

Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie

Zentrum für Experimentelle Medizin

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Die Rolle von Sphingosin-1-phosphat und Sphingosin-1-phosphat Rezeptor 3 bei der Restenose

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

eingereicht an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Chemie

der Universität Hamburg

vorgelegt

von

Mirjam von Lucadou

Hamburg, 2023

Erstgutachter: Prof. Dr. Elke Oetjen

Zweitgutachter: Prof. Dr. Edzard Schwedhelm

Prüfungskommissionsmitglieder:

Prof. Dr. Elke Oetjen

Prof. Dr. Edzard Schwedhelm

Prof. Dr. Viacheslav Nikolaev

Prof. Dr. Louisa Temme

Dr. Thomas Hackl

Datum der Disputation: 27.10.2023

Datum der Druckfreigabe: 07.11.2023

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum Januar 2019 bis Juni 2023 im Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

I. Publikationsliste

Daum G, Winkler M, Moritz E, Müller T, Geffken M, **von Lucadou M**, Haddad M, Peine S, Böger RH, Larena-Avellaneda A, Debus ES, Gräler M, Schwedhelm E. (2020) Determinants of Serum- and Plasma Sphingosine-1-Phosphate Concentrations in a Healthy Study Group. *TH Open*. 2020 Jan 23;4(1): e12-e19. doi: 10.1055/s-0040-1701205

Chinedu Ulrich Ebenebe, **Mirjam von Lucadou**, Eileen Moritz, Edzard Schwedhelm, Guenter Daum, Dominique Singer, Phillip Deindl, Martin Sebastian Winkler (2021). Reference ranges for sphingosine-1-phosphate in neonates. *J Perinat Med*. 2021 Apr 15;49(7):932-935. doi: 10.1515/jpm-2020-0536.

Schwedhelm E, Englisch C, Niemann L, Lezius S, **von Lucadou M**, Marmann K, Böger R, Peine S, Daum G, Gerloff C, Choe CU (2021). Sphingosine-1-Phosphate, Motor Severity, and Progression in Parkinson's Disease (MARK-PD). *Mov Disord*. 2021 Sep;36(9):2178-2182. doi: 10.1002/mds.28652.

Schwedhelm E, **von Lucadou M**, Peine S, Lezius S, Thomalla G, Böger R, Gerloff C, Choe CU (2021). Trimethyllysine, vascular risk factors and outcome in acute ischemic stroke (MARK-STROKE). *Amino Acids*. 2021 Apr;53(4):555-561. doi: 10.1007/s00726-021-02969-x.

Schwedhelm E, Schwieren L, Tiedt S, **von Lucadou M**, Gloyer NO, Böger R, Magnus T, Daum G, Thomalla G, Gerloff C, Choe CU (2021). Serum Sphingosine-1-Phosphate Levels Are Associated With Severity and Outcome in Patients With Cerebral Ischemia. *Stroke*. 2021 Dec;52(12):3901-3907. doi: 10.1161/STROKEAHA.120.033414.

Erik Holzwirth, Tina Fischer-Schaepmann, Danilo Obradovic, **Mirjam von Lucadou**, Edzard Schwedhelm, Günter Daum, Gerhard Hindricks, Gunther Marsche, Markus Trieb, Holger Thiele, Jelena Kornej, Petra Büttner (2022). Anti-inflammatory HDL effects are impaired in atrial fibrillation. *Heart Vessels*. 2022 Jan;37(1):161-171. doi: 10.1007/s00380-021-01908-w.

II. Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Abstract	3
3	Einleitung	4
3.1	Pathogenese der arteriellen Stenose und Restenose	4
3.2	Sphingosin-1-phosphat (S1P)	12
3.3	Sphingosin-1-phosphat Rezeptoren	16
3.3.1	Sphingosin-1-phosphat Rezeptor 1 (S1PR1)	17
3.3.2	Sphingosin-1-phosphat Rezeptor 2 (S1PR2)	19
3.3.3	Sphingosin-1-phosphat Rezeptor 3 (S1PR3)	19
3.4	Fragestellung	22
4	Material und Methoden	24
4.1	Mausmodell	24
4.1.1	Sphingosin-1-phosphat Rezeptor 3 Mäuse	24
4.1.2	Klemmen der abdominalen Aorta	25
4.1.3	Sektion der abdominalen Aorta	26
4.2	Histologie	27
4.2.1	Einbettung und Schneiden der Gewebe	27
4.2.2	Elastika-van-Gieson Färbung	28
4.2.3	Morphometrische Analyse	28
4.3	Messungen der Genexpression mittels qPCR	29
4.3.1	RNA-Isolierung	29
4.3.2	Messung der RNA-Konzentration	30
4.3.3	cDNA-Synthese	31
4.3.4	Quantitative Echtzeit-Polymerasenkettenreaktion	31
4.3.5	Datenanalyse der qPCR	33
4.4	Analyse von Genexpressionen mittels Mikroarray	33
4.4.1	Mikroarray Analyse	33
4.4.2	Auswertung der Array Chip Daten	34
4.5	Studiendesign und Auswahl der Subgruppe	34
4.6	Bestimmung der S1P-Konzentration	35
4.6.1	Kalibrierung und Probenaufarbeitung	35
4.6.2	Messung mit der Flüssigkeitschromatographie / Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)	35

4.6.3	Auswertung.....	36
4.7	Bestimmung der Zytokine der Subgruppe	37
4.8	Statistische Analyse.....	38
5	Ergebnisse	39
5.1	<i>S1pr3+/+</i> Mäuse entwickeln größere Läsionen als <i>S1pr3-/-</i> Mäuse	39
5.2	Genexpression in der abdominalen Aorta zu verschiedenen Zeitpunkten	41
5.2.1	Expression der S1P-Rezeptoren und der Sphingosinkinase 1.....	42
5.2.2	Verletzung der abdominalen Aorta führte zum Verlust vom SMC-Zellmarker.....	45
5.2.3	Expression des Stammzellmarkers <i>Sca-1</i> und des Makrophagen/Monozyten Markers <i>Cd68</i> 46	
5.2.4	Expression von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen	48
5.2.5	Expression der Thrombinrezeptoren (<i>Par2</i> , <i>Par4</i>)	53
5.2.6	Expression des CREB-regulierten transkriptionellen Coaktivators 1 (<i>Crtc1</i>).....	54
5.3	Analyse einer Patientenkohorte in einer epidemiologischen, prospektiven Kohortenstudie.....	56
5.3.1	Charakterisierung der Subgruppe	56
5.3.2	Vergleich der prä- und postoperativen S1P Konzentration	57
5.3.3	Vergleich der prä- und postoperativen Zytokinspiegel.....	57
5.3.4	Korrelationsanalyse des Plasma-S1P mit den gemessenen Zytokinen	58
6	Diskussion	60
6.1	Mausmodelle für eine Intimahyperplasie	60
6.2	<i>S1pr3-/-</i> Mäuse entwickeln weniger Läsionen als <i>S1pr3+/+</i> Mäuse nach Verletzung der abdominalen Aorta	61
6.3	Verletzung der abdominalen Aorta verursacht Veränderung in der Expression von Genen	63
6.3.1	Signifikante Unterschiede der <i>S1pr2</i> - und <i>Sphk1</i> -Expression zwischen <i>S1pr3+/+</i> und <i>S1pr3-/-</i> <i>an Tag 21</i>	64
6.3.2	Veränderte Expression von Zellmarkern.....	67
6.3.3	Induktion von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen.....	69
6.3.4	Veränderte Expression der Thrombinrezeptoren	72
6.3.5	Reduzierte Expression des Transkriptionsfaktors <i>Crtc1</i> nach Verletzung.....	73
6.4	S1P und Zytokin-Konzentrationen in Gefäßpatienten	73
6.5	Plasma-S1P Spiegel korrelieren mit <i>IL1B</i> Konzentrationen	75
6.6	Fazit	76
7	Ausblick	78
8	Literaturverzeichnis	79

9	Anhang	99
9.1	Material	99
9.1.1	Lösungen und Substanzen	99
9.1.2	Primer	100
9.1.3	Verbrauchsmaterialien und Kits	101
9.1.4	Laborgeräte und chirurgische Materialien	103
9.1.5	Software	104
9.2	Auflistung der verwendeten Gefahrenstoffe nach GHS	105
9.3	Abbildungsverzeichnis	112
9.4	Tabellenverzeichnis	115
10	Danksagung	116
11	Eidesstattliche Versicherung	118

III. Abkürzungsverzeichnis

ABC-Transporter	ATP-binding cassette-Transporter
AcN	Acetonitril
ApoM	Apolipoprotein M
Aqua dest	destilliertes Wasser
BMS	Bare Metal Stent
BSA	Albumin aus Rinderserum
CaMK	Ca ²⁺ -Calmodulin abhängige Proteinkinase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Ccl2	CC-Chemokin-Ligand-2
Cd68	Cluster of Differentiation 68
cDNA	komplementären Desoxyribonukleinsäure
CREB	cAMP-response element binding protein
CRTC	CREB-regulierte transkriptionelle-Coaktivatoren
CS	Carotis Stenose
Ct	cycle threshold
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DCA	direktionale koronare Atherektomie
DCB	Drug Coated Ballons
DES	Drug-eluting stent
EC	Endothelzellen
ECM	extrazelluläre Matrix
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
Erk	extracellular signal-regulated kinase
ERK	extracellular-signal regulated Kinase
ESI+	positive Elektrospray-Ionisation
EtOH	Ethanol
EvG-Färbung	Elastica van Gieson Färbung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
Gdf15	Growth Differentiation Faktor 15
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
HDL	High Density Lipoprotein
ICAM	intrazelluläres Zelladhäsionsmolekül
ICE	IL-1 β -converting-Enzym

IFN- γ	Interferon- γ
Il10	Interleukin-10
Il1b	Interleukin-1 β
ISR	In-stent-Restenosen
KHK	koronare Herzkrankheit
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie-Tantem-Massenspektrometrie
LDL	Low Density Lipoprotein
LEC	lymphatische Endothelzellen
LEE	Lamina elastica externa
LEI	Lamina elastica interna
MCP-1	monozytochemotaktisches Protein-1
MIC-1	Makrophagen inhibitorisches Zyokin-1
MMPs	Matrixmetalloproteinasen
MS	Multiple Sklerose
Myh11	Myosin Heavy Chain
NF κ B	nukleärer Faktor Kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
OD	optische Dichte
oxLDL	oxidiertes Low Density Lipoprotein
Par	Protease-Activated Rezeptor
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCI	perkutane koronare Intervention
PDGF	Plättchenwachstumsfaktor, Platelet-derived growth factor
PI3K	Phosphoinositid 3-kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC β	Phospholipase C
PTCA	perkutane transluminale koronare Angioplastie
PTEN	Phosphatase-und-Tensin-Homolog
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK	Rho Kinase
RT-qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerasenkettenreaktion
S1P	Sphingosin-1-phosphat
S1PR	S1P Rezeptoren
SAPK	Stress Activated Protein kinase

Sca1	Stammzell Antigen
SEM	Standardfehler
SMA	α -Smooth Muscle Actin
SMC	Smooth Muscle Cell
SMMHC	Smooth Muscle Myosin Heavy Chain
SPHK	Sphingosinkinase
spns2	Spinster Homolog 2
SRF	Serum Response Factor
TFG-b	transformierender Wachstumsfaktor-b
TGF- β	Transforming Growth Faktor- β
TNF α	Tumornekrosefaktor-alpha
VCAM-1	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1
VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A
VGCC	voltage gated calcium channel
WT	Wildtyp

1 Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind seit Jahrzehnten eine der häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt. Die Haupttodesursache der kardiovaskulären Erkrankungen ist die Atherosklerose. Durch die Atherosklerose kommt es zu meist arteriellen Gefäßverengungen (Stenosen), die sich thrombotisch komplett verschließen können. Trotz guter interventioneller Behandlungsmöglichkeiten der Stenosen, z.B. durch Stentimplantation oder Bypassoperationen, ist die Restenose durch die Bildung einer Intimahyperplasie immer noch eine häufige Komplikation und ein ungelöstes klinisches Problem.

Im ersten Teil dieser Arbeit werden die Ergebnisse aus einem Verletzungsmodell der abdominalen Aorta zur Restenosen bei Wildtyp (*S1pr3+/+*) und Sphingosine-1-phosphat Rezeptor 3- defizienten (*S1pr3-/-*) Mäusen präsentiert. Durch das mehrfache temporäre Abklemmen der abdominalen Aorta wird die Bildung einer Intima mit Zellhyperplasie induziert. Die histologischen Untersuchungen zeigten, dass *S1pr3+/+* Mäuse größere Läsionen im Vergleich zu den *S1pr3-/-* Mäusen bilden, was darauf hinweist, dass dieser Rezeptor eine Rolle bei der Bildung der Intimahyperplasie spielt. Um zu untersuchen, welchen Einfluss der S1PR3 auf die Genregulation nach der Verletzung hat, wurden zu mehreren Zeitpunkten (4, 7, 14 und 21 Tagen nach der Verletzung) die Expression verschiedener Gene mittels RT-qPCR in der Adventitia und der Intima-Media der *S1pr3+/+* und *S1pr3-/-* Mäusen quantifiziert. Es zeigte sich, dass Unterschiede bei der Genexpression von *S1pr2*, *Sphk1* und *Il1b* zwischen den beiden Genotypen bestehen. *S1pr2* und *Sphk1* wird an Tag 21 vermehrt in *S1pr3-/-* Mäusen exprimiert und *Il1b* an Tag 7 stärker in *S1pr3+/+* exprimiert.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden in Blutproben von Patienten mit einer Stenose der A. carotis oder einer pAVK die Konzentration von S1P und den Zytokinen (*IL1B*, *IL10* und *CCL2*) vor und nach einer chirurgischen Gefäßintervention gemessen, um zu untersuchen, ob es einen Zusammenhang zwischen den S1P- und den Zytokinkonzentrationen gibt. Es zeigte sich, dass die S1P Konzentration bei den Patienten nach der chirurgischen Intervention sinkt. Zusätzlich sieht man, dass es eine Korrelation zwischen der postoperativen Plasma-S1P und der postoperativen *IL1B* Konzentration gibt.

Unsere am Mausmodell erhobenen Daten und die Daten der Patienten-Blutproben geben einen Hinweis darauf, dass *Il1b* eine wichtige Rolle bei der Stenose- bzw. Restenosebildung

Zusammenfassung

spielen kann. Inwieweit S1P und sein Rezeptor S1PR3 eine Rolle im Zusammenhang mit IL1B bei der Entstehung der Atherosklerose bzw. deren Restenose spielt, müsste in weiteren Experimenten untersucht werden.

2 Abstract

Cardiovascular disease has been one of the leading causes of death in the Western world for decades. The main cause of death for cardiovascular diseases are atherosclerosis. The circulatory disorders are caused by vascular stenosis, which can also lead to complete occlusion. Despite good interventional treatment options of stenosis, e.g. by stent implantation or bypass surgery, restenosis due to the formation of intimal hyperplasia is still a frequent complication and a major clinical problem.

The first part of this work focuses on an injury model of the abdominal aorta in *S1pr3+/+* and *S1pr3-/-* mice. Multiple intermittent clamping of the abdominal aorta induced the formation of intimal hyperplasia, probably by removal of the endothelium. The *S1pr3+/+* and *S1pr3-/-* mice form different degrees of intimal hyperplasia, indicating that this receptor plays a role in the formation of intimal hyperplasia. Histological examination revealed that *S1pr3+/+* mice formed larger lesions compared to *S1pr3-/-* mice. To investigate the influence of S1PR3 on gene regulation after injury, *S1pr3+/+* and *S1pr3-/-* were injured and the expression of various genes was examined by RT-qPCR at several time points (4, 7, 14, and 21 days after injury). It was found that there are significant differences in the expression of *S1pr2*, *Sphk1*, and *Il1b* between the two mouse geno-types.

In the second part of this work, S1P levels and certain levels of certain cytokines (*IL1B*, *IL10* and *CCL2*) were measured in human blood samples taken from patients with carotid stenosis or PAD to investigate the relationship between S1P levels and cytokine concentrations. It was found that S1P concentrations generally decrease in patients after the intervention to restore blood flow. Moreover, there is an association between postoperative plasma S1P and postoperative *IL1B* concentrations.

Our data collected from the mouse model and the human blood samples suggest that *IL1B* plays an important role in stenosis and restenosis, respectively. The extent to which S1P and its receptor S1PR3 may regulate *IL1B* production thereby impacting the progression of atherosclerosis or restenosis, needs to be further investigated.

3 Einleitung

3.1 Pathogenese der arteriellen Stenose und Restenose

Kardiovaskuläre Erkrankungen nehmen seit Jahrzehnten in Deutschland den ersten Platz der Todesursachenstatistik ein. 2012 waren sie bei Frauen für 43,9% und bei Männern für 36,1% der Sterbefälle verantwortlich [1]. Unter kardiovaskulären Erkrankungen fasst man eine Gruppe von Erkrankungen zusammen, deren gemeinsame Ursache hauptsächlich eine Durchblutungsstörung im Bereich der arteriellen Gefäße ist. Im weiteren Sinne erfasst der Begriff der kardiovaskulären Erkrankungen jedoch auch nicht degenerative Erkrankungen wie Endokarditis, Myokarditis, Perikarditis, Herzklappenfehler, Aneurysmen und Herzrhythmusstörungen [2]. Die Durchblutungsstörungen werden durch akute oder chronische Gefäßverengungen, welche zum kompletten Gefäßverschluss (Stenosen) führen können, bewirkt. Der größte Anteil der Gefäßstenosen ist durch die Atherosklerose bedingt [3]. Die wichtigsten kardiovaskulären Erkrankungen sind dabei die koronare Herzkrankheit (KHK) und in deren Folge Herzinfarkt und Herzinsuffizienz, der Schlaganfall und die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) [1].

Neben genetischen und umweltbedingten Risikofaktoren sind erhöhte LDL-Cholesterinwerte im Blut und erhöhter Blutdruck die wesentlichen Faktoren für die Entwicklung der Atherosklerose [4].

Die Blutgefäße bestehen aus drei Schichten: Intima, Media und Adventitia (Abbildung 1). Die Intima ist die innerste Schicht der Arterie. Sie besteht in erster Linie aus einer Schicht von Endothelzellen, die die Arterienwand auskleiden, und einer subendothelialen Schicht, die vor allem aus glatten Muskelzellen und Kollagen besteht. Die Media ist die mittlere Schicht der Arterie und besteht aus einem komplexen Netzwerk aus glatten Muskelzellen, Elastin und Kollagen. Die Media ist von der Intima und der Adventitia durch die innere bzw. äußere elastische Lamina getrennt. Die Adventitia ist die äußerste Schicht der Arterie und besteht hauptsächlich aus Fibroblasten, Mastzellen, Kollagenfasern und den Vasa vasorum. Das Kollagen trägt wesentlich zur Stabilität und Festigkeit der Arterienwand bei [5], [6].

Einleitung

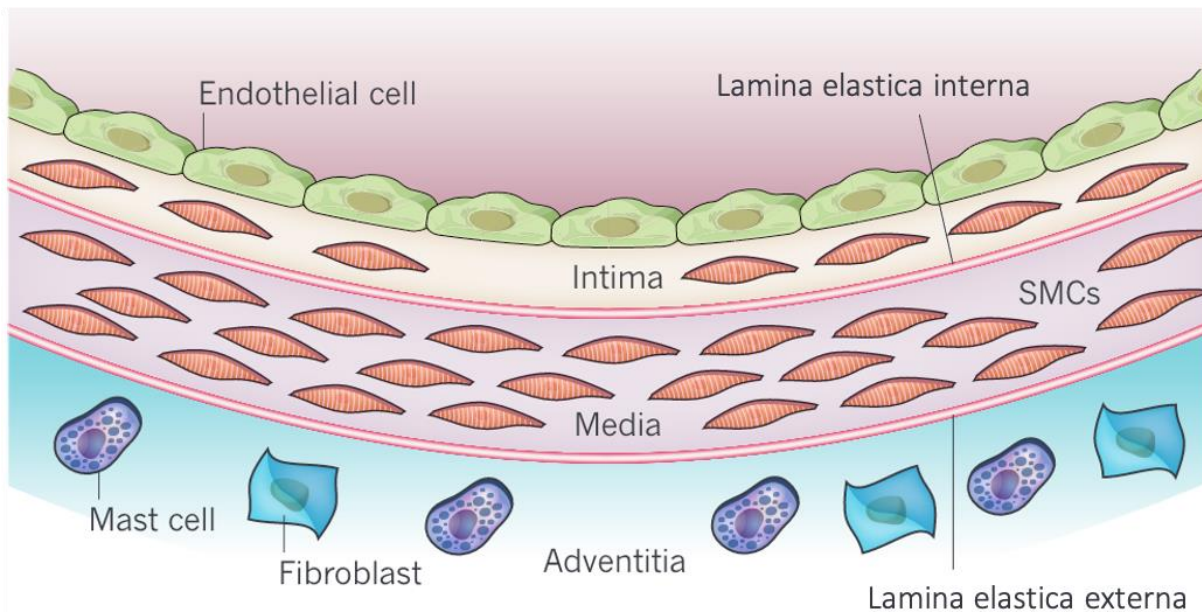


Abbildung 1 Anatomischer Aufbau einer gesunden Arterie; Die innerste Schicht ist die Intima mit einer Schicht von Endothelzellen, die mittlere Schicht ist die Media, die vor allem aus glatten Muskelzellen (SMCs) besteht und die äußerste Schicht ist die Adventitia. Die Lamina elastica interna und externa trennt die Media von der Intima bzw. Adventitia ab; modifiziert nach Libby et al. 2011 [6]

Atherosklerotische Läsionen werden laut der „*Response-to-injury*“ Hypothese, welche 1976 von Russell Ross aufgestellt wurde, durch eine Verletzung der inneren Arterienwandschicht (Intima) ausgelöst [7]. Neuere Theorien sprechen von einer endothelialen Dysfunktion als Ursache für die Auslösung der Atherosklerose [8]. Die Pathogenese der Atherosklerose scheint komplex und ist auch weiterhin Gegenstand derzeitiger Forschung.

Die atherosklerotischen Gefäßveränderungen erscheinen häufig als asymmetrische Verdickungen der innersten Schicht der Arterie, der Intima. Sie bestehen aus Schaumzellen, die eine Ansammlung von lipidhaltigen Zellen (Makrophagen und Smooth Muscle Cells, SMC) darstellen, Bindegewebelementen, Lipiden, Calciumphosphat, Hydroxylapatit und Zelldetritus. Ein wichtiger Teil der Plaque sind Entzündungs- und Immunzellen aus dem Blut, der Rest sind Endothel- und glatte Muskelzellen [9].

Die atherosklerotische Läsion beginnt durch aktivierte und funktionsgestörte Endothelzellen (Endotheliale Dysfunktion). Aktivierte Endothelzellen exprimieren vermehrt Adhäsionsmoleküle, insbesondere das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1). Dadurch können sich Leukozyten, vor allem Monozyten und T-Lymphozyten, an das Endothel binden [10]. Die Einwanderung von Leukozyten in die Arterienwand wird durch chemoattraktive Substanzen wie das monozytochemotaktische Protein-1 (MCP-1) vermittelt [11]. Eine

Einleitung

Verringerung der Endothelpermeabilität und einer Veränderung der extrazellulären Matrix beispielsweise durch Expression von Proteasen fördern den Eintritt und die Einlagerung cholesterinhaltiger Low Density Lipoprotein (LDL)-Partikel in die Arterienwand [6]. Das LDL wird durch Oxidation zu oxidiertem LDL (oxLDL) und führt zu zytotoxischen, proinflammatorischen, chemotaktischen und proatherogenen Reaktionen in der Intima [3], [9]. Makrophagen wie auch SMC phagozytieren oxLDL und werden zu Schaumzellen [12]. Die atherogenen Lipoproteine werden weiter aus der Intima entfernt, bis die Schaumzellen anfangen abzusterben, und das Lipid als weicher, destabilisierter und atheromatöser Kern („*fatty streak*“) in dem Plaque zurückgelassen wird [3]. Die Umwandlung von einem relativ einfachen „*fatty streak*“ zu einer komplexen Läsion ist durch die Einwanderung der glatten Muskelzellen von der Media über die innere elastische Lamina zur Intima charakterisiert [4]. Die lipidreichen Makrophagen induzieren die Genexpression von verschiedenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen, die die Monozyten-, glatten Muskelzell- und Endothelproliferation fördern. Die glatten Muskelzellen bilden mit den Makrophagen, T-Zellen und einer Bindegewebsmatrix aus Kollagenfibrillen, elastischen Fasern und Proteoglykanen eine fibrös-lipidreiche Läsion. Die glatten Muskelzellen migrieren und proliferieren weiter in die Intima und bilden einen festen fibrotischen Plaque [13].

