Vein Grafts through Platelet Adhesion. *Thromb Haemost*. 2019;119(12):2014-24.
125. Galbusera M, Buelli S, Gastoldi S, Macconi D, Angioletti S, Testa C, et al. Activation of porcine endothelium in response to xenogeneic serum causes thrombosis independently of platelet activation. *Xenotransplantation*. 2005;12(2):110-20.
126. Weller A, Isenmann S, Vestweber D. Cloning of the mouse endothelial selectins. Expression of both E- and P-selectin is inducible by tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem*. 1992;267(21):15176-83.
127. Hattori R, Hamilton KK, Fugate RD, McEver RP, Sims PJ. Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. *J Biol Chem*. 1989;264(14):7768-71.
128. Geng JG, Bevilacqua MP, Moore KL, McIntyre TM, Prescott SM, Kim JM, et al. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature*. 1990;343(6260):757-60.
129. Minter AJ, Dawes J, Chesterman CN. Effects of heparin and endothelial cell growth supplement on haemostatic functions of vascular endothelium. *Thromb Haemost*. 1992;67(6):718-23.

130. Kameda H, Morita I, Handa M, Kaburaki J, Yoshida T, Mimori T, et al. Re-expression of functional P-selectin molecules on the endothelial cell surface by repeated stimulation with thrombin. *Br J Haematol.* 1997;97(2):348-55.
131. van Mourik JA, Romani de Wit T, Voorberg J. Biogenesis and exocytosis of Weibel-Palade bodies. *Histochem Cell Biol.* 2002;117(2):113-22.
132. Chang HY, Yazdani A, Li X, Douglas KAA, Mantzoros CS, Karniadakis GE. Quantifying Platelet Margination in Diabetic Blood Flow. *Biophys J.* 2018;115(7):1371-82.
133. Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(16):7450-4.
134. Frenette PS, Moyna C, Hartwell DW, Lowe JB, Hynes RO, Wagner DD. Platelet-endothelial interactions in inflamed mesenteric venules. *Blood.* 1998;91(4):1318-24.
135. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Reininger A, Adelsberger H, Gebhardt A, et al. Vitronectin receptor (alpha(v)beta3) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction. *Circulation.* 1997;96(6):1809-18.
136. Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alpha(v)beta3 integrin, and GPIbalpha. *J Exp Med.* 1998;187(3):329-39.
137. Khandoga A, Biberthaler P, Enders G, Teupser D, Axmann S, Luchting B, et al. P-selectin mediates platelet-endothelial cell interactions and reperfusion injury in the mouse liver in vivo. *Shock.* 2002;18(6):529-35.
138. Kappos L, Antel J, Comi G, Montalban X, O'Connor P, Polman CH, et al. Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2006;355(11):1124-40.

## **Danksagung**

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Hohlfeld für die Überlassung des interessanten Themas und die stete Unterstützung bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Malte Kelm für die Möglichkeit in seinem Labor forschen und die Dissertation entwickeln zu dürfen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Amin Polzin für die ausgezeichnete Betreuung. Danke für die Aufnahme in Ihre tolle Arbeitsgruppe, für das stets offene Ohr und das in mich gesetzte Vertrauen.

Dieser besonderen AG möchte ich nicht nur für die unvergleichbar schöne Zeit im Labor, sondern auch während der zahlreichen Feste danken.

Frau Dr. Lisa Dannenberg danke ich für ihre unermüdliche Motivation.

Mein größter Dank gilt meiner Familie:

Anne und Baba, die mich immer bedingungslos unterstützten und hinter meinen Entscheidungen standen. Meinen Geschwistern: Hasan und Sandra, Hüseyin und Sultan, Fatma und Yusuf, Meryem und Vural, Mustafa und Senay, Müzeyyen und Yalcin, die mir immer Rückhalt gaben. Ebenso danke ich Heide und Wolfgang für ihren motivierenden Beistand.

Zu guter Letzt meinem Mann Sven für seine liebevolle Nachsicht und seine unendliche Geduld. Du und unsere Tochter Mira seid das Beste, was mir passieren konnte.