Einleitung

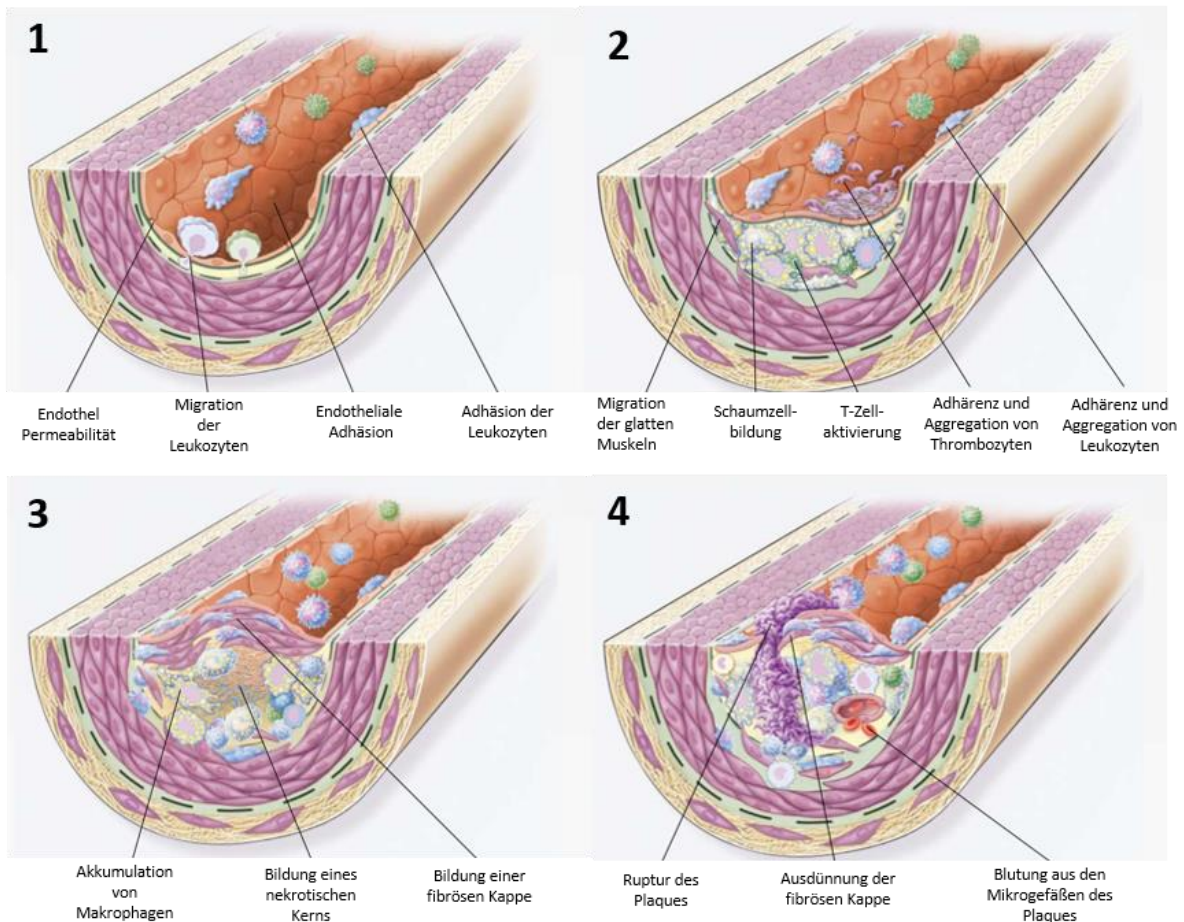


Abbildung 2 Entwicklung einer atherosklerotischen Plaque; 1: Die ersten Veränderungen, die der zur Bildung von Atherosklerose führen, finden im Endothel statt. Zu diesen Veränderungen gehört eine erhöhte endotheliale Permeabilität für Lipoproteine, die Hochregulierung von Leukozyten- und Endothel-Adhäsionsmolekülen und die Migration von Leukozyten in die Arterienwand; 2: Die „fatty streaks“ bestehen zunächst aus lipidbeladenen Monozyten und Makrophagen zusammen mit T-Lymphozyten. Später erfolgt dann die Migration von glatten Muskelzellen; 3: Die „fatty streaks“ bilden eine fibröse Kappe, die die Läsion vom Lumen abgrenzt. Die fibröse Kappe umgibt eine Mischung aus Leukozyten, Lipiden und Debris, die einen nekrotischen Kern bilden können; 4: Eine Ruptur der fibrösen Kappe tritt in der Regel an Stellen auf an denen die fibröse Kappe ausgedünnt ist. Die Ausdünnung der fibrösen Kappe ist offenbar auf den anhaltenden Zustrom und die Aktivierung von Makrophagen zurückzuführen. Abbildung modifiziert von Ross R. [14]

Die gebildete Plaque kann zu einer stabilen Plaque werden, die eine dicke fibrotische Kappe, einen geringen Lipidanteil und ein gleichbleibendes Lumen aufweist. Im Gegensatz dazu gibt es instabile Plaques, die sich durch eine dünne fibrotische Kappe, einen hohen Lipidanteil und eine hohe Anzahl an proinflammatorischen Zellen auszeichnen. Durch die vorherrschenden entzündlichen Bedingungen und Risikofaktoren wie fortbestehende Dyslipidämie kann der Lipidkern wachsen und Proteinase, die u.a. von aktivierten Leukozyten sezerniert werden, können die extrazelluläre Matrix abbauen. Die Synthese von neuem Kollagen kann durch proinflammatorische Zytokine wie Interferon- γ (IFN- γ) eingeschränkt werden. Diese Veränderungen können die fibrotische Kappe verdünnen, brüchig und anfällig für Risse

Einleitung

machen. Wenn die Plaque reißt, wird stark thrombogenes Material freigesetzt, was die Gerinnungskaskade aktiviert. Die Thrombozyten werden durch das gebildete Thrombin aktiviert und bilden durch Adhäsion an der Intima und Aggregation einen Thrombus. Ein Thrombus, der das Gefäß verschließt, kann z.B. einen akuten Herzinfarkt auslösen. Bei Überwiegen der Fibrinolyse bildet sich eher ein begrenzter Wandthrombus. Ein Heilungsprozess kann beginnen und führt zur Freisetzung von Platelet-derived growth factor (PDGF) aus aktivierten Blutplättchen, welcher die Migration glatter Muskelzellen stimuliert. Zusätzlich wird der transformierende Wachstumsfaktor- β (TFG- β), ein antiinflammatorischer Mediator, aktiviert, der die interstitielle Kollagenproduktion fördert. Die verstärkte Migration, Proliferation und extrazelluläre Matrixsynthese führen zur Verdickung der fibrösen Kappe und zu einer Verdickung der Intima [10]. Dieser Prozess ist eigentlich für die Heilung und Reparatur nach einer Gefäßverletzung verantwortlich, aber wenn atherogene Stimuli über Jahre hinweg anhalten, können die Reparaturreaktionen so umfangreich und dominierend werden, dass es zu einer Verengung des Gefäßes mit einem reduzierten Blutfluss kommt bis hin zu einem kompletten Verschluss (Stenose) [3].

Es gibt verschiedene Therapiemöglichkeiten bei der Behandlung von arteriellen Stenosen. Es gibt Katheter-basierte interventionelle Therapien, sowie auch offene chirurgische Maßnahmen wie die Bypassoperationen. Manche davon werden nur bei speziellen Indikationen angewandt und haben nur eine begrenzte Bedeutung, auf die hier nicht weiter eingegangen wird, wie z.B. die Rotationsangioplastie [15], die direktionale koronare Atherektomie (DCA) [16], die Ultraschallangioplastie [17] und die (Laser) perkutane transluminale koronare Angioplastie (PTCA) [18].

Als Standardmethode insbesondere am Herzen werden die Ballon-Katheter Dilatation meist mit nachfolgender Stentimplantation durchgeführt, als spezielles Verfahren selten auch im Cutting Ballon Verfahren.

In den letzten Jahrzehnten hat sich die nicht chirurgische, Katheter gestützte interventionelle Therapie von Gefäßstenose stark weiterentwickelt. 1977 wurde die erste perkutane Koronararterien Angioplastie durchgeführt, bei der ein Katheter über die Arteria femoralis bis zur stenosierten Koronararterie eingeführt, in der Stenose ein Ballon aufgeblasen und dadurch die Stenose aufgedehnt wurde (Ballon-Angioplastie) [19]. Trotz Weiterentwicklungen der

Einleitung

Ballonangioplastie kam es bei den Patienten oft zu Problemen, wie akuter Gefäßverschluss, subakute Thrombosen und neointimale Hyperplasie mit Bildung von Restenosen [20]. Eine neuere Technik bestand darin, einen Stent aus Edelstahl (Bare Metal Stent, BMS), an die Stelle der Gefäßverengung zu platzieren [21]. Obwohl durch die BMS der elastische Rückstoß der Gefäßwand verhindert wurde und die Thrombosen durch die duale Thrombozytenaggregationshemmung reduziert wurden, blieb die neointimale Hyperplasie mit Restenosierung weiter ein Problem [20]. Um die Gefahr der neointimalen Hyperplasie und der damit folgenden Restenosierung zu vermindern, wurden Stents, die mit Medikamenten beschichtet wurden, entwickelt. Hierzu wurde Sirolimus (Rapamycin), ein makrozyklisches Lakton, das die Proliferation von Lymphozyten und der glatten Muskelzellen durch Zytokine und Wachstumsfaktoren hemmt, eingesetzt [22]. Dieser erste Drug-eluting Stent (DES) führte zu einer Reduzierung der Restenoserate. Die Beschichtung der Stents zur Hemmung der neointimalen Hyperplasie wurde mit verschiedenen Medikamenten und Polymerüberzügen weiterentwickelt [20].

Durch diese Entwicklung, von BMS zu DES oder auch Drug-coated Ballons (DCB) konnte über die Jahre die Zahl der In-stent-Restenosen reduziert werden. In der Zeit vor den zusätzlichen Stentimplantationen betrug die Restenoserate 32-55% aller Angioplastien, in der Zeit der BMS reduzierte sich diese schon auf 17-42% und mit den DES auf unter 10% [23]. Trotzdem sind die In-stent-Restenosen noch immer eine der häufigsten Komplikationen und ein wichtiges klinisches Problem [24].

Die drei wichtigsten pathogenen Mechanismen der Restenose sind: anfänglicher elastischer Rückstoß, Gefäßumbau und neointimale Hyperplasie [25]. Im Folgenden werden wir detailliert auf die neointimale Hyperplasie eingehen.

Die Intimahyperplasie zeichnet sich durch die allmähliche Verkleinerung des Gefäßlumens aufgrund von Migration und Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen (Smooth Muscle Cell, SMC) in die Intima des Gefäßes aus [26]. Es wurde gezeigt, dass der Mechanismus der Intimahyperplasie ähnlich verläuft wie der des Wundheilungsprozesses. Der Wundheilungsprozess kann in 3 Phasen eingeteilt werden: die Inflammation, die Proliferation der Zellen und das Remodeling der extrazellulären Matrix [27].

Einleitung

Die unmittelbaren Folgen nach der Ballondilatation mit Stentimplantation sind Deendothelialisierung, Zerstörung der Plaques und Dehnung der Arterie im betroffenen Bereich [25]. Durch die Deendothelialisierung wird die Thrombusbildung, die Entstehung von Entzündungen sowie die Proliferation und Migration der glatten Muskeln nicht mehr durch hemmende Faktoren des Endothels wie Prostacyclin, Heparinsulfate und Stickstoffmonoxid (NO) gehemmt und der Wundheilungsprozess kann induziert werden [28]. Es wird unter anderem weniger Heparinsulfat produziert und zusätzlich wird die Konzentration durch Freisetzung eines heparinolytischen Enzyms aus den Thrombozyten weiter gesenkt. Darüber hinaus wird die Produktion von weiteren Faktoren wie NO und das natriuretische Peptid reduziert [29].

Die normalerweise ruhenden glatten Muskelzellen in der Media werden als Reaktion auf erhöhte stimulierende Wachstumsfaktoren und durch die verminderten Endothelinhibitorischen Faktoren zur Proliferation aktiviert [28]. Die glatten Gefäßmuskelzellen können in zwei Phänotypen auftreten: Erstens der differenzierte kontraktile Phänotyp, der hauptsächlich α -Actin und Myosin enthält und eine sehr geringe Proliferationsrate aufweist, und zweitens der nicht-kontraktile Phänotyp, der viele Zellorganellen, viel raues endoplasmatisches Retikulum, kein Myosin und eine Zunahme von β -Actin aufweist. Der nicht-kontraktile Phänotyp weist eine höhere Proliferationsrate auf und produziert vier- bis fünfmal mehr extrazelluläre Matrix als der differenzierte Phänotyp. In der Intimahyperplasie ist der nicht-kontraktile Phänotyp der SMCs vermehrt exprimiert, dies führt zu einer verstärkten Proliferation und Matrixablagerung in der Intima [29], [30].

Fibroblasten-Wachstumsfaktoren tragen wesentlich zur medialen Proliferation glatter Muskelzellen bei, während die Anwesenheit endogener oder exogener Wachstumsfaktoren aus Blutplättchen die Migration glatter Muskelzellen von der Media in die Intima fördert [31]. Neben den Wachstumsfaktoren werden noch weitere Mediatoren, wie Heparanasen und Proteasen freigegeben. Heparanasen könnten Heparansulfat-Proteoglykane von der Zelloberfläche entfernen und deren hemmende Wirkung auf die Proliferation aufheben. Es wurde gezeigt, dass nach einer Ballon-Verletzung, extrazelluläre Proteasen, wie Plasminogene Aktivatoren und Matrixmetalloproteinasen (MMPs), verstärkt synthetisiert und aus SMCs freigesetzt werden, die die Migration von VSMC fördern können [32].

Einleitung

Schließlich trägt auch die Migration von Fibroblasten zur Intimahyperplasie bei. Die Wachstumsfaktoren, wie TGF- β 1, steigern nicht nur die Proliferation und Migration von VSMCs, sondern auch von Fibroblasten, die in der Adventitia enthalten sind [33]. Die Fibroblasten können zu Myofibroblasten differenzieren und dann in die Intima migrieren. Myofibroblasten haben kontraktile und migratorische Eigenschaften, die bei der Entwicklung von Arterienerkrankungen eine wichtige Rolle spielen, während Fibroblasten, ihre Vorläufer, hauptsächlich eine sekretorische Funktion haben [34]. Die Myofibroblasten tragen dann zur Bildung der extrazellulären Matrix (ECM) bei, indem sie die Proteinsynthese von Molekülen wie Kollagen und Fibronectin erhöhen. Dies hat zur Folge, dass sich die Intimaschicht, die hauptsächlich aus VSMCs, ECM-Komponenten, einigen Fibroblasten und Schaumzellen besteht, weiter vergrößert [33].

Trotz neuer Medikamente mit wachstumshemmender Wirkung, mit denen DES beschichtet werden, und der Forschung an neuen Stenttypen bleibt die Intimahyperplasie und die daraus folgende Restenose, eine Hauptkomplikation der Angioplastie, des Stenting und der Bypass-Operation [33].

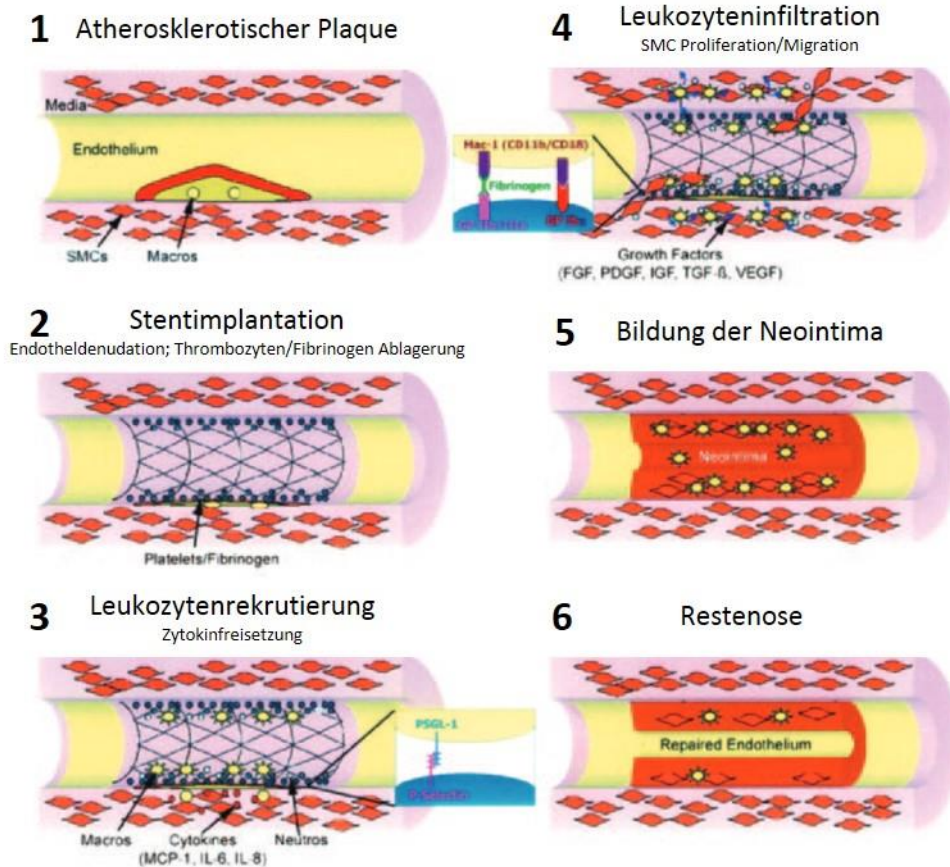


Abbildung 3 pathophysiologischer Prozess der In-stent Restenose; 1: atherosklerotische Plaque vor dem Eingriff; 2: Unmittelbar nach der Stent-Platzierung, Endothel-Denudation und Thrombozyten/Fibrinogen-Anlagerung; 3 und 4: Leukozytenrekrutierung, Infiltration sowie SMC Proliferation und Migration in den Tagen nach der Verletzung; 5: Neointimale Verdickung in den Wochen nach der Verletzung mit fortgesetzter SMC Proliferation und Monozytenrekrutierung; 6: Langfristige (Wochen bis Monate) Veränderung von einer überwiegend zellulären zu einer weniger zellulären und mehr ECM-reichen Plaque; Abbildung modifiziert von Costa und Simon [25]

3.2 Sphingosin-1-phosphat (S1P)

Die Sphingolipide wurden bereits 1884 von dem Arzt J. L. W. Thudichun entdeckt [35]. Es handelt sich um polare Lipide, die als Grundgerüst das Sphingosin enthalten [36]. Zu den Sphingolipiden gehören einerseits Bestandteile von Zellmembranen, andererseits aber auch intra- und extrazelluläre Botenstoffe, die Signaltransduktion, Proliferation, Reifung, Apoptose und Stressreaktionen vermitteln [37]. Es gibt eine Vielzahl von Sphingolipiden, wobei die wichtigsten Vorläufer die Ceramide sind. Ceramide können glykosyliert werden, um Glykosphingolipide zu bilden, oder eine polare Kopfgruppe erhalten, um Sphingomyelin zu bilden, oder auch deacetyliert werden, um Sphingosin zu bilden [38], [39].

Sphingolipide werden durch eine De-novo-Synthese im endoplasmatischen Retikulum aus Serin und Palmitoyl-CoA gebildet. Durch das Enzym Serin-Palmitoyltransferase werden die

Einleitung

beiden Moleküle zu 3-Keto-Dihydrosphingosin kondensiert. Nach weiteren Modifikationen wird es zu Dihydrosphingosin, das wiederum durch Ceramidsynthasen in Dihydroceramid umgewandelt wird, welches dann zu Ceramid desaturiert wird. Von dort können die Ceramide in verschiedene Sphingolipide modifiziert werden (Abbildung 3) [40].

Sphingosin-1-phosphat (S1P) ist ein bioaktiver Lipidmediator aus der Gruppe der Sphingolipide. S1P bindet an fünf verschiedene G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR), die S1P Rezeptoren (S1PR) 1-5, die Migration, Adhäsion, Überleben und Proliferation der Zellen regulieren [41]. S1P entsteht durch Phosphorylierung durch die Sphingosinkinasen SPHK 1 und 2 aus Sphingosin. Das Sphingosin ist durch die Deacetylierung des Ceramids durch die Ceramidasen entstanden [40]. Wiederum kann das S1P durch Phosphatasen dephosphoryliert werden oder durch die S1P Lyase in Phosphoethanolamin und Hexadecenal gespalten werden [42]. Die S1P Konzentration wird daher durch die SPHKs, S1P Lyase und Phosphatasen reguliert [43].

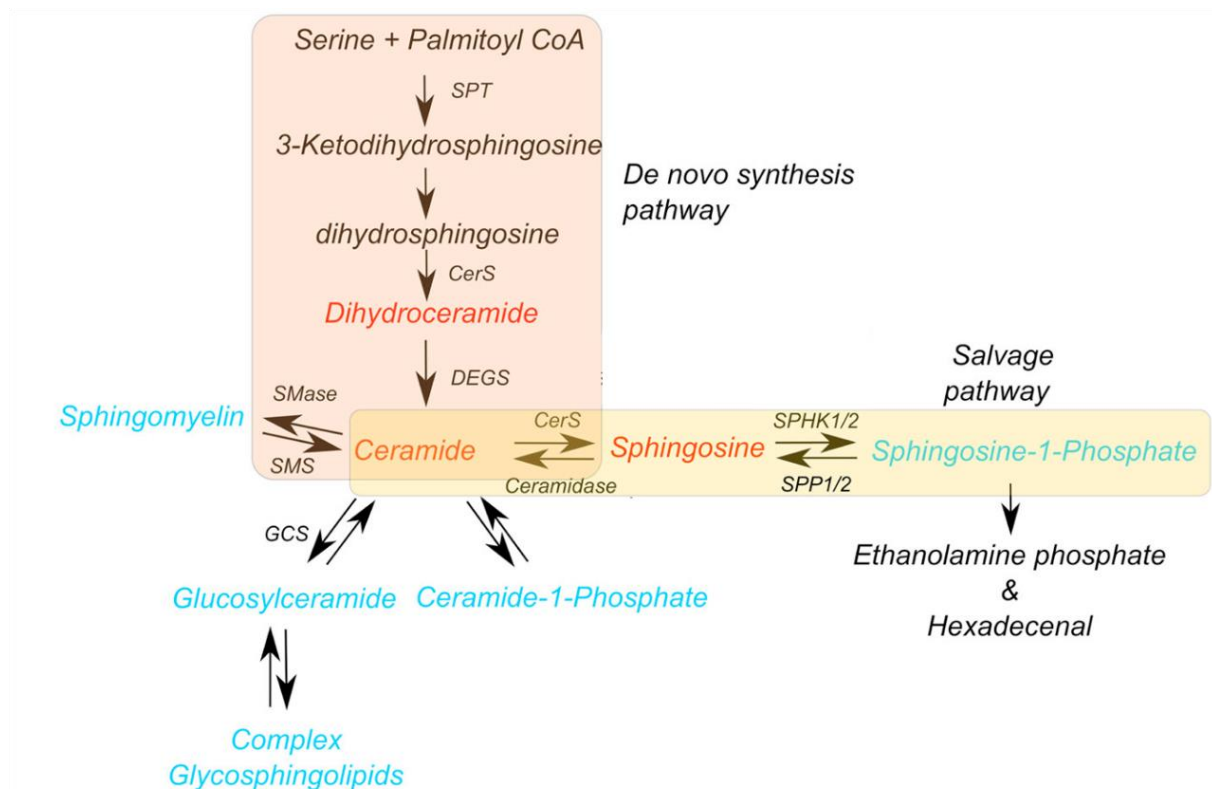


Abbildung 4 Biosynthese des Sphingosin-1-phosphats; SPT: Serin-Palmitoyltransferase; CerS: Ceramidsnythase; DEGS: Desaturierung; SPHK1/2: Sphingosinekinase 1/2; SPP1/2: Sphingosinephosphatase; SMase: Sphingimyelinease; SMS: Sphingomyelinsynthase; GCS: Glucosylceramind synthase [40]

Einleitung

S1P wird hauptsächlich von Erythrozyten und Endothelzellen aber auch im geringen Maße in Thrombozyten intrazellulär gebildet. Hohe S1P-Konzentrationen finden sich im Blutplasma und in Blut zirkulierenden Zellen wie Erythrozyten, Thrombozyten und Endothelzellen, niedrige S1P-Konzentrationen in lymphatischen Kapillaren [44]. Innerhalb des Gewebes wird S1P durch Lyasen rasch abgebaut; deshalb findet man es dort nur in geringer Konzentration, wodurch ein hoher Konzentrationsgradient zwischen Gewebe und Intravasalraum entsteht [45].

Darüber hinaus wird S1P bei der Blutgerinnung durch die Thrombozyten freigesetzt, da diese S1P speichern und bei Stimulation freisetzen können [46]. In Endothelzellen ist das Transportprotein Spinster Homolog 2 (spns2) für die Freisetzung von S1P verantwortlich. In anderen Zelltypen wie Mastzellen, Erythrozyten, Thrombozyten, Brustkrebszellen und Astrozyten wird vermutet, dass der ATP-binding cassette (ABC-) 4 Transporter (ABCC4/MRP4) für die S1P Freisetzung verantwortlich ist [47]. In Erythrozyten wurde auch gezeigt, dass Membran gebundenes S1P durch High Density Lipoprotein (HDL) und Albumin extrahiert wird und durch Bindung abtransportiert werden kann [48].

Das zirkulierende S1P ist an Plasmaproteine gebunden, die nicht nur als S1P-Carrier fungieren, sondern auch die Affinität des S1P zu den S1P-Rezeptoren beeinflussen kann. Mehr als die Hälfte (50-60%) des Plasma-S1P ist an HDL, 30-40% an Albumin gebunden und ein kleiner Teil an andere Lipoproteine [44]. Es wurde gezeigt, dass S1P im HDL ausschließlich an Apolipoprotein M (ApoM) bindet [49]. ApoM ist ein Lipocalin, das zu 95% an HDL gebunden ist und hydrophobe Moleküle, wie Steroide, Retinoide und Lipide in seiner Bindungstasche transportieren kann [50]. In ApoM- defizienten Mäusen wurde festgestellt, dass das Plasma-S1P um 46% im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen reduziert war [49].

Von Eileen Moritz et al. wurde bei 1.339 gesunden Probanden in Pommern der Serum-S1P Spiegel gemessen und ein Referenzintervall von 0,534-1,242 $\mu\text{mol/L}$ bestimmt [51]. Die Serum S1P Konzentration ist höher als die Plasma-S1P Konzentration. Bei der Blutgerinnung wird das S1P, das in den Thrombozyten gespeichert ist, extrazellulär freigesetzt [46].

S1P zirkuliert nicht nur im Blut, sondern auch im Lymphsystem. Die Hauptquelle sind wahrscheinlich die lymphatischen Endothelzellen (LEC). Es wurde gezeigt, dass bei Mäusen,

Einleitung

die einen spezifischen Knockout der SphK1/2 in LEC haben, zwar das S1P im Lymphsystem stark erniedrigt ist, aber das S1P im Blut auf gleichem Niveau bleibt [52].

S1P spielt eine wichtige Rolle bei inflammatorischen Prozessen und immunologischen Erkrankungen. Durch Aktivierung des S1PR1 wird die Lymphopoese im Knochenmark gehemmt und die Auswanderung von Lymphozyten wird durch die S1P-S1PR1 Signalachse aus den Lymphknoten und die adaptive Immunantwort unterbunden [39]. Der erste zugelassene Arzneistoff Fingolimod, welcher bei Multiple Sklerose (MS) indiziert ist, wirkt als funktioneller Antagonist des S1PR1 [53]. MS ist eine entzündliche Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems, welche durch verschiedene Faktoren eine Kaskade von Ereignissen auslöst. Zunächst erfolgt eine akute entzündliche Schädigung von Axonen und Glia, danach die Wiederherstellung der Funktion und strukturelle Reparatur mit einer postinflammatorischen Gliose und Neurodegeneration [54]. Fingolimod ist als Prodrug ein Substrat der SphK und wird zu Fingolimod-Phosphat. Bis auf den S1PR2 werden die S1P-Rezeptoren nach Fingolimod-Phosphat Bindung internalisiert, womit die S1P/S1PR1 vermittelte Migration der Lymphozyten unterbunden werden [53], [55].

Bei der Typ2 Diabeteserkrankung wurde gezeigt, dass S1P die β -Zell Proliferation fördert und deren Apoptose hemmt. Somit wird sowohl die Glukoseaufnahme in die Leber als auch die Glykolyse gefördert, wodurch der Blutzucker gesenkt wird [56]. Ein weiteres Beispiel für Einfluss des S1Ps ist das signifikante Absinken des Plasma-S1P Spiegels bei Patienten während einer Sepsis und die stark negative Korrelation mit zunehmendem Organversagen. So könnte S1P ein potentieller Biomarker für das Multiorganversagen bzw. des Sepsisverlaufes sein [57], [58]. In Zellkulturversuchen konnte gezeigt werden, dass S1P die Kardiomyozyten vor hypoxischen Schäden schützen kann, z.B. kann am isolierten Herzen die Vorbehandlung mit S1P die Erholung der Herzfunktion nach Ischämie erheblich verbessert werden. Diese Experimente weisen auf eine kardioprotektive Funktion des S1Ps hin [59]. Es gibt auch zahlreiche Hinweise darauf, dass S1P bei Krebs eine Rolle spielt. S1P reguliert Prozesse wie Entzündungen, die die Tumorentstehung vorantreiben können, und der Neovaskularisierung, die Krebszellen mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt, sowie deren Zellwachstum und -überleben [60]. Dies sollen nur ein paar wenige Beispiele sein, bei welchen Krankheiten S1P eine wichtige Rolle spielt bzw. spielen kann [41], [43], [61].

Einleitung

Irina Soltau et al. bestimmten S1P Spiegel in Serumproben bei gesunden Blutspendern (als Kontrollgruppe) und bei Patienten mit Atherosklerose, die entweder eine klinisch relevante pAVK oder eine Carotisstenose (CS) aufwiesen. Die Patienten mit Atherosklerose hatten im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikant niedrigeres Serum-S1P. Diese Beobachtung zeigt, dass S1P ein potentieller Biomarker für die Entwicklung einer pAVK und CS sein könnte [62]. Sattler et al zeigten, dass bei Patienten mit KHK die Plasma-S1P Konzentration niedriger war als bei den gesunden Kontrollen, aber die Menge des nicht an HDL gebundenen S1P im Plasma bei Patienten mit KHK im Vergleich zu den Kontrollen erhöht waren. Das nicht-HDL-gebundene S1P wird in Verbindung mit vermehrten Entzündungsreaktionen gebracht [63].

S1P kann in Arterien sowohl eine Kontraktion als auch eine Dilatation bewirken. In den Gefäßen zeigt S1P pro- und antiatherosklerotische Eigenschaften. In Endothelzellen kann S1P die Proliferation, Migration, Formveränderung und die Resilienz des Endothels stimulieren [64]. Um diese Mechanismen genauer zu verstehen, ist es wichtig die S1P-Rezeptoren genauer zu betrachten.

3.3 Sphingosin-1-phosphat Rezeptoren

Es gibt fünf verschiedene G-Protein gekoppelte S1P Rezeptoren (S1PR1-5) an die S1P binden kann. Die Expression der S1P-Rezeptoren ist gewebs-, entwicklungs- und altersabhängig. S1PR1, S1PR2 und S1PR3 werden ubiquitär exprimiert. S1PR4 ist vor allem im Lymphgewebe exprimiert und S1PR5 vor allem im Gehirn und der Milz [65], [66]. Die Rezeptoren unterscheiden sich auch durch die unterschiedliche Kopplung an die G-Proteine. S1PR1 und S1PR5 binden vor allem an Gi, S1PR2 und S1PR3 binden an Gi, G12/13 und Gq/11 und S1PR4 an Gi und G12. Infolgedessen beeinflusst S1P verschiedene biologische Prozesse in Abhängigkeit von der relativen Expression sowohl der S1P-Rezeptoren sowie der G-Proteine [67].

Einleitung

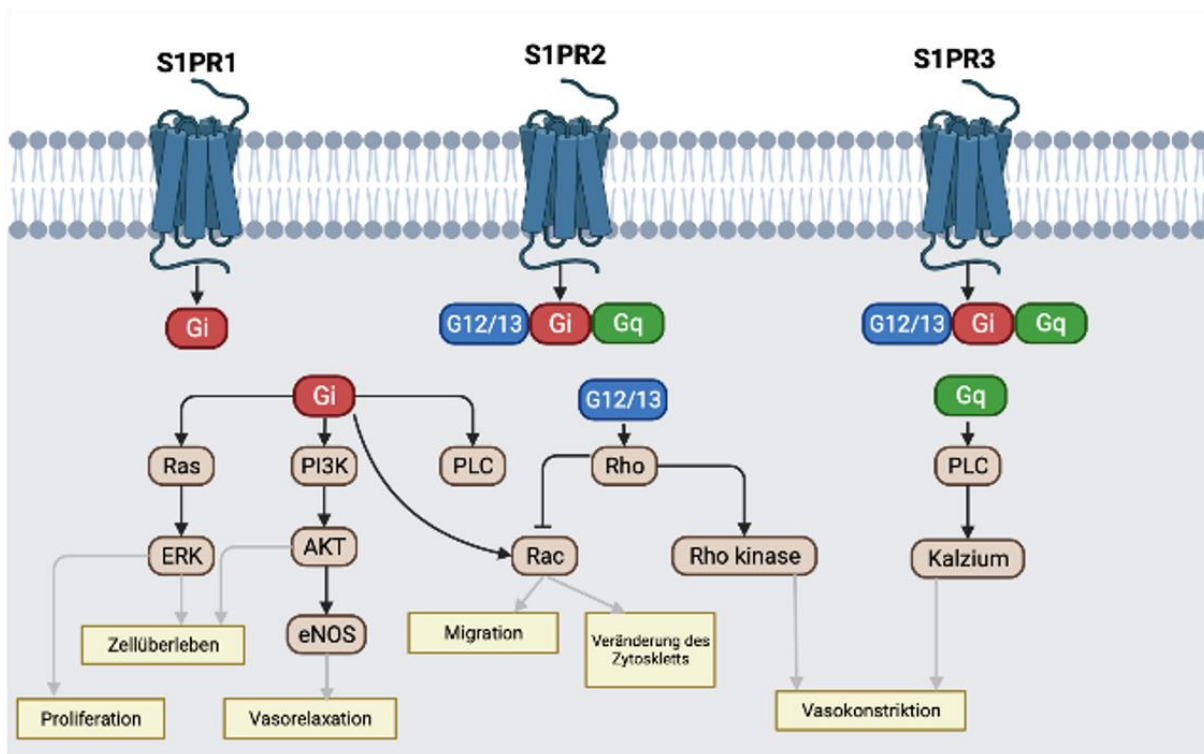


Abbildung 5 Signalweg des Sphingosin-1-phosphats; Die S1P Rezeptoren (S1PR1-3) sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren. S1PR1 koppelt nur an Gi, S1PR2 und S1PR3 koppeln an Gi, Gq und G12/13. Diese Kopplung führt zur Aktivierung von kleinen GTPasen wie Rho, Rac und Ras. Weitere nachgeschaltete Aktivierungen von S1P-Rezeptoren betrifft die Adenylat-Cylase, PI-3-Kinase (PI3K), Phospholipase C (PLC) und Proteinkinase C (PKC) und intrazelluläres Kalzium. ERK: extracellular-signal regulated Kinase; eNOS: endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase; erstellt mit Biorender.com; modifiziert nach Mendelson et al. [68]

3.3.1 Sphingosin-1-phosphat Rezeptor 1 (S1PR1)

Der S1P1-Rezeptor ist ausschließlich an Gi gekoppelt [69]. Es kann dadurch zur Aktivierung des Phosphoinositid 3-kinase (PI3K)- Akt- Signalweges kommen und daraus folgend die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) aktiviert werden, die zu einer Vasorelaxation führt [70]. Die Gi-Aktivierung führt auch zu einer verstärkten Expression der Proteinkinase C (PKC)-Isoformen α und ϵ und der ERK1/2-Signalübertragung, die das Zellüberleben fördern kann [71], [72]. S1PR1 ist im Gefäßsystem vor allem in den Endothelzellen, aber auch in den glatten Muskelzellen exprimiert [73]. Der Rezeptor spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung von Blutgefäßen während der Entwicklung. Homozygote *S1pr1*^{-/-} Mäuse sterben in der Gebärmutter an massiven Hämorrhagien [74]. Es wurde gezeigt, dass S1PR1 unabhängig von den SMCs und den Perizyten, sowie EC-autonom wirkt, um die sprossende Angiogenese zu hemmen und dadurch die Gefäßstabilität zu fördern. Es wird davon ausgegangen, dass die regulatorische Interaktion zwischen dem Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA) und

Einleitung

S1PR1 das Gleichgewicht zwischen Induktion und Restriktion dieses Prozesses aufrechterhält [75]. Eine Aktivierung und vermehrte Expression des S1PR1s zur Aufrechterhaltung der Barrierefunktion kann auch mechanisch durch Scherkräfte ausgelöst werden. Untersuchungen an Mausearten ergaben, dass turbulente Strömungen die Umlokalisierung des S1PR1s von der EC-Oberfläche in endozytäre Vesikel bewirken [76]. Bei Untersuchungen des S1PR1s in Endothelzellen erwachsener Mäuse wurde festgestellt, dass das endotheliale S1PR1-Signal in entzündeten Regionen des arteriellen Gefäßsystems verstärkt war. Bei Mäusen mit einer endothelzellspezifischen Deletion von S1PR1 waren die proinflammatorischen Adhäsionsproteine wie ICAM-1 und VCAM-1 erhöht. Bei den Mäusen mit endothelzellspezifischer Überexpression von S1PR1 waren diese erniedrigt, was auf eine Schutzfunktion von S1PR1 bei Gefäßerkrankungen hindeutet [77]. Eine globale Deletion des S1PR1s in Mäusen führt zu einer abnormalen Gefäßentwicklung und zum Absterben der Mäuse in der Schwangerschaft aufgrund einer defekten sprossenden Angiogenese [78]. In anderen Untersuchungen wurden C57BL/6J-Mäusen intravenös TNF α injiziert und in Gegenwart und Abwesenheit des S1PR1-Agonisten SEW2871 die Adhäsion von Monozyten untersucht. Es wurde gezeigt, dass S1P und der S1PR1-Agonist die Adhäsion von Monozyten an der Aorta verhindert und so durch die antiinflammatorische Wirkung das Gefäß schützt [79]. Zusammengefasst fördert S1PR1 in Endothelzellen die Integrität der endothelialen Barriere und wirkt antiinflammatorisch [69].

In SMCs stimuliert S1PR1 über die Aktivierung von Gi-Protein sowohl die Proliferation also auch die Migration [80]. In einem Ratten-Modell wurde gezeigt, dass es einen Zusammenhang zwischen dem S1PR1 in SMC und der vermehrten Entstehung einer Intimahyperplasie gibt. Bei diesen Untersuchungen wurde ein humanisiertes Rattenmodell verwendet, bei dem eine denudierte humane thorakale Aorta in die Ratte transplantiert wurde, die dann innerhalb von wenigen Wochen eine Neointima entwickelt. Es wurde gezeigt, dass es durch die Verletzung der Arterie zu einer Erhöhung der Anzahl S1PR1 positiver Zellen in der Media kommen kann und diese SMCs durch Migration über die innere elastische Lamina die Intima ausbilden können. S1PR1 stimuliert die Migration durch Gi- vermittelte Aktivierung von Rac [81]. Beobachtungen zeigten, dass in heranreifenden Gefäßen von *S1pr1*^{-/-} Mäuse einige wenige SMC α -Actin- positive Zellen aufwiesen, was ebenfalls darauf hindeutet, dass S1PR1 die Migration und Proliferation der SMC reguliert [82].

3.3.2 Sphingosin-1-phosphat Rezeptor 2 (S1PR2)

Der S1P2- Rezeptor bindet an die Gi, G12/13 und Gq/11 Proteine, wobei er in SMC am stärksten an G12/13 koppelt. Dies führt zur Aktivierung von Rho, seines Effektors Rho Kinase (ROCK) und des Phosphatase-und-Tensin-Homologs (PTEN), welches wiederum die Phosphoinositid-3-kinase (PI3K) dephosphoryliert und inhibiert [69]. Bei Entzündungen in Endothelzellen wird durch S1PR2 über Rho der nukleäre Faktor Kappa B (NFκB) aktiviert und die Freisetzung von VCAM-1 und intrazellulärem ICAM-1 erhöht. Zusätzlich kann die p38 Stress Activated Protein Kinase (p38 SAPK) aktiviert werden, welche die endotheliale Entzündungsreaktion fördert. Dies weist darauf hin, dass S1PR2 ein wichtiger Regulator des prothrombotischen Phänotyps des Endothels ist [83], [84]. Als Barriere trennt das Endothel die Blutgerinnungsfaktoren vom Kontakt mit subendothelialen prothrombotischen extrazellulären Matrixkomponenten [85].

In einem atherosklerotischen Mausmodell wurde gezeigt, dass in *S1pr2*^{-/-} Mäusen die Atherosklerose vermindert ist. Bei diesen Mäusen wurden reduzierte Makrophagen-ähnliche Schaumzellen in den atherosklerotischen Plaques gefunden. Diese Daten deuten darauf hin, dass die S1PR2-Signalübertragung in den Plaque-Makrophagen die entzündungsfördernden Zytokinen reguliert und dadurch die Atherosklerose fördern kann [86].

In SMC ist S1PR2 mit der Inhibierung der Migration der Zellen assoziiert, welche über die Bindung an G12/13 und die folgende Rho Aktivierung und Unterdrückung der Rac Aktivität gesteuert wird [87], [88]. Bei der Ligation der Carotis von *S1pr2*^{-/-} Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass die neointimale Läsion im Vergleich zu Wildtyp Mäusen stark zugenommen hatte [87]. S1PR2 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Genexpression von SMC-Differenzierungsmarkern. Die Regulation dieser Gene durch S1PR2 ist vom spannungsabhängigen Kalziumkanäle (VGCC= voltage gated calcium channel) und RhoA/ROCK-Signalen abhängig, was zu einer verstärkten Bindung des Serum Response Factors (SRF) in den endogenen SMα-Actin und Smooth Muscle Myosin Heavy Chain (SMMHC)-Promotoren führt [89], [90].

3.3.3 Sphingosin-1-phosphat Rezeptor 3 (S1PR3)

Der S1P3-Rezeptor bindet wie auch der S1PR2 an die Gi, G12/13 und Gq/11 Proteine [69] und trägt ebenso zur Regulierung der Angiogenese und Funktion der vaskulären Endothelzellen

Einleitung

bei [91]. In Endothelzellen spielt S1PR3 eine wichtige Rolle bei der P-Selektin Mobilisation und der daraus folgende Leukodiapedese. Die P-Selektin Mobilisation und Leukodiapedese wird über Gq, Phospholipase C β (PLC β) und Ca²⁺ aktiviert [92]. S1PR3 kann auch RhoA aktivieren. Aktiviertes RhoA kann an die Serine/Threonine Kinase ROCK binden und diese aktivieren, welche an der Störung der EC-Barriere beteiligt ist [93]. Studien zeigten, dass durch die Stimulation von S1PR3 durch S1P die Inflammation im Endothel ausgelöst wird oder die endotheliale Aktivierung verstärkt wird [69]. In einer Untersuchung an Mäusen mit atherosklerotischen Läsionen konnte gezeigt werden, dass die *S1pr3*^{-/-}/*ApoE*^{-/-} Mäuse einen stark reduzierten Gehalt an Monozyten/Makrophagen auswiesen, obwohl dieser Doppel-Knockout keinen Effekt auf die Plaquegröße hatte. Zudem wurden in den Makrophagen weniger TNF α und MCP1 exprimiert. Diese Daten zeigen, dass S1PR3 durch die Förderung der inflammatorischen Monozyten/Makrophagen Rekrutierung eine ursächliche Rolle in der Atherosklerose spielen kann [94]. Darüber hinaus kann S1PR3 in den vaskulären Endothelzellen durch Aktivierung von eNOS und Produktion von NO über Gi und Akt vasodilatierend wirken, wobei in den SMC die Vasokonstriktion über durch Gq-gekoppelte Ca²⁺-Mobilisierung und G12/13-gekoppelte Rho-abhängige Myosin-Leichtkettenphosphatase-Hemmung überwiegt [95].

Hinsichtlich einer Regulation der Intimahyperplasie durch S1PR3 wurden unterschiedliche Beobachtungen gemacht. In einem Rattenmodell, bei dem durch einen Ballon die Carotis verletzt wurde, konnte gezeigt werden, dass sowohl S1PR3 und als auch S1PR1 eine wichtige Rolle für die Proliferation der SMC spielen. Durch die Antagonisierung der beiden Rezeptoren konnte die Intimahyperplasie bis zu 50% reduziert werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass S1PR3 und S1PR1 die Expression von Genen unterdrücken können, die den kontraktile SMC-Phänotyp definieren [89]. An der Denudation der Iliofemoralarterie wurde diese Beobachtung bestätigt: 28 Tage nach der Operation hatten die Wildtyp Mäuse signifikant größere Läsionen als die *S1pr3*^{-/-} Mäuse gebildet. In der Zellkultur wurde gezeigt, dass in SMC, in denen S1PR3 überexprimiert wurde, Rac, Akt und Erk aktiviert wurden und die Zellen schneller wuchsen sowie besser migrierten als in SMC, bei denen S1PR3 nicht überexprimiert war. Die Erk und Akt Aktivierung kann durch die verstärkte Kopplung an Gq vermittelt werden, da Gq ein starker Aktivator von Phospholipase C ist, welche wiederum die Erk und Akt Aktivierung vermittelt [96]. In den oben genannten Versuchen mit *S1pr3*^{-/-}/*ApoE*^{-/-} Mäusen

Einleitung

wurde das Gegenteil beobachtet. In diesem Modell wurde die A. carotis ligiert und eine verstärkte Intimahyperplasie bei *S1pr3*^{-/-} Mäusen gesehen. Dies spricht für eine antiproliferative und antimigratorische Rolle des S1PR3 in diesem Modell [94].

Da die Rezeptoren in verschiedenen Gefäßabschnitten unterschiedlich exprimiert sein können, kann dies auch zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. So wurde gezeigt, dass S1P in Kombination mit dem Plättchenwachstumsfaktor (PDGF) die Migration von SMCs aus FVB-Mäusen (FVB-SMCs) steigert, aber die Migration von SMCs aus C57BL/6 Mäusen (C57BL/6-SMCs) hemmt. Bei der alleinigen Gabe von PDGF migrierten die SMCs der beiden Mausgenotypen in der Zellkultur gleich. Eine Erklärung dafür ist, dass die SMCs unterschiedliche S1P-Rezeptoren exprimieren. Die SMCs von FVB-Mäusen exprimieren mehr S1PR1 als die Zellen von C57BL/6 Mäusen, diese exprimieren wiederum mehr S1PR2. Durch die Hemmung des S1PR2 in C57BL/6-SMC kann die Migration verstärkt werden, während durch die Hemmung des S1PR1s in FVB-SMC die Migration gehemmt wird. So ist wahrscheinlich, dass die Expression von S1P-Rezeptoren innerhalb der Inzuchtmausstämme variiert, trotzdem bleibt S1P für die Migration von SMC und für die Bildung von Läsionen nach Verletzungen entscheidend [97].

3.4 Fragestellung

In dieser Arbeit wurden drei Fragestellungen bearbeitet.

1. Welche Rolle spielt der S1PR3 bei der Intimahyperplasie in der abdominalen Aorta? Entstehen nach Traumata durch das Fehlen von S1PR3 kleinere oder größere Läsionen bzw. eine geringere oder eine ausgeprägtere Intimahyperplasie als bei der Anwesenheit von S1PR3? Wie in Abschnitt 3.3.3 dargestellt wurde in verschiedenen Mausmodellen die mögliche Rolle des S1PR3 bei der Intimahyperplasie beschrieben. Diese Untersuchungen zeigten aber gegensätzliche Ergebnisse. Zum Einem zeigte sich bei der Denudation der Iliofemoralarterie, dass die *S1pr3*^{+/+} Mäuse signifikant größere Läsionen ausbilden im Vergleich zu *S1pr3*^{-/-} Mäuse [96]. Zum anderen wurde bei der Ligatur der A. carotis eine verstärkte Intimahyperplasie bei *S1pr3*^{-/-} Mäusen beobachtet [94]. In dieser Arbeit wurde ein Verletzungsmodell verwendet, bei dem die abdominale Aorta jeweils an 4 Stellen für 2 min mit einer 1,75mm breiten „strong pressure“ Gefäßklemme abgedrückt und dies dreimal wiederholt wurde. 28 Tage nach Verletzung wurden die Aorten der Mäuse histologisch untersucht und die Intimadicke der abdominalen Aorta bestimmt.
2. Kommt es zu einer *S1pr3*-abhängigen Veränderung der Expression von Zellmarkern nach Verletzung der abdominalen Aorta? Dafür wurde den Mäusen nach 4, 7, 14 und 21 Tagen nach der Operation, sowie Mäusen, die keine Operation erlitten (Baseline), die abdominale Aorta entnommen und dann Media und Adventitia separiert. Die Expression der Gene wurde mittels der quantitativen Echtzeit-Polymerasenkettenreaktion (RT-qPCR) bestimmt. Es wurde zum einen die Expression der S1P-Rezeptoren (*S1pr1-3*) und der Sphingosinkinase 1 (*Sphk1*) bestimmt und zum anderem verschiedene Zellmarker für VSMCs (*Myh11*, *Sma*), Monozyten/Makrophagen (*Cd68*) und Stammzellen (*Sca1*), sowie pro- und antiinflammatorische Gene (*Il1b*, *Il10*, *Ccl2*, *Gdf15*), Thrombinrezeptoren (*Par2*, *Par4*) und ein Transkriptionsfaktor (*Crtc1*) untersucht.
3. Besteht ein Zusammenhang zwischen der Konzentration von S1P und den Zytokinen *IL1B*, *IL10* und *CCL2* vor und nach einer operativen Behandlung einer Stenose in den Blutproben von pAVK- und CS-Patienten? Neben dem Mausmodell, in dem die Zytokinexpression in der abdominalen Aorta bestimmt worden ist, wurde in einer Patientenkohorte die Zytokinkonzentration im Blut bestimmt. Hierfür wurde in dieser Arbeit bei 40 Patienten

Einleitung

einer Gefäßstudie (siehe unten) die Assoziation zwischen S1P- und Zytokinkonzentration analysiert.

4 Material und Methoden

4.1 Mausmodell

Alle Untersuchungen mit Versuchstieren wurden unter Einhaltung des Tierschutzgesetzes vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft durchgeführt. Der Tierversuchsantrag wurde von der Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz, Freie und Hansestadt Hamburg bewilligt (Antragsnummer: N093/19).

4.1.1 Sphingosin-1-phosphat Rezeptor 3 Mäuse

Die *S1pr3*^{+/+} und *S1pr3*^{-/-} Mäuse wurden uns freundlicherweise von Dr. Günter Daum (Gefäßmedizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) zur Verfügung gestellt. Der Hintergrund *S1pr3* Mäuse ist der C57BL/6J-Mausstamm. Für den *S1pr3* Zielvektor wurde eine 2-kb Neomycin-resistente Kasette zwischen einer BglII-Schnittstelle und einer NcoI-Schnittstelle in der kodierten Region wie das *S1pr3*-Gen eingefügt, was zu einer 1,5-kb-Genomdeletion führte [98]. Die Mäuse wurden in der Forschungstierhaltung des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf gezüchtet. Die Mausoperationen wurden dort durchgeführt. Für die Experimente wurden nur männliche Tiere verwendet.

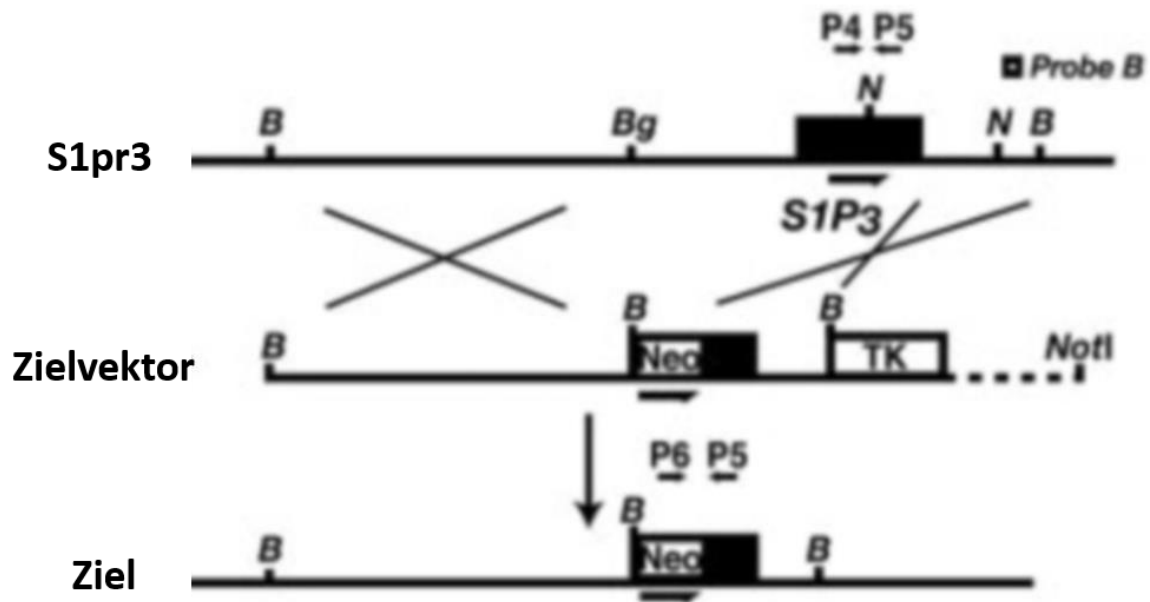


Abbildung 6 Schematische Darstellung der *S1pr3* Gen-Targeting-Strategie [98] Oben: Die Struktur des *S1pr3* Locus der Maus; Mitte: die Struktur des *S1pr3*-Zielvektors; Unten: vorhergesagte Struktur des homolog kombinierten Lokus; B: BamHI; Bg: BgIII; N: Nocl; TK: Thymidin-Kinase-Gen; Neo: Neomycin-Resistenz-Gen

4.1.2 Klemmen der abdominalen Aorta

Die Maus wurde vor der Operation gewogen und ein Mix aus Buprenorphin (0,3 mg/mL, 277,5 μ L) und Carprofen (50 mg/L, 100 μ L) in 10ml Ringerlösung (12 μ L/g KGW) der Maus 30 min vor der OP subkutan injiziert. Die Narkose wurde mit 4-5% Isofluran eingeleitet und über den ganzen Operationszeitraum über eine Maske in einer Konzentration von 1,5%-2% beibehalten. Damit die Augen der Maus nicht austrocknen, wurden diese vor der OP mit Augensalbe (Vidisc Augengel®) befeuchtet. Die Maus wurde auf einer Wärmematte fixiert, der Operationsbereich rasiert und mit Iod desinfiziert. Die Haut sowie das Bauchfell wurden mit Hilfe einer Schere geöffnet. Der Gastrointestinaltrakt wurde vorsichtig mit zwei Wattestäbchen auf eine befeuchtete Kompresse gelegt und mit einer weiteren zugedeckt, damit dieser während der OP nicht austrocknet. Anschließend wurde die abdominale Aorta mit zwei Pinzetten vorsichtig freipräpariert und von der Vena cava getrennt. Sobald die abdominale Aorta frei lag, wurde sie mittels einer „strong pressure“-Gefäßklemme geklemmt, die jeweils 2 min an einer Stelle blieb und angefangen vom distalen Teil der Aorta über vier verschiedene Stellen zum proximalen Teil verschoben wurde. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Danach wurde der Gastrointestinaltrakt wieder zurückgelegt, das Bauchfell wurde mit einer durchgehenden Naht und die Haut mit einer U-förmigen Naht verschlossen. Nach

der Operation wurde zur Schmerzprophylaxe Metamizol (200 mg/kg KGW) über das Trinkwasser verabreicht.



Abbildung 7 Klemmen der abdominalen Aorta

4.1.3 Sektion der abdominalen Aorta

Die Maus wurde mit einer Überdosis Pentobarbital (800 mg/kg KGW), die intraperitoneal verabreicht wurde, getötet und mit Hilfe von Tape fixiert. Das Abdomen sowie der Brustkorb wurde geöffnet und danach mit einer feinen Schere unter dem Herzen in die Vena cava geschnitten, damit bei der Perfusion die Ringerlösung ausfließen kann. Die Maus wurde mit einer stumpfen Kanüle, die über die Herzspitze in die linke Herzkammer geführt wurde, mit 20 mL Ringerlösung perfundiert. Für die histologische Untersuchung wurde zusätzlich mit 20 mL 4% Formaldehyd perfundiert und das Gewebe der abdominalen Aorta in ein Reaktionsgefäß mit 4% Formaldehyd überführt. Das für die qPCR-Analyse bestimmte Gewebe wurde in Ringerlösung gespült und dann in ein Reaktionsgefäß mit 500 µL Enzym Mix überführt und bei 37°C für 15 min inkubiert. Das Gewebe wurde dann auf eine Petrischale, die mit Ringerlösung gefüllt war, überführt. Die Adventitia und die Media der abdominalen Aorta wurden mit Hilfe von Pinzetten voneinander getrennt, in Reaktionsgefäße mit RNAlater überführt und 24h bei Raumtemperatur gelagert. Die Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C eingefroren.

4.2 Histologie

4.2.1 Einbettung und Schneiden der Gewebe

Nach der Fixation des Gewebes für 24 Stunden in 4% Formaldehyd erfolgte die Entwässerung wie in Tabelle 1 dargestellt. Für die Einbettung wurde die abdominale Aorta in der Mitte auseinandergeschnitten und die Gefäßhälften mit der Schnittkante nach unten in die Metallform mit flüssigem Paraffin überführt. Damit das Paraffin aushärtet, wurde der Block für mindestens 30 min auf die Kühlplatte bei -10°C gestellt. Danach wurde der Block von der Metallform gelöst und vor dem Schneiden für mindestens 24h bei -20°C gekühlt.

Tabelle 1 Ablauf der Dehydrierung und Fixierung des Gefäßes

Prozedur	Dauer
70% Isopropanol	20 min
70% Isopropanol	20 min
80% Isopropanol	20 min
85% Isopropanol	20 min
90% Isopropanol	20 min
90% Isopropanol	20 min
96% Isopropanol	20 min
96% Isopropanol	20 min
100% Isopropanol	20 min
100% Isopropanol	20 min
56°C Paraffin	45 min
56°C Paraffin	45 min

Beim Schneiden der Paraffinblöcke mit Hilfe eines Microtoms wurde folgendes Schema verwendet: Es wurden jeweils 5 Ebenen auf Objektträgern geschnitten, pro Schnittebene wurden 10 Objektträger mit jeweils vier Serienschnitten à 3 µm verwendet. Zwischen den Schnittebenen wurden jeweils 20 µm verworfen. Somit erhielt man 50 Objektträger pro Block. Pro Schnittebene waren zwei Levels der Aorta zu sehen, einmal der proximale und einmal der

distale Teil, somit waren pro Block 10 Abschnitte der abdominalen Aorta für nachfolgende Analysen verfügbar.

4.2.2 Elastika-van-Gieson Färbung

Die Gewebeschnitte wurden zuerst in Xylol für dreimal 5 min entparaffinisiert und danach erst zweimal in 99% EtOH, einmal in 96% EtOH und darauffolgend in 70% EtOH für jeweils 5 min entwässert. Anschließend wurden die Schnitte für 25 min in 1%iger Resorcinfuchsin Lösung inkubiert, danach überschüssiger Farbstoff mit Leitungswasser abgespült und mit destilliertem Wasser (Aqua dest.) noch einmal gespült. Die Gewebeabschnitte wurden mit Hilfe von 70% EtOH differenziert und die Reaktion durch Aqua dest. gestoppt. Die elastischen Fasern erschienen danach unter dem Mikroskop dunkelviolet. Die nächste Inkubation erfolgte für 15 min in Eisenhämatoxylin nach Weigert, der überschüssige Farbstoff wurde für ca. 10 min mit Leitungswasser abgewaschen und danach mit Aqua dest. gespült. Anschließend kamen die Schnitte für 5 min in Pikrinsäure/Thiazinrot und wurden erst mit Aqua dest., dann mit 70% EtOH und 96% EtOH abgespült. Zum Schluss wurden die Gewebsschnitte für 2x 5 min in 99% EtOH entwässert, für 3x 5 min in Xylol gewaschen und mit Eindeckmedium (Eukitt®) und Deckplättchen eingedeckt. Es erfolgte Trocknung über Nacht bei Raumtemperatur.

4.2.3 Morphometrische Analyse

Für die morphometrische Analyse wurde jeweils ein Objektträger der Elastika-van-Gieson (EvG)-Färbung pro Schnittebene willkürlich gewählt. Die Schnitte wurden mit dem Zeiss Axio Scan Z1 gescannt und mit dem Programm NetScope detaillierte Screenshots gemacht. Die Screenshots der fünf Schnittebenen mit jeweils 10 Leveln der abdominalen Aorta wurden mit Hilfe des Programmes ImageJ ausgewertet.

Am Anfang der Messung wurde die Skalierung des Screenshots festgelegt. Es wurde jeweils der Umfang sowie die Fläche der äußeren (Lamina elastica externa=LEE) und der inneren elastischen Lamina (Lamina elastica interna=LEI) gemessen. Falls eine Neointima zu sehen war, wurde diese auch vermessen und das Lumen bestimmt (Abbildung 8). Für die Messungen wurde das ImageJ-Tool „Polygon Selection“ verwendet, welches nach der manuellen Vermessung der Ebene deren Umfang und Fläche berechnete. Jede Ebene wurde individuell vermessen. Die Größe der Läsion sowie die Fläche der Media und der Neointima wurden wie folgt berechnet:

Fläche der Media = Fläche LEE – Fläche LEI

Fläche der Neointima = Fläche der LEI – Fläche des Lumens

Größe der Läsion = Fläche der Neointima/Fläche der Media

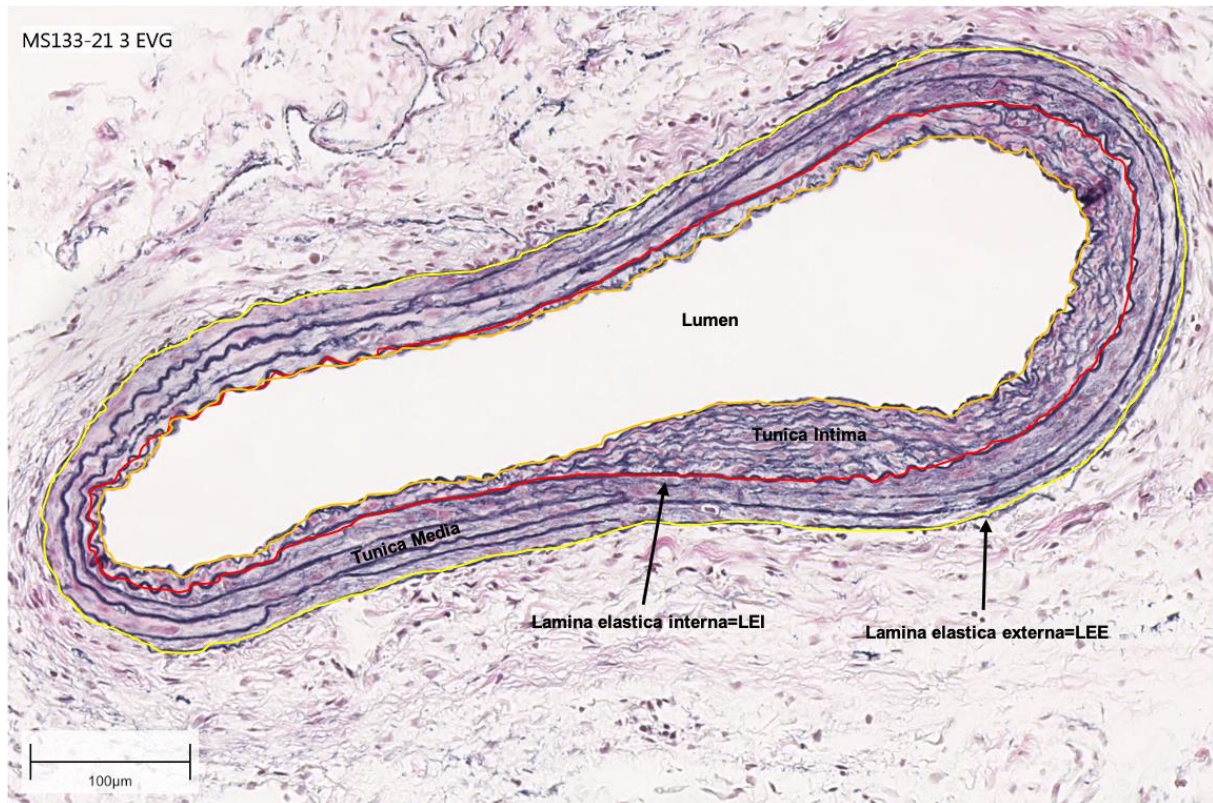


Abbildung 8 Beispiel der morphometrischen Auswertung; Eine Schnittebene der abdominalen Aorta von einer WT-Maus 28 Tage nach der Operation; EvG-Färbung; gelbe Linie: Lamina elastica externa (LEE); rote Linie: Lamina elastica interna (LEI); orange Linie: Abgrenzung des Lumens

4.3 Messungen der Genexpression mittels qPCR

4.3.1 RNA-Isolierung

Die Ribonukleinsäure (RNA) wurde unter Verwendung des RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit isoliert. Die Gefäßproben wurden mit einem Skalpell auf einem Objektträger zerkleinert und in ein 2 mL-Reaktionsgefäß überführt. Die Reaktionsgefäße enthielten jeweils 300 μL RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol sowie jeweils zwei Metallkugeln (Stainless Steel Beads, 7mm) und wurden auf Eis gekühlt. Zum Homogenisieren wurden die Proben für vier Zyklen bei 500 Hz à 5 min in den TissueLyser LT gestellt. Zwischen den Zyklen erfolgte eine fünfminütige Pause, während die Proben auf Eis und der Adaptereinsatz auf Trockeneis gekühlt wurden. Die homogenisierten Proben wurden in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß mit 590 μL RNase

freies Wasser+ 10 µL Proteinase K überführt. Daraufhin wurden die Proben erst für 30 min auf 55°C im Thermomixer inkubiert. Um die festen Gewebestandteile abzutrennen, wurden die Proben für fünf Minuten bei 10.000g zentrifugiert. In einem neuen 1,5 mL-Reaktionsgefäß wurde 450 µL 99% Ethanol vorgelegt und der Überstand der Probe hinzupipettiert und gemischt. 700 µL des Mixes wurden auf die Membran der Eluationssäule (RNeasy Mini Spin Column) transferiert und das Ganze für eine Minute auf 10.000g zentrifugiert. Dies wurde mit dem verbleibenden Überstand wiederholt und das Filtrat wurde jeweils verworfen. Danach wurde die Membran mit 350 µL RW1-Puffer gewaschen und durch eine weitere einminütige Zentrifugation entfernt. Anschließend erfolgte ein 30-minütiger DNase-Verdau bei Raumtemperatur, um die genomische DNA zu degradieren. Nach der Inkubation wurde die Membran noch einmal mit 350 µL RW1-Puffer sowie zweimalig mit je 500 µL RPE-Puffer mit jeweils einer einminütigen Zentrifugation auf 10.000g gewaschen. Die leeren Columns wurden noch einmal für drei Minuten auf 10.000g zentrifugiert, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen. Die RNA wurde durch Zugabe von 50 µL RNase-freiem Wasser und anschließender einminütiger Zentrifugation eluiert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben im Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt.

4.3.2 Messung der RNA-Konzentration

Die Konzentration der isolierten RNA-Menge wurde über die optische Dichte (OD) mittels des Epoch™ Spektralphotometers gemessen. Es wurden jeweils 2 µL der RNA-Lösung bzw. RNase-freies Wasser als Blank auf eine Mikrotiterplatte mit 16 Mikrosots aufgetragen. Mittels einer Datenanalyse-Software (Gen5™2.0) erfolgte die Auswertung der Messwerte. Die RNA-Konzentration wurde über die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetz in ng/µL bestimmt.

Neben der Konzentration der Gesamt-RNA liefert die photometrische Messung anhand des Verhältnisses der optischen Dichte bei 260 nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) bzw. 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) auch ein Maß für die Reinheit der Präparation. Hierfür wurde der Extinktionsquotient $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ gebildet. Ein Quotient zwischen 1,8 und 2,0 spricht für eine reine RNA-Isolierung [99].

$$E_{260} = \varepsilon_{260} \times c \times d \rightarrow c = \frac{E_{260}}{\varepsilon_{260} \times d}$$

Lambert-Beer'sches Gesetz

E: Extinktion bei 260nm

ε : RNA-spezifischer Extinktionskoeffizient bei 260nm

c: RNA-Konzentration in der Lösung (ng/ μ l)

d: Schichtdicke der Küvette (1cm)

4.3.3 cDNA-Synthese

Zur Synthese der komplementären DNA (cDNA) wurden die Reaktionsansätze unter Verwendung des cDNA-Kit (Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR) hergestellt. Es wurde ein Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von je 20 μ L hergestellt. Die Zusammenstellung ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2 Zusammensetzung des Reaktionsansatzes der cDNA-Synthese

Komponenten	Volumen (μ L)
RNA-Lösung (max. RNA-Gehalt 200 ng; ggf. Verdünnung mit RNase-freiem Wasser)	14
Reaktions-Mix (5X Reaction Mix)	4
Enzym-Mix (Maxima® Enzyme Mix)	2
Gesamt	20

Der Reaktionsansatz wurde gevortext, kurz zentrifugiert und die Synthesereaktion in einem PCR-Gerät durchgeführt. Zunächst erfolgte eine Inkubation bei 25°C für 10 Minuten, bei der die verwendeten Primer (oligo-(dT)18/randomisierte Hexamer-Primer) sich an die RNA-Sequenz anlagern (Annealing) können, danach folgte die reverse Transkription bei 50°C für 30 Minuten sowie ein Inaktivierungsschritt bei 85°C für 5 Minuten. Die cDNA wurde dann im PCR-Gerät auf 4°C gekühlt. Bis zur qPCR-Analyse wurde die cDNA bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

4.3.4 Quantitative Echtzeit-Polymerasenkettenreaktion

Die Methode der quantitativen Echtzeit-Polymerasenkettenreaktion (RT-qPCR) wird verwendet, um die gewonnene DNA zu quantifizieren. Mittels der fluoreszierenden Farbstoffe

SYBR Green (Rotor-Gene® SYBR® Green PCR Kit) kann das amplifizierte Produkt detektiert werden. Da SYBR Green an jede doppelsträngige DNA bindet, folgt eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität proportional zur Menge des Amplikons. Um die Konzentration der Zielgene zu errechnen, wurden die Kurvenverläufe des Ziel- und des Referenzgens verglichen und diese ins Verhältnis gesetzt. Als Referenzgen wurde die Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Die Auswertung der qPCR-Messungen wurde mit der Herstellersoftware (Rotor-Gene Q Series) durchgeführt. Die Anzahl der abgelaufenen Zyklen wurden auf der x-Achse aufgetragen und auf der y-Achse die Intensität der Fluoreszenz aufgetragen. Der Schwellenwert (threshold) wurde im linearen Bereich der exponentiell verlaufenden Kurve gesetzt und so der C_T -Wert (cycle threshold) für die PCR-Fragmente bestimmt. Der C_T -Wert beschreibt den Zyklus, bei dem der festgelegte Schwellenwert überschritten wird. Je kleiner der C_T -Wert ist, desto mehr Ziel-cDNA ist in der Probe vorhanden. Um eine Auskunft über die Spezifität der PCR-Reaktion zu erhalten, wurde die Schmelzkurvenanalyse eingesetzt. Jede Probe wurde in Triplikaten pipettiert und der Mittelwert der C_T -Werte bestimmt. Die maximale Abweichung der einzelnen C_T -Werte vom Mittelwert sollte nicht >0,5 sein, sonst wurde die Messung nochmals wiederholt.

Zunächst wurde für jede qPCR ein Mastermix angesetzt. Dieser Mix bestand aus 3 µL RNase-freiem Wasser, 5 µL SYBR Green Reaktionsgemisch und 1 µL Primergemisch (forward und reverse des Zielgenes) pro Reaktionsansatz. Der Mix (insgesamt 9 µL) wurde in das Reaktionsgefäß vorgelegt und jeweils 1 µL der zu analysierenden cDNA-Probe hinzugefügt. Die qPCR-Reaktion erfolgte nach den Bedingungen in Tabelle 3.

Tabelle 3 RT-qPCR Reaktionsprotokoll

qPCR-Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklus
Initiale Denaturierung	95°C	10min	1
Denaturierung	95°C	10sek	40
Primerhybridisierung	60°C	15sek	
Elongation	72°C	20sek	
Schmelzkurve	72°C-95°C	90sek pro 1°C	1

4.3.5 Datenanalyse der qPCR

Die Datenanalyse zur Bestimmung der Rohdaten der qPCR-Messungen wurde mit Hilfe der Rotor Gene Software durchgeführt.

Die Auswertung der Rohdaten der qPCR-Messung erfolgte mit Microsoft Excel, unter Verwendung der folgenden Formel:

$$\text{Zielgen (\%GAPDH)} = 2^{-(C_T(\text{Zielgen})-C_T(\text{GAPDH}))} \times 100$$

Die Expression des Zielgens wurde auf die Expression von GAPDH (Referenzgen) normalisiert und in Prozent angegeben.

Für die Berechnung wurde jeweils der Mittelwert der drei gemessenen C_T -Werte verwendet. Wenn die Standardabweichung der C_T -Werte größer als 0,5 war, wurde die Messung wiederholt.

4.4 Analyse von Genexpressionen mittels Mikroarray

4.4.1 Mikroarray Analyse

Die Mikroarray Analyse wurde im Functional Genomics Core Laboratory am Center for Ecogenetics and Environmental Health/ Institute of Translational Health Sciences an der University of Washington durchgeführt. Die Analyse wurde mit der Affymetrix GeneChip Mouse Gene 1.0 ST-Plattform durchgeführt. Der Affymetrix GeneChip Mouse Gene 1.0 ST-Array besteht aus mehr als 750.000 einzigartigen 25-mer Oligonukleotid-Merkmalen, die mehr als 28.000 SONDENSÄTZE auf Genebene bilden. Für diese Analyse wurden *S1pr3*^{+/+} und *S1pr3*^{-/-} Mäuse an der Iliofemoralarterie denudiert, 4 Tage nach der Verletzung seziiert und die Iliofemoralarterie entnommen. Eine Probe bestand jeweils aus 10-12 Iliofemoralarterien. Es wurden jeweils 4 Proben der verletzten und unverletzten Iliofemoralarterien vermessen. Pro Pool wurde eine Ausbeute von 2 µg Gesamt-RNA erwartet. Die Qualität der Gesamt-RNA wurde mit einem Agilent 2100 Bioanalyzer bewertet und nur Proben mit hoher Integrität, Quantität und einem A260:A280-Verhältnis von 1,8 - 2,1 wurden für die weitere Analyse verwendet. Die Probenvorbereitung wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

4.4.2 Auswertung der Array Chip Daten

Die Daten wurden zuerst mit der Affymetrix GCOS-Software analysiert. Mithilfe des GCOS-Algorithmus für statistische Expression wurden die Transkripte quantifiziert und die Arraydaten verglichen, um relative Veränderungen des Expressionsniveaus zu ermitteln. Es wurden insgesamt 28.000 Gene ermittelt, die in diesem Mausmodell reguliert wurden. Im weiteren Schritt wurden nur die Gene betrachtet, die sich in der Iliofemoralarterie zwischen *S1pr3+/+* und *S1pr3-/-* Mäusen signifikant unterschieden. Diese Gene wurde die Array Exon-ID in die DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) Bioinformatik Datenbank eingefügt und eine Pathway Analyse durchgeführt.

4.5 Studiendesign und Auswahl der Subgruppe

Im Rahmen der epidemiologischen, prospektiven Kohortenstudie „Die Rolle des Sphingosin-1-phosphat und seiner Rezeptoren in der Atherosklerose und Restenose“ der Klinik für Gefäßmedizin (Universitäres Herz- und Gefäßzentrum Hamburg, Untersuchungsleiter: Prof. Dr. A. Larena-Avellaneda) wurden in dem Zeitraum von 2014 bis 2019 insgesamt 330 Patienten eingeschlossen. Alle eingeschlossenen Patienten litten an einer klinisch relevanten, atherosklerotisch bedingten Durchblutungsstörung der A. carotis oder der Beinarterien. Die Patienten wurden gemäß den Leitlinien behandelt. Bei Einschluss der Patienten in die Studie wurde eine Blutabnahme durchgeführt. Es wurde neben den Routine-Laborparametern auch S1P im Serum und EDTA-Plasma bestimmt. Eine erneute Blutabnahme wurde nach der chirurgischen Intervention durchgeführt. Folgende Laborparameter wurden nach standardisierten Methoden im Zentrallabor des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bestimmt: Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten, Monozyten, Neutrophile, Eosinophile, Gesamtcholesterin, HDL, LDL und Triglyceride. Für die Auswahl der hier analysierten Subgruppe wurden die Serum-S1P Ausgangswerte herangezogen. Die Serum-S1P Werte wurden in 2 Gruppen eingeteilt, in eine Gruppe von Patienten mit niedrigen S1P Werten und eine Gruppe von Patienten mit hohen S1P Werten eingeteilt. Davon wurden insgesamt 40 Patienten zufällig ausgewählt, 20 davon in der Gruppe der niedrigen S1P-Werte und 20 mit hohen S1P-Werten. Von diesen 40 Patienten wurden zusätzlich die Zytokine *IL1B*, *IL10* und *CCL2* im Blut bestimmt. Ob die Stenose in der A. carotis oder in den Beinarterien lokalisiert war wurde bei der Auswahl nicht berücksichtigt.

4.6 Bestimmung der S1P-Konzentration

Die Quantifizierung erfolgte mittels der Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS).

4.6.1 Kalibrierung und Probenaufarbeitung

Vor der Verwendung wurden alle Pipettenspitzen und Mikrotiterplatten silikonisiert. Sigmacote® wurde mit den Pipettenspitzen aufgenommen und in die Mikrotiterplatten pipettiert und wieder entleert. Danach wurde alles mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend über Nacht bei 60°C im Trockenschrank getrocknet.

Für jede Mikrotiterplatte wurden Kalibratoren 0 µM, 0,1 µM, 0,3 µM, 1 µM und 3 µM hergestellt. Diese wurden durch eine entsprechende Verdünnung der S1P-Stammlösung (1 mg/mL) mit Albumin aus Rinderserum (BSA, 1 mg/mL) hergestellt.

Zur Probenvorbereitung wurden jeweils 20 µL der biologischen Proben bzw. der Kalibratoren in ein 1,5 mL low-binding Tube pipettiert, 20 µL des internen Standards ([16,17,18-²H₇]-S1P (S1P-*d*₇), 1µM) und 350 µL 80% Acetonitril hinzugefügt, damit die Probe deproteinisiert wurde. Anschließend wurde das Tube gründlich gevortext und für 15 min bei 10.000g und 4°C zentrifugiert. 200 µL des Überstandes wurden in jeweils ein Well der 96-well-Mikrotiterplatte transferiert.

4.6.2 Messung mit der Flüssigkeitschromatographie / Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)

12 µL des Überstandes wurden mit Hilfe einer Nadel des Autosamplers aufgenommen und über die Trennsäule (Zorbax SB-C8-Säule, 2.1 x 50 mm, Agilent Technologies) fraktioniert. Die Proben wurden mit einem binären Gradienten (0,1% wässriger Ameisensäure, Acetonitril/Methanol) eluiert. Die Messung wurde mit einem Fließmittelgradienten von 60%/20%/20% (0,1% wässrige Ameisensäure/Acetonitril/Methanol) gestartet, dieser änderte sich kontinuierlich im Laufe der Messung auf eine Zusammensetzung von 5%/47,5%/47,5% und am Ende der Messung hatte das Fließmittel wieder seine Ausgangszusammensetzung (60%/20%/20%) erreicht. Die Fließgeschwindigkeit betrug 0,35 mL/min und die Gesamtmesszeit belief sich auf 6 min.

Nach der chromatographischen Trennung wurden die Analyten im Tandem-Massenspektrometer detektiert. Die Analyten wurden in der Ionenquelle ionisiert (positive Elektrospray-Ionisation, ESI+). Die geladenen Moleküle werden im Massenanalysator nach ihre Massen-zu-Ladungsverhältnis (m/z) separiert und schließlich durch die Kollision mit dem Edelgas Argon fragmentiert. S1P (m/z 380) wurde in sein Tochterion mit dem Massen-zu-Ladungsverhältnis 264 fragmentiert und S1P-d7 (m/z 387) in das Tochterion m/z 271 fragmentiert. Diese Fragmente wurden in einem weiteren Massenanalysator separiert und im Sekundärionenmultiplier detektiert (Varian L1200 MS/MS, Agilent Technologies).

4.6.3 Auswertung

Die Peakflächen der Analyten wurden mit der Software MS Data Review berechnet. Zunächst wurde das Verhältnis der Peakflächen der Kalibratoren und dem internen Standard berechnet und eine Kalibrationsgerade erstellt. Die Steigung der Kalibrationsgerade wurde zur Ermittlung der S1P-Konzentration der Proben verwendet.

$$S1P - \text{Konzentration } [\mu\text{M}] = \frac{\frac{AUC \text{ S1P}}{AUC \text{ IS}}}{\text{Steigung } \left[\frac{1}{\mu\text{M}} \right]}$$

AUC S1P: Peakfläche S1P

AUC IS: Peakfläche des internen Standards (S1P-d7)

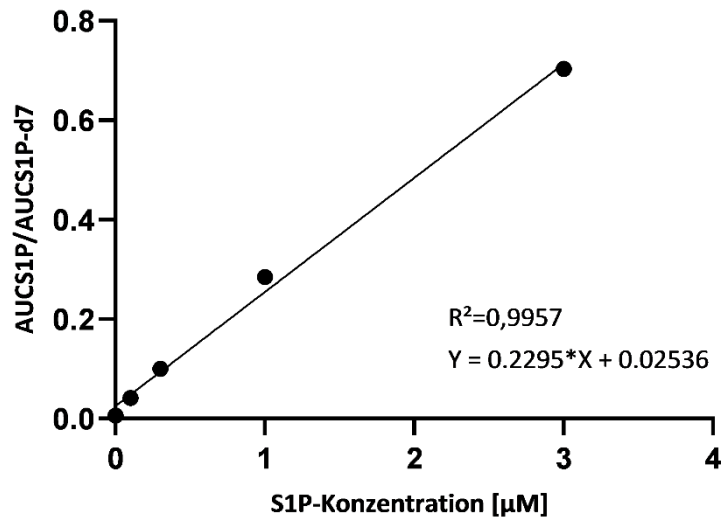


Abbildung 9 Beispiel einer Kalibriergerade zur Bestimmung der S1P-Konzentration; Ordinate: Peakflächenverhältnis von S1P und S1P-d7 der Kalibratoren; Abszisse: S1P-Konzentration der Kalibratoren; Angabe von der Gleichung der linearen Regressionsgerade und des Bestimmtheitsmaßes R^2

4.7 Bestimmung der Zytokine der Subgruppe

Die Messungen der Zytokine wurden im Max-Planck-Institut Bad Nauheim von Frau Dr. Kerstin Troidl durchgeführt. Die Proben wurden mit Hilfe eines Bead-basierten Multiplex-Assays, der gleichzeitig mehrere Zytokin-Biomarker bestimmen kann, analysiert. Die Methode basiert auf fluoreszenzkodierte magnetische Beads, den MagPlex®-C-Mikrosphären, die an die Proben binden. Die 96-well Platte wurde nach Herstellerprotokoll präpariert. Von den jeweiligen gemessenen Zytokinen (*IL1B*, *IL10*, *CCL2*) wurden für die Kalibration jeweils Standards in bestimmten Konzentrationen (0, 3,2, 16, 80, 400, 2000 und 10000 pg/mL) hergestellt. Zuerst wurde die 96-well Platte mit 200 µL Waschpuffer für 10 min gewaschen und der Waschpuffer anschließend entfernt. Danach wurden 25 µL der Standardlösungen in die entsprechenden Wells pipettiert und zusätzlich 25 µL Matrixlösung hinzugefügt. In die Proben-Wells wurde erst 25 µL Assay Puffer hinzugefügt und danach 25 µL der Blutproben hineinpipettiert. Anschließend wurden in jedes Well 25 µL Beads, die mit einem spezifischen Antikörper beschichtet sind, hinzugefügt und die Platte unter Schütteln für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, damit die zu analysierende Antikörper der Probe an die codierten Beads binden können. Nach der Inkubation wurde der Inhalt der Wells entfernt und zweimal mit 200 µL Waschpuffer gewaschen. Danach wurden 25 µL der Detektionsantikörper in die Wells pipettiert und für eine Stunde unter ständigem Schütteln bei Raumtemperatur

inkubiert. Als nächsten Schritt wurden 25 µL Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat, das Fluoreszenzreportermolekül, das die Reaktion auf der Oberfläche jedes Beads beendet, hinzugefügt und weitere 30 min unter ständigem Schütteln inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde die Platte nochmals zweimal mit 200 µL Waschpuffer gewaschen, um nicht gebundenes Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat zu entfernen. Anschließend wurde 150 µL xMAP® Trägerflüssigkeit PLUS als Fördermedium für den Transport der Probe zur Instrumentenoptik hinzugefügt und nochmals für 5 min geschüttelt. Danach wurde die Platte mittels Luminex® Analyser analysiert.

4.8 Statistische Analyse

Die Analyse der Ergebnisse der Mausexperimente wurde mit der Software GraphPad Prism® 8 durchgeführt. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) dargestellt. Der Vergleich zweier Gruppen (*S1pr3*^{-/-} und *S1pr3*^{+/+}) wurde mit dem ungepaarten Student t-test analysiert und nach Holm-Šidák korrigiert. Für Vergleiche von mehr als zwei Gruppen wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt und als Post-hoc Test ein Dunnett Test verwendet. Ein p-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

Die Analyse der Studiendaten wurde mit IBM SPSS Statistics 28 und GraphPad Prism® 8 durchgeführt. Der Vergleich zweier Gruppen wurde entweder mit einem Mann-Whitney Test (Vergleich Gesamtkohorte und Subgruppe) oder mit einem Wilcoxon-Test analysiert (Vergleich prä- und postoperative Ergebnisse) analysiert. Die Assoziationen wurden durch Berechnung des Spearman Korrelationskoeffizienten analysiert.

5 Ergebnisse

Im ersten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob sich die *S1pr3*^{+/+} und *S1pr3*^{-/-} Mäuse nach Abklemmen der abdominalen Aorta in der Ausbildung der Intimahyperplasie unterscheiden und welche Gene nach der Verletzung in Abhängigkeit von *S1pr3* reguliert sind.

5.1 *S1pr3*^{+/+} Mäuse entwickeln größere Läsionen als *S1pr3*^{-/-} Mäuse

Zur Beantwortung der Fragestellung, welche Rolle *S1pr3* bei der Intimahyperplasie in der abdominalen Aorta der Maus spielt, wurden die *S1pr3*^{-/-} Mäuse und *S1pr3*^{+/+} Mäuse histologisch untersucht (Abbildung 10). Es wurde dafür die abdominale Aorta von 13 *S1pr3*^{+/+} Mäusen und 14 *S1pr3*^{-/-} Mäusen jeweils an 4 Stellen für 2 min mit einer 1,75 mm breiten „strong pressure“ Gefäßklemme abgedrückt und dies dreimal wiederholt. Nach 28 Tagen wurden die Mäuse getötet, sezirt und die abdominale Aorta, wie in Abschnitt 4.1.3, beschrieben präpariert. Die Aorta wurde in 10 Abschnitte aufgeteilt, davon sind fünf dem distalen und fünf dem proximalen Teil der Aorta zu zuordnen.

Ergebnisse

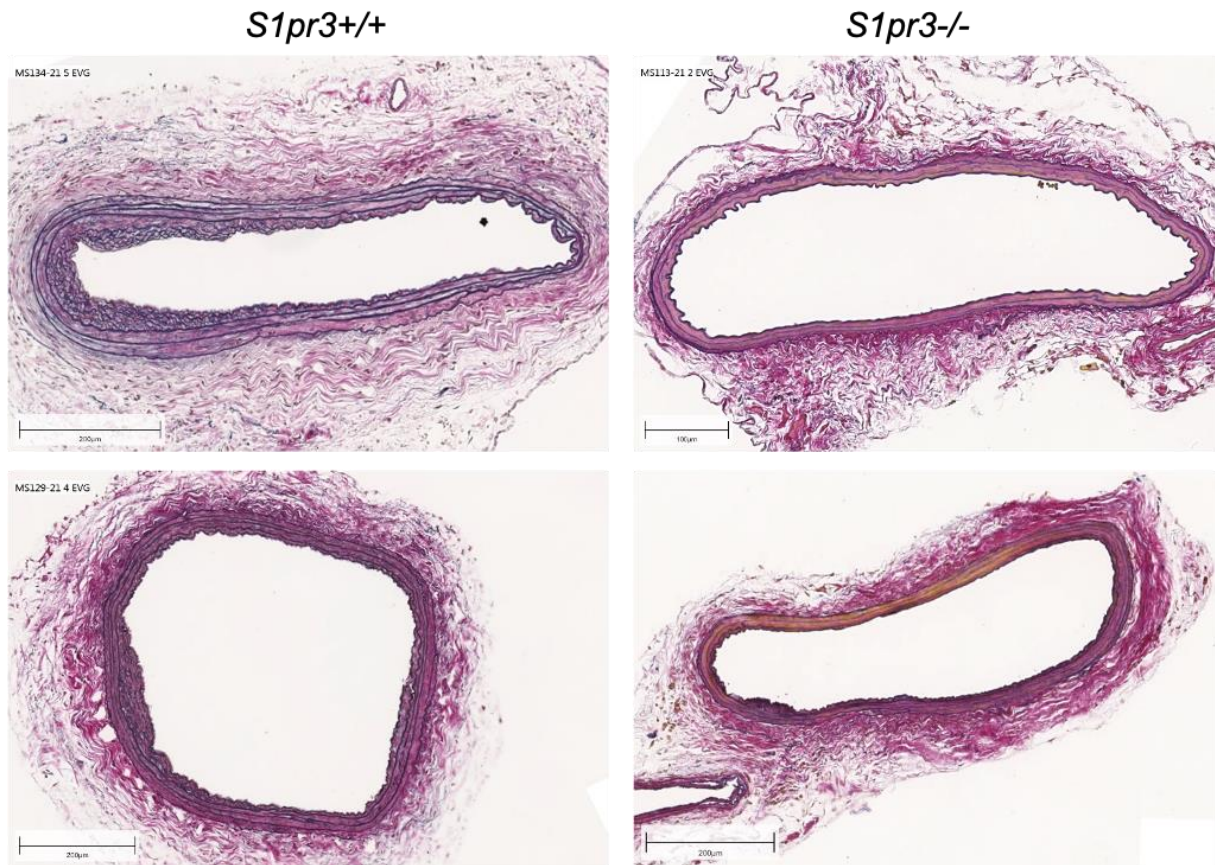


Abbildung 10 Histologische Bilder der abdominalen Aorta von *S1pr3+/+* und *S1pr3-/-* Mäusen; Links: zwei ausgewählte Beispielbilder der *S1pr3+/+* Mäuse mit stark ausgeprägter Intimahyperplasie; Rechts: zwei ausgewählte Beispielbilder der *S1pr3-/-* Mäuse mit geringer bis keiner Ausbildung einer Intimahyperplasie; EvG-Färbung; Maßstab: 200µm

Für die statistische Analyse wurde die Bedingung gestellt, dass mindestens 6 Schnitte auswertbar und davon mindestens drei im distalen und drei im proximalen Teil vorhanden sein müssen. Für die Auswertung konnten deshalb 11 der *S1pr3+/+* Mäuse und 12 der *S1pr3-/-* Mäuse verwendet werden. Um einen Vergleich der Größe der Läsionen zwischen den zwei Maustypen zu ermöglichen, wurden die Mittelwerte des Quotienten aus Intima und Media (I/M-Verhältnis) pro Maus gegenübergestellt. Hier konnte gezeigt werden, dass durch das Klemmen der abdominalen Aorta die *S1pr3+/+* Mäuse signifikant größere Läsionen als die *S1pr3-/-* Mäuse ausbilden ($P=0,0015$, Abbildung 11A). Daneben wurde noch die Verteilung der entstandenen Intimahyperplasie im Gefäß beurteilt. Es wurden die nachweisbaren Läsionen pro Abschnitt gezählt (1=Läsion; 0=keine Läsion) und diese dann zu den jeweiligen Abschnitten (1: proximales Ende; 10: distales Ende) aufgetragen (Abbildung 11B). Der Graph zeigt, dass in den *S1pr3+/+* Mäusen die Zahl der Läsionen relativ gleich verteilt war. Bei den *S1pr3-/-* Mäusen sah man eine größere Anzahl an Läsionen im mittleren proximalen Teil (Abschnitt 3

Ergebnisse

und 4) als im distalen Teil der abdominalen Aorta. Zum Anderem wurde das mittlere I/M-Verhältnis pro Abschnitt bestimmt und diese wieder der Position des Abschnittes zugeordnet (Abbildung 11C). Hier war deutlich zu sehen, dass in den *S1pr3*^{+/+} Mäusen größere Läsionen im proximalen Teil als im distalen Teil waren. Bei den *S1pr3*^{-/-} Mäusen ist kein Unterschied zwischen den verschiedenen Abschnitten zu sehen.

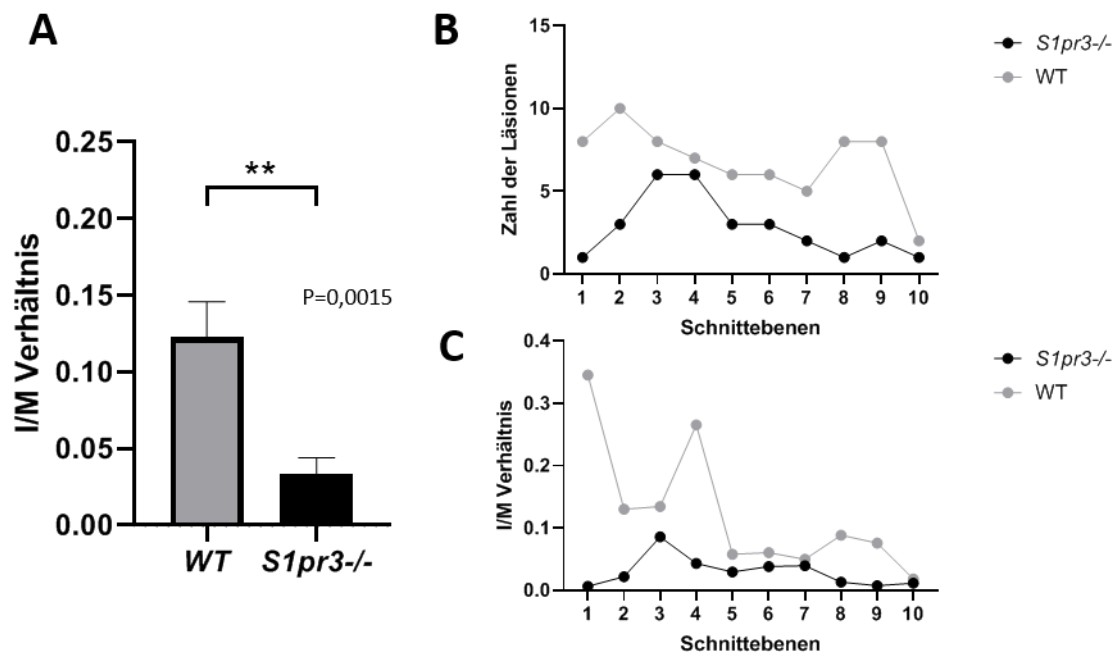


Abbildung 11 Morphometrische Analyse der histologischen Schnitte; A: Das I/M Verhältnis von *S1pr3*^{+/+} und *S1pr3*^{-/-} Mäusen; B: Zahl der Läsionen pro Schnittebene (1-10) von *S1pr3*^{+/+} und *S1pr3*^{-/-}; C: Das mittlere I/M Verhältnis pro Schnittebene (1-10); WT: Wildtyp; ** $P < 0,01$; 2-seitiger T-test (*S1pr3*^{+/+} und *S1pr3*^{-/-})

5.2 Genexpression in der abdominalen Aorta zu verschiedenen Zeitpunkten

Zur Fragestellung, welche Gene nach der Verletzung in *S1pr3* defizienten- und Wildtyp-Mäusen unterschiedlich exprimiert werden, wurde wie in Abschnitt 4.1.3 beschrieben, die Adventitia von der Media getrennt und die Expression der verschiedenen Gene im jeweiligen Gewebe mittels RT-qPCR bestimmt. Für die Messungen wurden jeweils die Aorten von zwei Mäusen gepoolt. Um den zeitlichen Verlauf der Genexpression zu untersuchen, wurden die Tage 4, 7, 14 und 21 nach der Verletzung, sowie als Baseline nicht-operierte Mäuse gewählt. Die Expression der Gene ist in Prozent *Gapdh* angegeben, welches als Referenzgen verwendet wurde.

5.2.1 Expression der S1P-Rezeptoren und der Sphingosinkinase 1

Bei den *S1pr3*^{+/+} und *S1pr3*^{-/-} Mäusen wurde zuerst untersucht, ob das Fehlen des *S1pr3* Auswirkungen auf die Expression von *S1pr1* und *S1pr2* hat.

S1pr1 (Abbildung 12A, B) und *S1pr2* (Abbildung 12C, D) waren bei unseren Mäusen in der Adventitia im Vergleich zur Media höher exprimiert. In der Adventitia zeigte sich eine leichte Verringerung der Expression von *S1pr1* bei beiden Mauslinien an Tag 4 im Vergleich zu den Baseline-Werten (nicht signifikant), die nach Tag 7 auf den Baseline-Wert wieder anstieg (Abbildung 12A). Die Expression des *S1pr2* in der Adventitia blieb über die verschiedenen Zeitpunkte konstant (Abbildung 12C). Es war kein Unterschied zwischen *S1pr3*^{+/+} und *S1pr3*^{-/-} zu sehen. Wohingegen in der Media die *S1pr1* Expression bei den *S1pr3*^{+/+} und *S1pr3*^{-/-} Mäusen einen leichten Trend zu einer erhöhten Expression am 4. Tag nach Klemmen der abdominalen Aorta im Vergleich zur Baseline zeigte und wieder einen Abfall der Expression am Tag 7 (Abbildung 12B und D). In den *S1pr3*-defizienten Mäusen war der Anstieg zwischen Baseline und 4 Tagen und Abfall zwischen 4. und 7. Tage jeweils statistisch signifikant. Bei den *S1pr3*^{+/+} Mäusen war keine statistisch signifikante Veränderung zu sehen, wobei der Kurvenverlauf ähnlich wie bei den *S1pr3*-defizienten Mäusen ist. Die Expression des *S1pr2* in der Media zeigte, dass in den *S1pr3*^{+/+} Mäusen die Expression über die Zeitpunkte konstant blieb. Bei den *S1pr3*^{-/-} Mäusen war ein Anstieg der *S1pr2* Expression in der Media zu beobachten. Von Baseline zu Tag 21 ist ein signifikanter Unterschied zu sehen. An Tag 21 war in den *S1pr3*^{-/-} Mäusen der *S1pr2* 4-mal höher exprimiert als in den *S1pr3*^{+/+} Mäusen am Tag 21 ($P < 0,001$, Abbildung 12D).

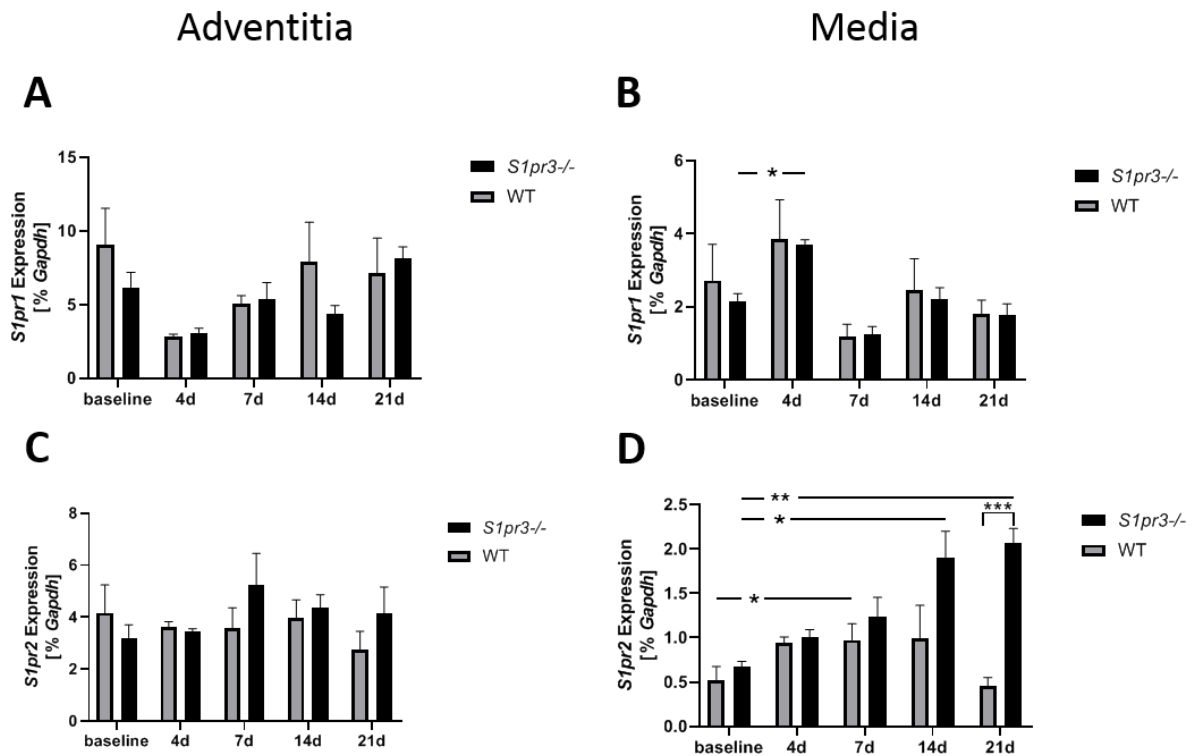


Abbildung 12 *S1pr1* und *S1pr2* Expression in der Adventitia und Media der abdominalen Aorta im Zeitverlauf; A: Expression von *S1pr1* in der Adventitia; B: Expression von *S1pr1* in der Media; C: Expression von *S1pr2* in der Adventitia; D: Expression von *S1pr2* in der Media; n= 5 Pools á 2 Aorten; ±SEM; WT: Wildtyp *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; 2-seitiger T-test (*S1pr3*^{+/+} und *S1pr3*^{-/-}) und Two-way ANOVA (baseline vs. 4d o. 7d o. 14d o. 21d)

Weiterhin wurden in den *S1pr3*^{+/+} Mäusen auch die Expression von *S1pr3* bestimmt. In der Adventitia zeigte sich keine Veränderung über den Zeitraum (Abbildung 13A). In der Media sah man eine verringerte Expression an Tag 4 (nicht signifikant zwischen Baseline und Tag 4), die dann im Vergleich zu Tag 4 an Tag 14 und 21 anstieg (Abbildung 13B).

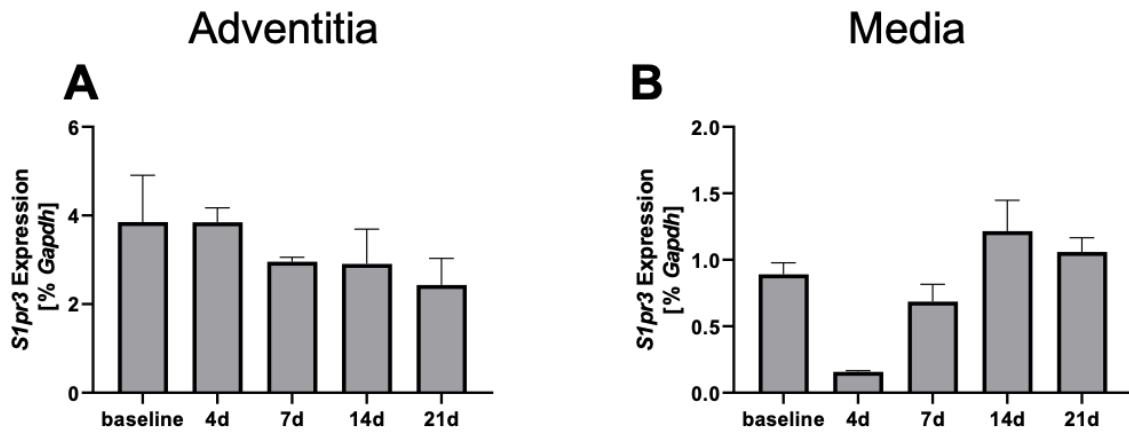


Abbildung 13 *S1pr3* Expression in der Adventitia und Media der abdominalen Aorta im Zeitverlauf; A: Expression von *S1pr3* in der Adventitia; B: Expression von *S1pr3* in der Media n= 5 Pools á 2 Aorten; ±SEM; Two-way ANOVA (baseline vs. 4d o. 7d o. 14d o. 21d)

Die Expression der Sphingosinkinase 1 (*Sphk1*), die neben der Sphingosinkinase 2, Sphingosin phosphoryliert, stieg in der Media 4 Tage nach der Operation um mehr als das Doppelte im Vergleich zu nicht-operierten Mäusen an, sank dann aber wieder ab. An Tag 21 zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen *S1pr3*^{-/-} und *S1pr3*^{+/+} (Abbildung 14B). In der Media exprimierten die *S1pr3*^{-/-} Mäuse an Tag 21 mehr als doppelt so viel *Sphk1* im Vergleich zu den *S1pr3*^{+/+} Mäusen. In der Adventitia blieb die Expression von *Sphk1* relativ konstant (Abbildung 14A).

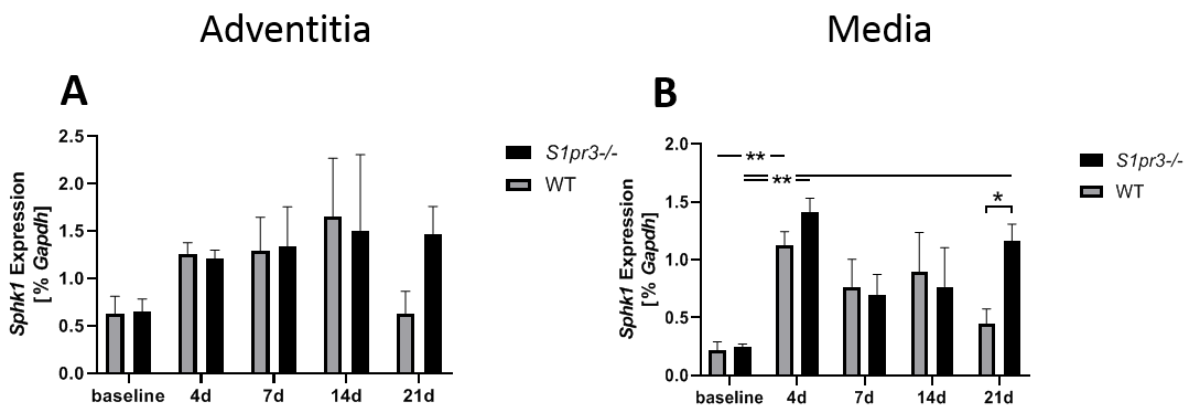


Abbildung 14 *Sphk1* Expression in der Adventitia und Media der abdominalen Aorta im Zeitverlauf; A: Expression von *Sphk1* in der Adventitia; B: Expression von *Sphk1* in der Media n= 5 Pools á 2 Aorten; ±SEM; WT: Wildtyp; *P<0,05; **P<0,01; 2-seitiger T-test (*S1pr3*^{+/+} und *S1pr3*^{-/-}) und Two-way ANOVA (baseline vs. 4d o. 7d o. 14d o. 21d)

5.2.2 Verletzung der abdominalen Aorta führte zum Verlust vom SMC-Zellmarker

Als Zellmarker für die SMCs wurden MYH11 und SMA (auch ACTA2 genannt) verwendet. SMCs sind unter anderem ein wichtiger Bestandteil der Blutgefäßwände; sie unterstützen deren Struktur, regulieren den Gefäßtonus und spielen eine wichtige Rolle beim Gefäßumbau [100]. Die Fähigkeit der SMCs einen Tonus zu erzeugen, hängt von der Interaktion zwischen den wichtigen kontraktilen Proteinen, α -Smooth Muscle Aktin (ACTA2 bzw. SMA) und Myosin Heavy Chain (MYH11), ab [100], [101]. SMA wird nicht nur in SMCs exprimiert, sondern kann auch in Skelettmuskelzellen, in ausdifferenzierten Kardiomyozyten, in Fibroblasten und in Endothelzellen während des Gefäßumbaus stark exprimiert sein, im Gegensatz dazu ist die Expression von MYH11 eher auf die SMCs beschränkt [102].

In der Media nicht-operierter Mäuse (Baseline) war die Expression beider Gene mehr als doppelt so hoch im Vergleich zur Adventitia. Vier Tage nach Klemmen der Aorta sah man sowohl in der Media, als auch in der Adventitia eine starke Reduktion der Expression von *Myh11* und *Sma*. (Abbildung 15A-D) Auch nach 21 Tagen blieb bei beiden Genen die Expression auf einem niedrigen Niveau im Vergleich zu den Ausgangswerten. Es war kein Unterschied zwischen *S1pr3+/+* und *S1pr3-/-* Mäusen zu sehen.

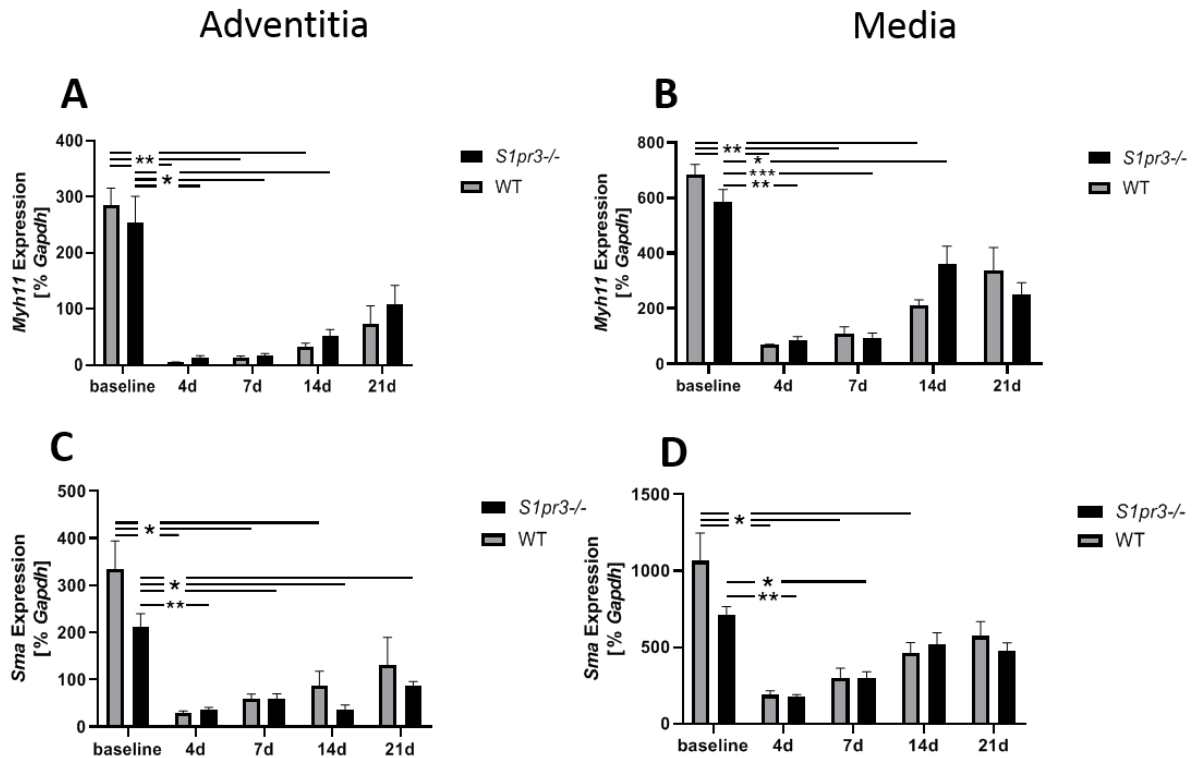


Abbildung 15 *Myh11* und *Sma* Expression in der Adventitia und Media der abdominalen Aorta im Zeitverlauf; A: Expression von *Myh11* in der Adventitia; B: Expression von *Myh11* in der Media; C: Expression von *Sma* in der Adventitia; D: Expression von *Sma* in der Media; n= 5 Pools á 2 Aorten; WT: Wildtyp; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ±SEM; 2-seitiger T-test (*S1pr3*^{+/+} und *S1pr3*^{-/-}) und Two-way ANOVA (baseline vs. 4d o. 7d o. 14d o. 21d)

5.2.3 Expression des Stammzellmarkers *Sca-1* und des Makrophagen/Monozyten Markers *Cd68*

Das Antigen SCA1 (oder auch Lymphozyten Antigen 6 Komplex, Locus A/E (Ly6-A/E)) ist ein an Phosphatidylinositol verankertes glykosyliertes Protein der Zelloberfläche von murinen Stammzellen, das bisher kein direktes menschliches Pendant hat. Bei Mäusen ist es zusammen mit der Tyrosinkinase c-Kit ein etablierter Marker zur Identifizierung hämatopoetischer Stammzellen [103]. SCA1 wird auf hämatopoetischen Stammzellen, Vorläuferzellen, aktivierten T-Zellen aber auch einigen nicht-hämatopoetischen Zellen wie Fibroblasten und diverse Tumorzellen exprimiert [104].

Sca1 war vor allem in der Adventitia exprimiert, bei den Wildtyp Mäusen bis zu 15mal und den *S1pr3*^{-/-} Mäusen etwa 5mal höher als in der Media. In der Adventitia sah man einen Trend zu niedrigerer Expression bei nicht-operierten *S1pr3*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu nicht-operierten Wildtyp-Mäusen (nicht-signifikant; P= 0,07) (Abbildung 16A). Am Tag 4 nach der Verletzung zeigte sich die geringste Expression des *Sca1* in den Wildtyp Mäusen, die danach wieder auf

Ergebnisse

den Baseline-Wert anstieg. In der Media blieb die *Sca1* Expression der *S1pr3+/+* Maus relativ konstant (Abbildung 16B). Bei den *S1pr3-/-* Mäusen sah man einen Trend zu höheren *Sca1* Expressionen über den Zeitraum, die an Tag 14 signifikant war. Sowohl in der Media als auch in der Adventitia konnte man keinen Unterschied zwischen *S1pr3+/+* und *S1pr3-/-* erkennen.

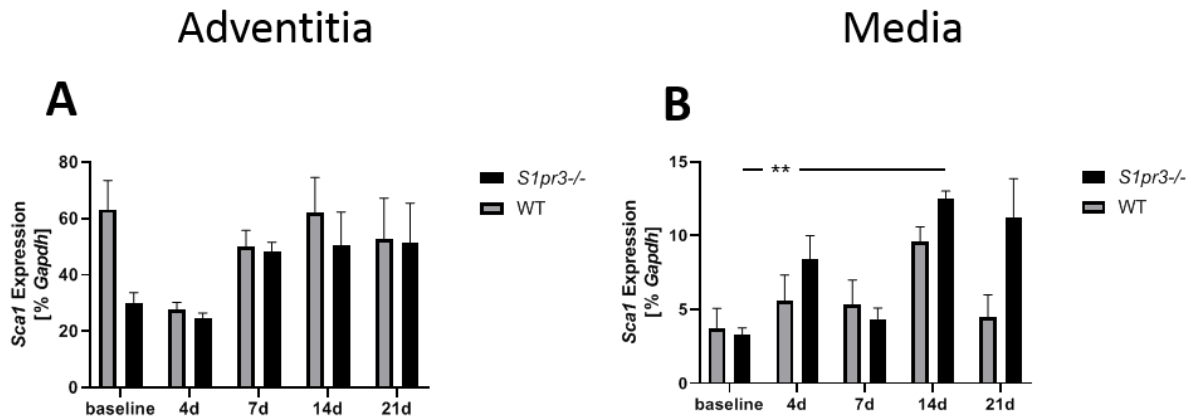


Abbildung 16 *Sca1* Expression in der Adventitia und Media der abdominalen Aorta im Zeitverlauf; A: Expression von *Sca1* in der Adventitia; B: Expression von *Sca1* in der Media; n= 5 Pools á 2 Aorten; ±SEM; WT: Wildtyp; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; 2-seitiger T-test (*S1pr3+/+* und *S1pr3-/-*) und Two-way ANOVA (baseline vs. 4d o. 7d o. 14d o. 21d)

Als Makrophagen/Monozyten-Marker wurde CD68 in den Geweben gemessen. CD68 ist ein stark glykosyliertes Typ-I-Transmembranglykoprotein, das in Makrophagen und anderen mononukleären Phagozyten stark exprimiert wird [105]. Die Aktivierung von Makrophagen geht mit einer Umgestaltung der Zelloberfläche einher. Es wurde nachgewiesen, dass CD68 in den Makrophagen bei Inflammation stark erhöht ist und auch an der Veränderung der Zellmembran beteiligt ist [106].

In den nicht-operierten Mäusen war *Cd68* nur in geringer Menge exprimiert im Vergleich zu den operierten Mäusen. Nach der Operation stieg in der Adventitia die *Cd68*-Expression an Tag 4 auf das 10-fache des Ausgangswertes (Baseline) an. 21 Tage nach der OP verringerte sich die Expression wieder, ist aber immer noch um ein Vierfaches erhöht im Vergleich zum Baseline-Wert (Abbildung 17A). In der Media stieg die Expression langsamer an und hat ihren Höhepunkt am Tag 7 und war nicht so stark ausgeprägt wie in der Adventitia. Bis Tag 21 blieb die Expression von *Cd68* hier relativ konstant (Abbildung 17B). Hier war kein Unterschied zwischen *S1pr3-/-* und *S1pr3+/+* Mäusen zu sehen.

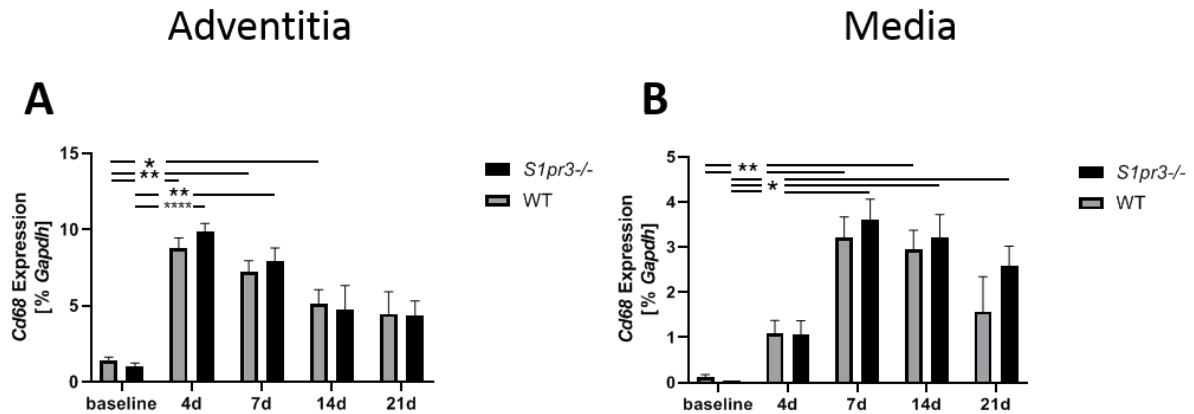


Abbildung 17 *Cd68* Expression in der Adventitia und Media der abdominalen Aorta im Zeitverlauf; A: Expression von *Cd68* in der Adventitia; B: Expression von *Cd68* in der Media; n= 5 Pools á 2 Aorten; ±SEM; WT: Wildtyp; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001; 2-seitiger T-test (*S1pr3*^{+/+} und *S1pr3*^{-/-}) und Two-way ANOVA (baseline vs. 4d o. 7d o. 14d o. 21d)

5.2.4 Expression von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen

Die Auswahl der pro- und antiinflammatorischen Zytokine erfolgte durch die in Abschnitt 4.4 beschriebene Mikroarray Analyse. In dieser Analyse zeigte sich, dass bei der Denudation der A. iliofemoralis bestimmte Gene sich zwischen *S1pr3*^{-/-} und *S1pr3*^{+/+} Mäusen unterschieden. Insgesamt waren es 1769 Gene, die sich signifikant zwischen *S1pr3*^{-/-} und *S1pr3*^{+/+} Mäuse unterschieden, davon waren 749 Gene, die in der verletzten Wildtyp-Maus im Vergleich zur *S1pr3*-defizienten Maus hochreguliert waren, und 1020 Gene, die in der verletzten *S1pr3*-defizienten Maus im Vergleich zur Wildtyp-Maus hochreguliert waren. Die KEGG-Pathway Analyse zeigte ein signifikantes Ergebnis des Zytokin-Zytokin Pathways und darin eine signifikante Veränderung der Zytokine *Ccl2*, *Il1b*, *Il10* und *Gdf15*. Trotz des unterschiedlichen Verletzungsmodells und auch des anderen Gefäßbettes könnte diese Analyse einen Hinweis auf die Art der Zytokine sein, die in Abhängigkeit von S1PR3 reguliert werden können.

In der Mikroarray Analyse zeigte sich an Tag 4 nach der Denudation der Iliofemoralarterie der *S1pr3*^{-/-} und *S1pr3*^{+/+} Mäuse, dass *Il1b* in *S1pr3*^{+/+} Mäusen höher exprimiert war als in den *S1pr3*^{-/-} Mäusen. Für *Il10*, *Ccl2* und *Gdf15* zeigte sich, dass diese Zytokine in den *S1pr3*^{-/-} Mäusen höher exprimiert waren als in den *S1pr3*^{+/+} Mäusen (Tabelle 4).

Ergebnisse

Tabelle 4 log₂ Robust Mikro-Array Average (RMA) Mittelwerte der Mikroarray Analyse der denudierten Iliofemoralarterie von *S1pr3*^{-/-} und *S1pr3*^{+/+} Mäusen 4 Tage nach der Verletzung; ΔRMA: Differenz zwischen *S1pr3*^{-/-} und *S1pr3*^{+/+}

	<i>S1pr3</i> ^{-/-} log ₂ RMA Mittelwert	<i>S1pr3</i> ^{+/+} log ₂ RMA Mittelwert	Δlog ₂ RMA
<i>Il1b</i>	7,04	7,19	-0,15
<i>Il10</i>	4,28	4,05	0,23
<i>Ccl2</i>	7,76	7,74	0,02
<i>Gdf15</i>	5,9	5,65	0,25

Die Zytokine (*Il1b*, *Il10*, *Ccl2*, *Gdf15*) waren in der Adventitia und Media der abdominalen Aorta der Mäuse, die nicht operiert wurden, gering exprimiert. Die Expression aller Zytokine stieg in Folge der Verletzung der abdominalen Aorta an, die einzige Ausnahme war die Expression von *Gdf15* in der Adventitia, welches konstant blieb (Abbildung 18-21).

Interleukin-1β (IL1B) ist ein starkes proinflammatorisches Zytokin, das bei der Abwehrreaktion des Wirts auf Infektion und Verletzungen entscheidend ist [107]. IL1B wird als inaktives pro-IL1B synthetisiert und dann durch das IL1B-coverting-Enzym (ICE) zu IL1B gespalten [108]. IL1B wird von einer Vielzahl von Zelltypen produziert und sezerniert, besonders aber in den Monozyten und Makrophagen [109]. Nach der Verletzung wurde *Il1b* stärker in der Adventitia als in der Media exprimiert (Abbildung 18A, B). In den untersuchten Geweben stieg die Expression von *Il1b* sowohl in den *S1pr3*^{+/+} als auch *S1pr3*^{-/-} Mäusen stark an, blieb auch an Tag 21 im detektierbaren Bereich. In der Adventitia der *S1pr3*^{+/+} Mäuse ist dieser Anstieg an Tag 7 signifikant höher (Abbildung 18A). In der Media war in den *S1pr3*^{+/+} Mäusen ein ähnlicher Expressionsverlauf zusehen. In der Media war ein Trend zu einer höheren *Il1b*-Expression an Tag 7 im Vergleich zwischen *S1pr3*^{-/-} und *S1pr3*^{+/+} Mäusen zu sehen (Abbildung 18B).

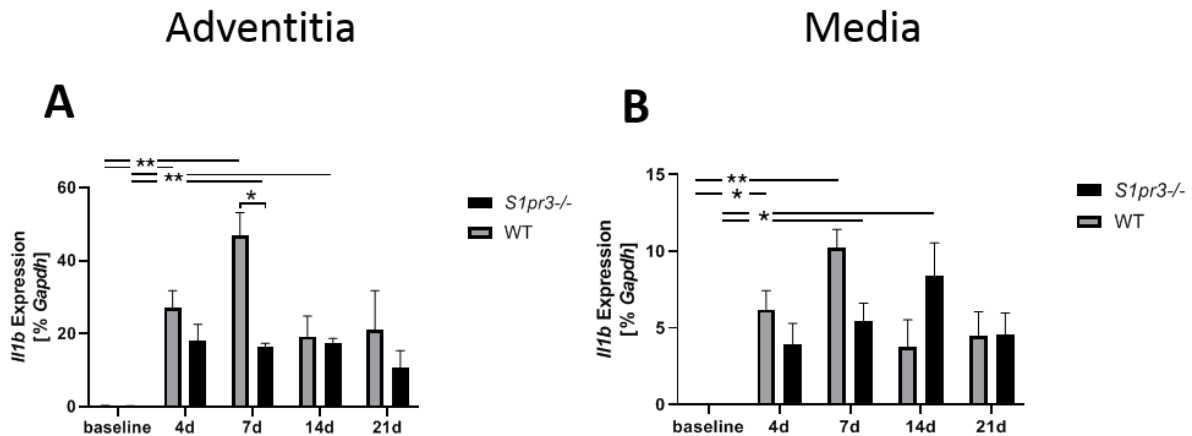


Abbildung 18 *Il1b* Expression in der Adventitia und Media der abdominalen Aorta im Zeitverlauf; A: Expression von *Il1b* in der Adventitia; B: Expression von *Il1b* in der Media; n= 5 Pools á 2 Aorten; \pm SEM; WT: Wildtyp; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; 2-seitiger T-test (*S1pr3*^{+/+} und *S1pr3*^{-/-}) und Two-way ANOVA (baseline vs. 4d o. 7d o. 14d o. 21d)

Interleukin-10 (IL10) ist ein antiinflammatorisches Zytokin [110] und wird vor allem von T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, stimulierten Makrophagen, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen produziert [111], [112]. IL10 wirkt hemmend auf die Synthese proinflammatorischer Zytokine in Monozyten und verstärkt die Produktion des IL1-Rezeptorantagonisten, der selbst entzündungshemmend wirkt [113]. Deshalb wird vermutet, dass IL10 ein natürlicher Inhibitor der proliferativen und entzündlichen Reaktionen des Immunsystems ist [114]. In der Adventitia war kein signifikanter Unterschied der *Il10* Expression zu den verschiedenen Zeitpunkten zu sehen (Abbildung 19A). In der Media stieg in den *S1pr3*^{-/-} Mäusen die Expression bis Tag 21 stetig an, wobei bei den *S1pr3*^{+/+} Mäusen nach einem leichten Anstieg die Expression konstant blieb (Abbildung 19B). Zwischen den beiden Mausgenotypen war aber zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied zu beobachten, weder in der Media noch in der Adventitia.

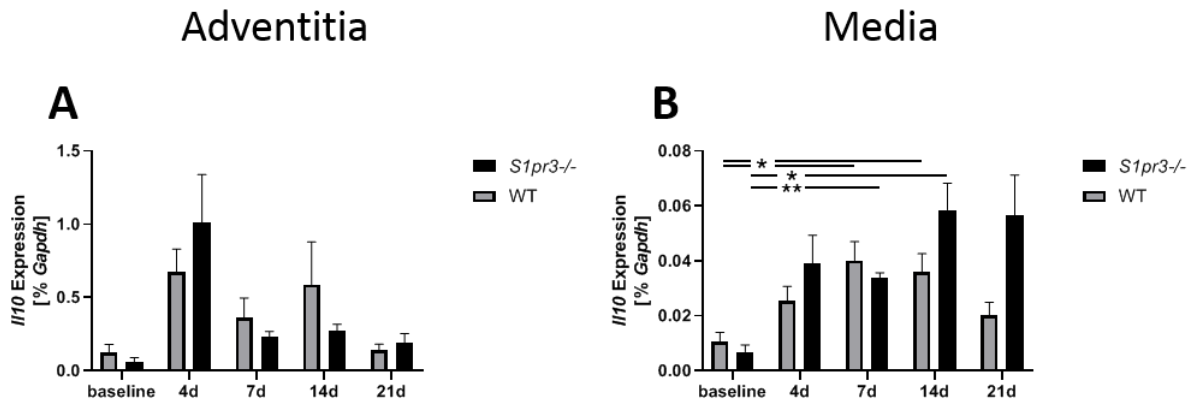


Abbildung 19 *I/10* Expression in der Adventitia und Media der abdominalen Aorta im Zeitverlauf; A: Expression von *I/10* in der Adventitia; B: Expression von *I/10* in der Media; n= 5 Pools á 2 Aorten; ±SEM; *P<0,05; **P<0,01; 2-seitiger T-test (*S1pr3*^{+/+} und *S1pr3*^{-/-}) und Two-way ANOVA (baseline vs. 4d o. 7d o. 14d o. 21d)

Das CC-Chemokin-Ligand-2 (CCL2), auch bekannt als Monozyt Chemoattraktant Protein-1 (MCP-1), ist ein Protein, das zur Familie der Chemokin-Liganden gehört. Chemokine sind niedermolekulare Proteine, die ihre Funktion durch Bindung an G-Protein gekoppelte Chemokinrezeptoren (GPCRs) auf der Zelloberfläche ausüben [115]. CCL2 wird primär von Immunzellen (Monozyten und Makrophagen) sezerniert, aber auch SMCs, Endothelzellen, Thylakoidzellen und Fibroblasten sind im Stande CCL2 zu produzieren [116], [117]. CCL2 reguliert die Rekrutierung von Monozyten und die Aktivierung von T-Lymphozyten-Subpopulation bei entzündlichen Erkrankungen [118]. In der Adventitia der *S1pr3*^{+/+} Mäuse zeigte *Ccl2* die höchste Expression an Tag 4, die dann über den Zeitraum von 21 Tagen wieder abfällt (Abbildung 20A). In der Media erreichte die Expression des *Ccl2* ihren Höhepunkt an Tag 7 (Abbildung 20B). In den *S1pr3*^{+/+} Mäusen sank die Expression stärker ab als in den *S1pr3*^{-/-} Mäusen, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Maustypen zu beobachten war.

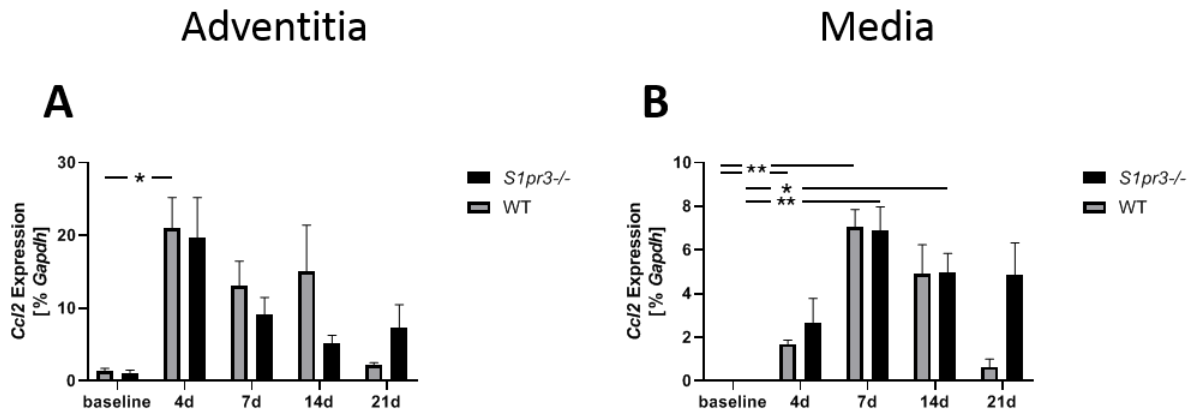


Abbildung 20 *Ccl2* Expression in der Adventitia und Media der abdominalen Aorta im Zeitverlauf; A: Expression von *Ccl2* in der Adventitia; B: Expression von *Ccl2* in der Media; n= 5 Pools á 2 Aorten; \pm SEM; WT: Wildtyp; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; 2-seitiger T-test (*S1pr3*^{+/+} und *S1pr3*^{-/-}) und Two-way ANOVA (baseline vs. 4d o. 7d o. 14d o. 21d)

Der Growth Differentiation Faktor 15 (GDF15), auch bekannt als Makrophagen inhibitorisches Zytokin-1 (MIC-1), ist ein stressempfindliches Mitglied der Transforming Growth Faktor- β (TGF- β) Familie [119]. Die Superfamilie des TGF- β besteht aus einer größeren Gruppe strukturell verwandter Proteine, die an Wachstum, Differenzierung und Reparatur vieler Gewebe beteiligt sind [120]. GDF15 wird in aktivierten Makrophagen und unter pathologischen Bedingungen wie Entzündungen, Gefäßverletzungen und oxidativen Stress von Endothelzellen, SMCs und Adipozyten produziert [121]. In der Media wurde an Tag 4 bis zu fünfmal so viel exprimiert wie bei nicht-operierten Mäusen. An Tag 7 und 14 war noch ein weiterer leichter Anstieg zu beobachten, wobei insgesamt die Expression zwischen Tag 4 und 21 relativ konstant blieb und im Vergleich zur Baseline auf einem hohen Niveau blieb (Abbildung 21B).

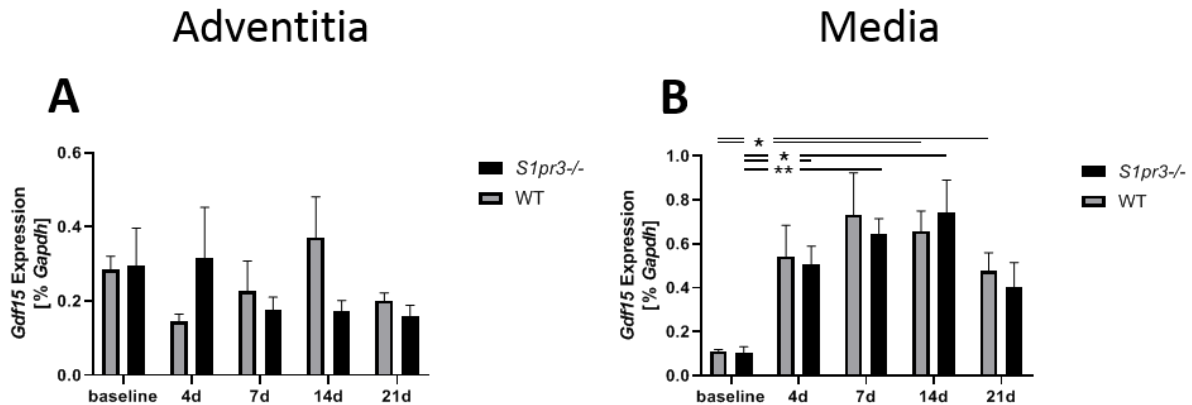


Abbildung 21 *Gdf15* Expression in der Adventitia und Media der abdominalen Aorta im Zeitverlauf; A: Expression von *Gdf15* in der Adventitia; B: Expression von *Gdf15* in der Media; n= 5 Pools á 2 Aorten; ±SEM; WT: Wildtyp; *P<0,05; **P<0,01; 2-seitiger T-test (*S1pr3*^{+/+} und *S1pr3*^{-/-}) und Two-way ANOVA (baseline vs. 4d o. 7d o. 14d o. 21d)

Nach 21 Tagen war bei den meisten pro- und antiinflammatorischen Zytokinen zu beobachten, dass sie noch nicht auf den Wert der nicht operierten Mäuse abgesunken waren.

5.2.5 Expression der Thrombinrezeptoren (*Par2*, *Par4*)

Die Thrombinrezeptoren haben wichtige Funktionen bei der Hämostase und Thrombose sowie bei Entzündungs- und Proliferationsreaktionen [122]. PAR2 koppelt an Gq, G12/13 und Gi und wird auf Endothelzellen, SMCs, Leukozyten, Epithelzellen, Fibroblasten, Neuronen, Mastzellen, Myozyten, Astrozyten und Adipozyten exprimiert [123]. Die Aktivierung des PAR2 führt zu endothel-abhängiger Vasorelaxation in einer Vielzahl von Arterien [124]. Daten zeigen, dass die PAR2-Aktivierung durch die Freisetzung des Plättchens aktivierenden Faktors zu Entzündungsreaktion und Leukodiapedese beitragen kann [125]. Im Verletzungsmodell der A. carotis zeigte sich, dass der PAR2 an der Bildung der Intimahyperplasie beteiligt ist und wahrscheinlich die Adhäsion der inflammatorischen Zellen in der verletzten Arterie fördert [124]. PAR4 koppelt an Gq und G12/13 und wird auf Thrombozyten, Leukozyten, Endothelzellen, SMCs, Myozyten, Astrozyten und Adipozyten exprimiert [123]. PAR4 ist der vorherrschende Thrombin-Rezeptor in Thrombozyten der Nagetiere, ist aber auch bei Menschen exprimiert [126]. PAR4 kann auch für die Rekrutierung von Monozyten bei Gefäßverletzungen und Entzündungen mitverantwortlich sein [127].

In nicht-operierten Mäusen war *Par2* und *Par4* sowohl in der Media als auch in der Adventitia auf einem gleichen Niveau exprimiert (Abbildung 22 A-D). In der Adventitia blieb die Expression von *Par2* über die verschiedenen Zeitpunkte und auch in *S1pr3*^{+/+} und *S1pr3*^{-/-}

Ergebnisse

Mäusen konstant (Abbildung 22A). In der Media zeigte *Par2* eine leicht erhöhte Expression an Tag 4 im Vergleich zur Baseline, wobei diese nicht signifikant war. Zu den anderen Zeitpunkten blieb auch hier die Expression relativ gleich (Abbildung 22B). Bei der *Par4* Expression sah man in der Adventitia und auch in der Media eine Reduktion der Expression an Tag 4, wobei nur in der Media diese im Vergleich zur Baseline signifikant war. Danach stieg *Par4* in beiden Geweben wieder auf den Baseline-Wert an (Abbildung 22C, D).

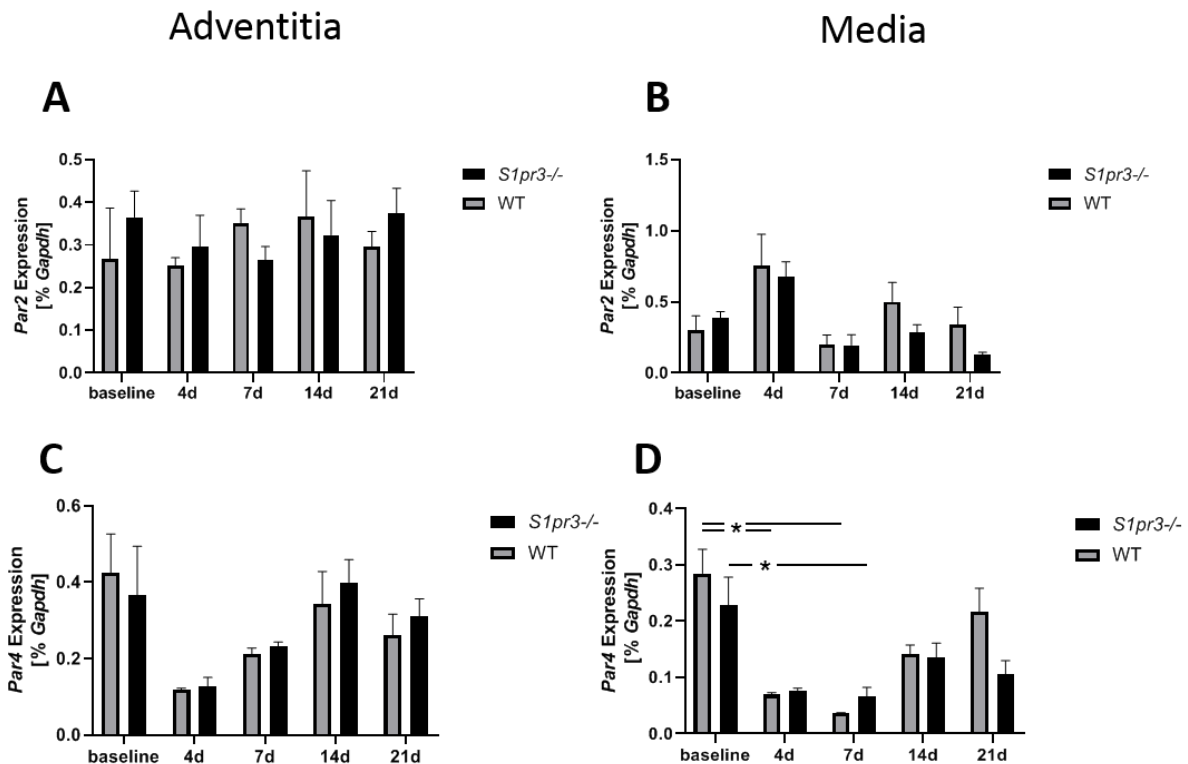


Abbildung 22 *Par2* und *Par4* Expression in der Adventitia und Media der abdominalen Aorta im Zeitverlauf; A: Expression von *Par2* in der Adventitia; B: Expression von *Par2* in der Media; C: Expression von *Par4* in der Adventitia; D: Expression von *Par4* in der Media; n= 5 Pools á 2 Aorten; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ±SEM; WT: Wildtyp; 2-seitiger T-test (*S1pr3*^{+/+} und *S1pr3*^{-/-}) und Two-way ANOVA (baseline vs. 4d o. 7d o. 14d o. 21d)

5.2.6 Expression des CREB-regulierten transkriptionellen Coaktivators 1 (*Crtc1*)

Transkriptionsfaktoren modulieren die Genexpression, indem sie die Rekrutierung der RNA-Polymerase II an einen Promotor beeinflussen. Sie können die Expression von Genen aktivieren oder unterdrücken. Deregulierte Transkriptionsfaktoren tragen zur Entstehung einer Vielzahl von Krankheiten bei, wie Diabetes, Entzündungen, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und viele Krebsarten [128]. Transkriptionsfaktoren, die durch zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) aktiviert werden, enthalten ein entsprechendes Bindungselement (cAMP-response

Ergebnisse

element binding protein, CREB) und werden durch Coaktivator reguliert CREB-regulierte Transkriptions-Coaktivator, CRTC) [129]. Unter normalen Bedingungen wird CRTC1 von den aktiven salzinduzierten Kinasen (SIK) phosphoryliert und aufgrund einer Interaktion mit 14-3-3-Proteinen im Zytoplasma gehalten. Die Stimulierung von PKA hemmt die katalytische Aktivierung von SIK und führt zu einer verminderten Phosphorylierung des CRTC1. Darüber hinaus kann auch Calcineurin CRTC1 dephosphorylieren und in den Zellkern einschleusen [130], wobei CRTC1 vom Zytoplasma bei gleichzeitiger Aktivierung vom Kalzium- und cAMP-Signalweg in den Zellkern wandert [131]. Dort verstärkt CRTC1 die CRE-abhängige Transkription über eine phosphorylierungsunabhängige Interaktion mit der Leuzin-Zipper-DNA-Bindungsdomäne von CREB [132]. Bei der Ligatur der A. carotis konnte in *S1pr3+/+* und *S1pr3-/-* Mäusen eine Reduktion der Expression von *Crtc1* nach der Verletzung beobachtet werden [133].

Crtc1 war in der Media und in der Adventitia ähnlich hoch exprimiert (Abbildung 23 A, B). In beiden Geweben der abdominalen Aorta sank die Expression 4 Tage nach der Verletzung ab. In der Adventitia stieg die Expression am Tag 7 wieder an und verblieb auf diesem Expressionslevel bis Tag 21 (Abbildung 23A). In der Media verblieb die Expression von *Crtc1* auch am Tag 7 auf dem Niveau von Tag 4, danach stieg die Expression auf den Baseline-Wert an (Abbildung 23B). Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Maustypen.

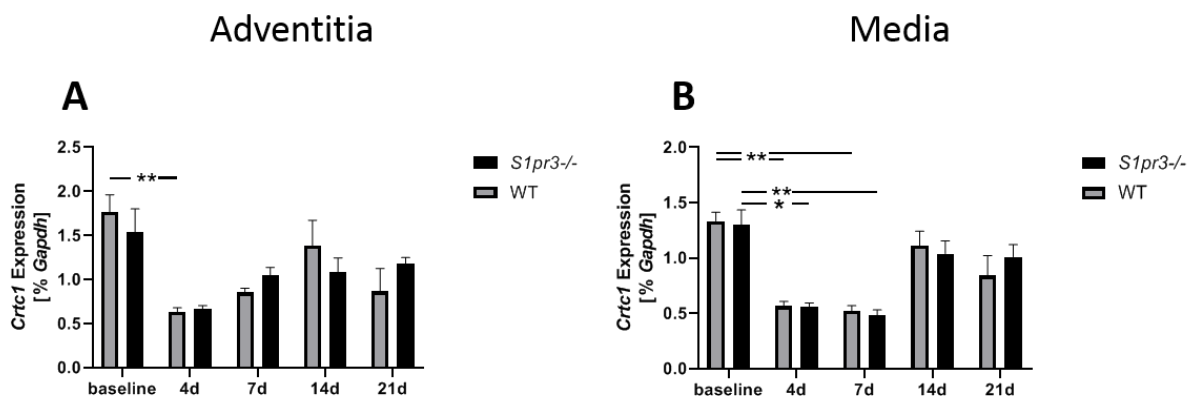


Abbildung 23 *Crtc1* Expression in der Adventitia und Media der abdominalen Aorta im Zeitverlauf; A: Expression von *Crtc1* in der Adventitia; B: Expression von *Crtc1* in der Media; n= 5 Pools á 2 Aorten; \pm SEM; WT: Wildtyp; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; 2-seitiger T-test (*S1pr3^{+/+}* und *S1pr3^{-/-}*) und Two-way ANOVA (baseline vs. 4d o. 7d o. 14d o. 21d)

5.3 Analyse einer Patientenkohorte in einer epidemiologischen, prospektiven Kohortenstudie

Im zweiten Teil der Arbeit wurde eine Subgruppe von 40 Patienten aus der Kohortenstudie „Die Rolle des Sphingosin-1-phosphat und seine Rezeptoren in der Atherosklerose und Restenose“ ausgewählt und im Plasma die S1P- und Zytokinkonzentrationen bestimmt, um herauszufinden, ob es einen Zusammenhang zwischen S1P und den Zytokinen *IL1B*, *IL10* und *CCL2* gibt. Die Blutentnahmen fanden prä- und postoperativ statt.

5.3.1 Charakterisierung der Subgruppe

Die Gesamtkohorte der Studie umfasste insgesamt 330 Patienten, die entweder eine pAVK oder eine Carotisstenose aufwiesen. Aus dieser Gesamtkohorte wurden 40 Patienten zufällig ausgewählt. Diese Subgruppe unterscheidet sich in den übrigen gemessenen Laborparametern nicht im Vergleich zur Gesamtkohorte. Die vor der Intervention im Plasma gemessene S1P Konzentration war in der Subgruppe im Vergleich zur Gesamtkohorte etwas höher ($P < 0,05$) (Tabelle 5). Postoperativ war dieser Unterschied zwischen Subgruppe und Gesamtkohorte nicht mehr vorhanden ($P = n.s.$).

Tabelle 5 Baseline Charakteristika der Gesamtkohorte und Subgruppe

		Subgruppe	Gesamtkohorte	P-Wert
Anzahl		40	330	
Alter (Jahre)		72	71	ns
Geschlecht (% Männlich)		72	72	ns
Plasma S1P	μM	1,032 ± 0,22	0,97 ± 0,29	0,046
Erythrozyten	Mrd/ml	4,37 ± 0,46	4,39 ± 0,56	ns
Leukozyten	Mrd/ml	7,9 ± 2,48	7,89 ± 4	ns
Thrombozyten	Mrd/ml	239,9 ± 81	251,58 ± 87,7	ns
Monozyten	Mrd/L	0,49 ± 0,19	0,52 ± 0,22	ns
Neutrophile	Mrd/L	5,14 ± 2,09	4,96 ± 1,81	ns
Eosinophile	Mrd/L	0,18 ± 0,099	0,19 ± 0,13	ns
Gesamtcholesterin	mg/dl	156,48 ± 32,63	165,08 ± 40,4	ns
HDL-C	mg/dl	54,98 ± 16,8	53,17 ± 18	ns
LDL-C	mg/dl	74,15 ± 26,6	81,2 ± 34,3	ns
Triglyceride	mg/dl	140,4 ± 73,3	165,16 ± 101,39	ns

Ergebnisse

5.3.2 Vergleich der prä- und postoperativen S1P Konzentration

Bei den Patienten wurde jeweils präoperativ und postoperativ eine venöse Blutabnahme durchgeführt und Serum- und Plasmablutproben gesammelt. Die S1P Konzentration wurde, wie in Abschnitt 4.6, beschrieben aufgearbeitet und gemessen. Der Mittelwert der S1P Konzentration der Subgruppe im Serum ist mit $1,23 \pm 0,92 \mu\text{M}$ beim Einschluss der Patienten 19% höher als der S1P-Wert im Plasma mit $1,032 \pm 0,22 \mu\text{M}$. In der Subgruppe kommt es postoperativ zu einem Absinken der S1P-Plasmakonzentration, d.h. von $1,032 \pm 0,22 \mu\text{M}$ präoperativ auf $0,87 \pm 0,25 \mu\text{M}$ postoperativ ($P < 0,001$, Abbildung 24).

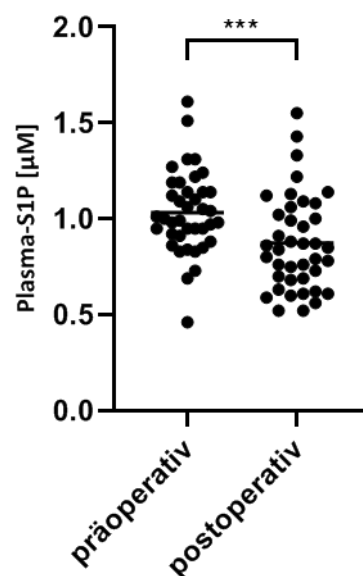


Abbildung 24 Vergleich der prä- und postoperativen Plasma-S1P Spiegel der Subgruppe; *** $P < 0,001$; Wilcoxon-Test

5.3.3 Vergleich der prä- und postoperativen Zytokinspiegel

Für die Zytokinkonzentrationen von *IL1B*, *IL10* und *CCL2* zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen prä- und postoperativen Werten (Abbildung 25). Für *IL1B* und *IL10* liegt das Detektionslimit bei $3,63 \text{ pg/mL}$ und $2,59 \text{ pg/mL}$. Für *IL1B* lagen jeweils $n=9$ Proben prä- und postoperativ unterhalb des Detektionslimits. Für *IL10* lagen $n=22$ Proben präoperativ und $n=17$ postoperativ unterhalb des Detektionslimits.

Ergebnisse

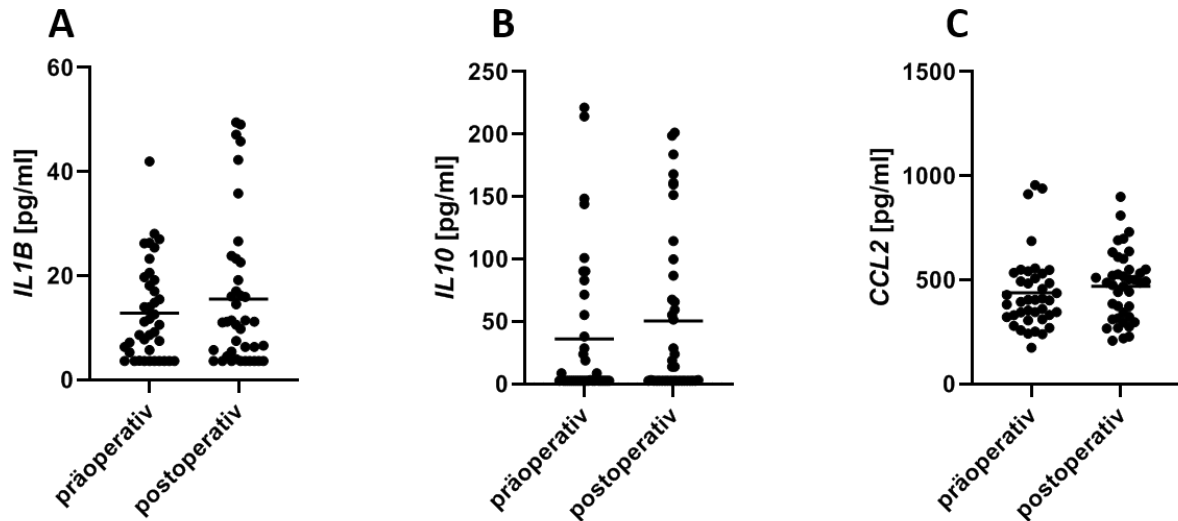


Abbildung 25 Vergleich der prä- und postoperativen Zytokinspiegel; A: prä- und postoperativer *IL1B*-Spiegel, B: prä- und postoperativer *IL10*-Spiegel; C: prä- und postoperativer *CCL2*-Spiegel; Wilcoxon-Test

5.3.4 Korrelationsanalyse des Plasma-S1P mit den gemessenen Zytokinen

Die gemessenen prä- und postoperativen Zytokinkonzentrationen von *IL1B*, *IL10* und *CCL2* wurden mit dem prä- und postoperativen S1P Werten korreliert. In der Korrelationsanalyse zeigte sich eine signifikante Assoziation zwischen den Plasma S1P-Konzentrationen nach der Operation (post Plasma-S1P) und post *IL1B*-Werten. Für das postoperative *IL10* und *CCL2* zeigten sich keine Korrelationen. Auch zwischen den präoperativ gemessenen S1P-Werten und den Zytokinen zeigte sich keine Korrelation.

Ergebnisse

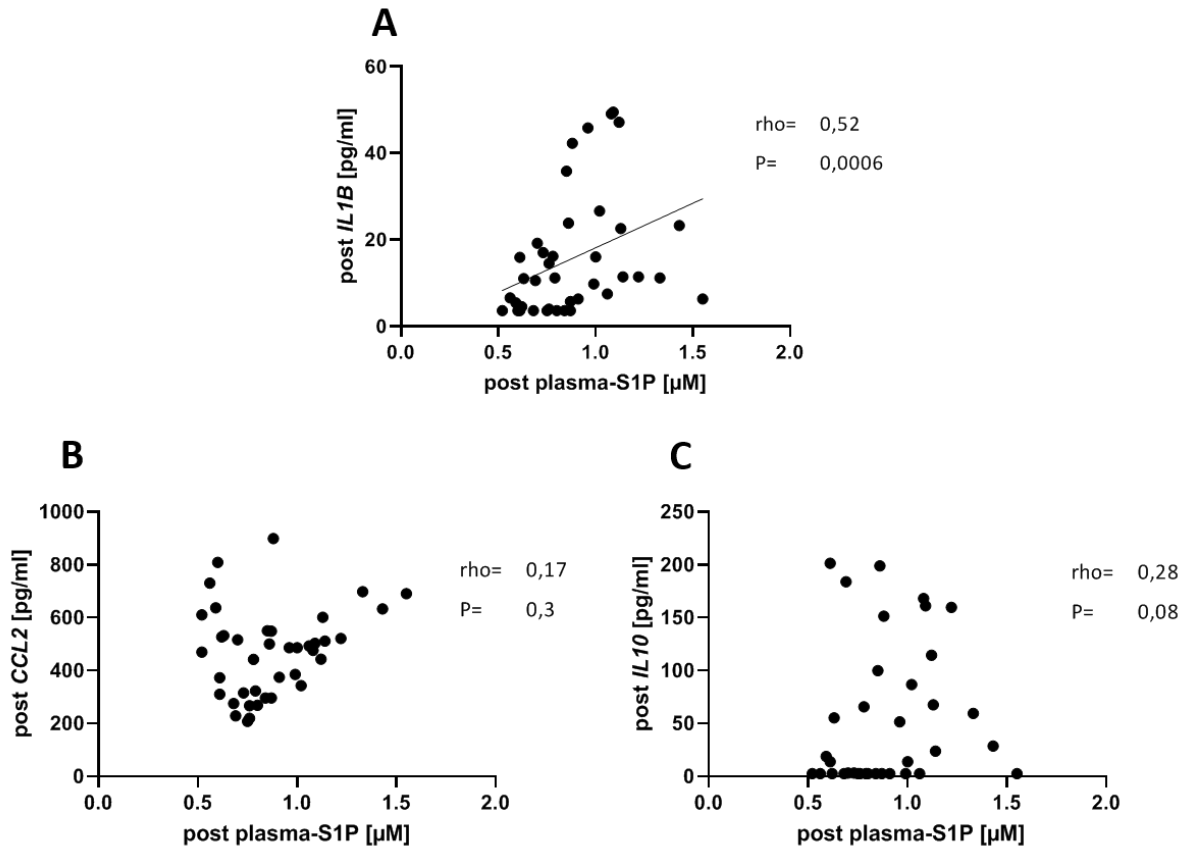


Abbildung 26 Korrelationsanalyse zwischen postoperativen plasma-S1P Spiegel und postoperativen Zytokinspiegel; A: Assoziation zwischen post plasma-S1P und post *IL1B*; B: Assoziation zwischen post plasma-S1P und post *IL10*; C: Assoziation zwischen post plasma-S1P und post *CCL2*; rho: Spearman-Koeffizient; $p < 0,05$ = statistisch signifikant

6 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Rolle des S1PR3 bei der Intimahyperplasie im Verletzungsmodell der Maus untersucht. Zum einen wurde die Läsionsgröße der Wildtyp und *S1pr3*^{-/-} Mäuse histologisch untersucht und zum anderem, ob sich *S1pr3*- abhängig die Expression eines Zellmarkers ändert, was Rückschlüsse auf eine veränderte Zellpopulation in der Aorta zwischen den beiden Maustypen erlauben würde. In der folgenden Tabelle sind noch einmal die wichtigsten Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 6 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse des Verletzungsmodells

	<i>S1pr3</i> ^{+/+}	<i>S1pr3</i> ^{-/-}	<i>P-Wert</i>
Läsionsgröße	größer als <i>S1pr3</i> ^{-/-}	kleiner als <i>S1pr3</i> ^{+/+}	0,0015
<i>S1pr2</i> Expression (Tag 21, Media)	niedrig	hoch	0,0005
<i>Sphk1</i> Expression (Tag 21, Media)	niedrig	hoch	0,03
<i>Il1b</i> Expression (Tag 7, Adventitia)	hoch	niedrig	0,02

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen der Konzentration von S1P und den Zytokinen *IL1B*, *IL10* und *CCL2* vor und nach einer operativen Behandlung einer Stenose in den Blutproben von pAVK- und CS-Patienten untersucht. Es zeigte sich, dass der Plasma-S1P Spiegel postoperativ sinkt und eine Korrelation zwischen dem postoperativen Plasma-S1P und dem postoperativen *IL1B* zu sehen war.

6.1 Mausmodelle für eine Intimahyperplasie

Bei der Therapie der stenosierenden Atherosklerose durch Stentimplantation ist die Restenose immer noch ein wesentlicher limitierender Faktor für den Therapieerfolg [134]. Trotz Einsatz von modernen Drug Eluting Stents (DES) ist bei bestimmten Läsionen und Patientengruppen nach 2-10% der perkutanen koronaren Interventionen (PCI) immer noch mit dem Auftreten von In-stent-Restenosen (ISR) zu rechnen. Im Vergleich zu Patienten mit De-novo-Stenosen zeigen Patienten mit ISR häufiger Symptome einer instabilen Angina pectoris (45% versus 61%) [135]. Auch bei der Behandlung von pAVK zeigten die DES und die mit Paclitaxel beschichtete Ballons (DEB) gegenüber einer konventionellen Perkutanen

transluminalen Angioplastie einen Vorteil in der Anzahl der Reinterventionsraten sowie der Restenoserraten [136]. Obwohl die Hauptursache der ISR die Intimahyperplasie aufgrund von Gefäßverletzung ist, ist der Mechanismus noch nicht komplett verstanden [134]. Um diesen Mechanismus genauer zu untersuchen, gibt es verschiedene Mausverletzungsmodelle, die eine Intimahyperplasie hervorrufen können. Die zwei am häufigsten verwendeten Mausverletzungsmodelle sind die komplette oder teilweise Reduktion des Durchflusses durch Ligatur, z.B. der A. carotis [137] und die Entfernung der Endothelschicht mittels eines Katheters (Denudation) in der A. carotis [138] oder A. iliofemoralis [96]. Shirali et al. zeigten, dass es auch durch das Abklemmen der abdominalen Aorta bei Mäusen zu einer Denudation des Endothels kommt [139]. In C56BL/6J Mäusen konnten wir mit dieser Methode zeigen, dass es in diesem Modell zudem zu einer Intimahyperplasie der abdominalen Aorta kommt [140]. Die Vorteile dieses Verletzungsmodells sind, dass einerseits eine geringere Anzahl von Mäusen verwendet werden muss, um genügend Gewebe für nachfolgende molekularbiologische Untersuchungen zu erhalten, da die abdominale Aorta im Vergleich zur A. carotis oder A. iliofemoralis deutlich größer ist, und andererseits diese Operation einfacher durchzuführen ist im Vergleich zu einer Denudation. Ein weiterer Vorteil dieser Methode liegt darin, dass es durch die Größe der abdominalen Aorta möglich ist, die Media- und Adventitia-Schicht relativ einfach voneinander zu trennen, sodass beide unabhängig voneinander untersucht werden können. In dieser Arbeit haben wir deshalb dieses Verletzungsmodell bei den *S1pr3*^{-/-} und Wildtyp Mäusen angewendet, um die Rolle des S1PR3s in der Intimahyperplasie genauer zu untersuchen.

6.2 *S1pr3*^{-/-} Mäuse entwickeln weniger Läsionen als *S1pr3*^{+/+} Mäuse nach Verletzung der abdominalen Aorta

In früheren Mausstudien wurde nachgewiesen, dass S1PR3 einen Einfluss auf die Entwicklung der Intimahyperplasie nach Verletzung hat [89], [94], [96]. In dieser Arbeit konnte in dem Verletzungsmodell der abdominalen Aorta gezeigt werden, dass *S1pr3*^{-/-} Mäuse ein geringeres Ausmaß der Intimahyperplasie 28 Tage nach der Verletzung zeigen als die *S1pr3*^{+/+} Mäuse. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen von Shimizu et al. und Wamhoff et al., dass S1PR3 die Bildung der Intimahyperplasie fördert. Shimizu et al. zeigten, dass durch die Denudation der A. iliofemoralis es im Vergleich zu *S1pr3*^{-/-} Mäusen zu

vermehrter Intimahyperplasie in den Wildtyp Mäusen kommt [96]. Wamhoff et al. untersuchten die Rolle der S1P Rezeptoren im Verletzungsmodell der Ratte durch Denudation der Carotis und fanden heraus, dass durch eine pharmakologischen Blockade des S1PR1s und S1PR3s durch VPC25239, ein S1PR1 und S1PR3 Antagonist, die Läsionsgröße reduziert wurde [89]. Eine scheinbar gegenteilige Beobachtung machten Keul et al., die in *S1pr3*^{-/-}/*Apo*^{-/-} Mäusen nach Carotis-Ligatur eine vermehrte Bildung von Intimahyperplasie beobachteten. Dieses lässt vermuten, dass S1PR3 in der Carotis eine antiproliferative und antimigratorische Rolle bei einer Verletzung spielt [94]. Eine Möglichkeit für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte die unterschiedliche Expression des S1PR3s in den Gefäßen sein. Shimizu et al. zeigten, dass die A. iliofemoralis wesentlich mehr *S1pr3* exprimiert als die A. carotis [96]. In der Adventitia und Media der abdominalen Aorta sehen wir auch eine hohe Expression des *S1pr3s* wie in der A. iliofemoralis [96], wobei man diese Daten nicht direkt miteinander vergleichen kann, da das ganze Gefäß der A. iliofemoralis verwendet wurde und nicht die Adventitia und Media getrennt betrachtet und auch in einem anderen Labor gemessen wurden. Dies könnte aber trotzdem einen Hinweis darauf geben, dass der Gefäßabschnitt ähnlich auf Verletzungen reagiert. Das Klemmen der abdominalen Aorta und die Denudation der A. iliofemoralis führt zu einem Verlust der Endothelzellen. Bei der Ligatur der Carotis hemmt möglicherweise S1PR3 das Wachstum der Neointima aufgrund seiner Funktion in den Endothelzellen. Die Stimulation des S1PR3 führt in den Endothelzellen zur Aktivierung von eNOS, wodurch vermehrt NO gebildet wird, welches die glatte Gefäßmuskulatur entspannt und antiproliferativ wirkt [141]. Durch eine geringere S1PR3 Expression in den SMCs der A. carotis reduziert sich andererseits die Gi-abhängige Inhibition der Adenylylcyclase [96]. Die durch die Adenylylcyclase katalysierte Bildung von cAMP kann die Proliferation der SMCs deutlich inhibieren [142]. Darüber hinaus kann durch die Kopplung an Gi Erk und Ras aktiviert werden, welche die Proliferation fördern und auch die Produktion von Rac und PI3K anregen, was wiederum die Migration erleichtert und auch durch Aktivierung von PKB/Akt, die Apoptose verhindern kann [143]. Shimizu et al. konnten zeigen, dass in Zellen mit überexprimierten S1PR3 vor allem die Signalwege über Erk, Rac und Akt aktiviert wurden [96]. Durch die höhere Expression von S1PR3 in der abdominalen Aorta wäre es möglich, dass die Signalübertragung vermehrt über Erk, Rac und Akt läuft und deshalb der Signalweg über cAMP eine untergeordnete Rolle spielt. Es ist zu beachten, dass dieser Signalweg über Erk, Rac und Akt nur in Zellkulturversuchen

beobachtet wurde. Dieser Signalweg könnte in den *S1pr3+/+* Mäusen die Intimahyperplasie induzieren, wohingegen bei Wegfall des S1PR3s die Intimahyperplasie reduziert wird. Das Klemmen der abdominalen Aorta führt zu einem Verlust der Endothelzellen [139].

In unserem Verletzungsmodell wurde die ganze abdominale Aorta mittels einer 1,75mm breiten „strong pressure“ Gefäßklemme geklemmt, dadurch sollte bei jedem Abschnitt der gleiche Druck auf das Gefäß wirken. Obwohl die Anzahl der Läsionen vom proximalen zum distalen Teil relativ ähnlich ist, sahen wir vor allem im proximalen Teil die größeren Läsionen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die unterschiedliche Scherspannung in den unterschiedlichen Abschnitten. Asakura et al. zeigten, dass atherosklerotische Plaques und Wandverdickungen in den linken und rechten Koronararterien jeweils an den großen Bifurkationen und T-Verzweigungen, sowie entlang der Innenwand gekrümmter Segmente lokalisiert waren. Bei den Strömungsmustern wurde festgestellt, dass an diesen Stellen die Strömung entweder langsamer oder gestört war und deshalb die Wandschubspannung geringer war [144]. Durch Änderung der Scherspannung können verschiedene Faktoren, die den Gefäßtonus beeinflussen, darunter gefäßerweiternde Faktoren wie NO, Prostacyclin und gefäßverengende Faktoren wie Endothelin-1 freigesetzt werden. So haben Bereiche mit geringer Scherspannung eine erhöhte Prädisposition für die Entwicklung von Atherosklerose [145]. Bei Gefäßtransplantaten zeigten einige Studien, dass ein geringer Blutfluss und eine geringe Scherspannung eine Intimahyperplasie induzieren können [29]. Da im proximalen Teil der abdominalen Aorta im Vergleich zum distalen Bereich vermehrt Gefäßverzweigungen zu finden sind [146], kann dies eine Erklärung dafür sein, weshalb im proximalen Teil es zu einer verstärkten Bildung von Neointima kommt.

6.3 Verletzung der abdominalen Aorta verursacht Veränderung in der Expression von Genen

Die histologische Untersuchung hat gezeigt, dass *S1pr3+/+* Mäuse größere Läsionen ausbilden als die *S1pr3-/-* Mäuse. Zur weiteren Untersuchung des Mechanismus für die unterschiedlich große Ausbildung der Intimahyperplasie haben wir die Expression bestimmter Gene nach der Verletzung der abdominalen Aorta untersucht und verglichen, welche Gene in *S1pr3+/+* und *S1pr3-/-* Mäusen anders exprimiert werden. Für diese Untersuchung haben wir, wie in Abschnitt 4.1.3. beschrieben, die Adventitia und die Media der Aorta direkt nach der Sektion

voneinander getrennt. Mittels RT-qPCR (Abschnitt 4.3.4) haben wir die Genexpression jeweils in der Adventitia und Media der *S1pr3*^{+/+} und *S1pr3*^{-/-} Mäusen getrennt voneinander bestimmt.

6.3.1 Signifikante Unterschiede der *S1pr2*- und *Sphk1*-Expression zwischen *S1pr3*^{+/+} und *S1pr3*^{-/-} an Tag 21

Um zu untersuchen, ob das Fehlen des S1PR3s Auswirkungen auf die Expression anderer S1P-Rezeptoren hat, haben wir die *S1pr1*- und *S1pr2*-Expression bestimmt. In nicht-operierten Mäusen fanden sich keine Unterschiede zwischen *S1pr3*^{-/-} und Wildtyp Mäusen (Abbildung 12A-C). Daraus lässt sich schließen, dass das Fehlen des *S1pr3* nicht zur Hoch- oder Herunterregulation der anderen untersuchten S1P-Rezeptoren führt. Die S1P-Rezeptoren sind unterschiedlich in Gefäßschichten exprimiert. *S1pr1* ist vor allem in den Endothelzellen zu finden und *S1pr2* und *S1pr3* vorwiegend in den SMCs exprimiert [147].

Die Endothelzellen sind eine dünne Zellschicht zwischen Blut und dem Gewebe, das an die Media anschließt [148]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in nicht-operierten Mäusen eine dreimal höhere Expression von *S1pr1* in der Adventitia im Vergleich zur Media (Abbildung 12A, B). Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit wurde für C57BL/6 Mäuse beschrieben, dass in der Media der abdominalen Aorta mehr *S1pr1* exprimiert ist als in der Adventitia [140]. Die Media und Adventitia wurden mittels eines Enzym-Mixes (siehe Abschnitt 4.1.3) voneinander getrennt. Bei diesem Vorgehen könnte die Endothelschicht beschädigt bzw. abgetragen worden sein und dadurch die Expression des *S1pr1s* vermeintlich in der Adventitia höher erscheinen. Eine weitere Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse wäre, dass es sich hierbei um eine andere Mauslinie handelt und dadurch Unterschiede in der Expression auftreten. In der Media stieg die Expression des *S1pr1* 4 Tage nach der Verletzung signifikant an (Abbildung 12B). Neben Endothelzellen exprimieren aber auch SMCs den S1PR1. In den SMCs stimuliert S1PR1 die Proliferation und Migration durch Aktivierung von Gi [80]. Wamhoff et al. konnten bei Ratten nach Ballonkatheterverletzung der A. carotis einen starken Anstieg der Expression des S1PR1 nachweisen. Durch die Gabe eines S1PR1- Antagonisten (VPC44116) konnte die Intimahyperplasie in diesem Modell um 50% reduziert werden [89]. Brätz et al. zeigten im humanisierten Rattenmodell, dass es nach der Verletzung der thorakalen Aorta durch Denudation zu einer Erhöhung der Expression von *S1pr1* in den SMCs kommt [81]. Lee

et al. untersuchten den Zusammenhang von Angiotensin II und *S1pr1* und zeigten bei Ratten, dass Angiotensin II die Expression von *S1pr1* über APE/Ref-1 in SMC induzieren und auch auf diese Weise die Migration der SMCs und die Bildung der Intimahyperplasie fördern kann [91]. In der Adventitia kann man eine leichte Reduktion der Expression von *S1pr1* nach der Verletzung (Tag 4) erkennen (Abbildung 12A). Die Fibroblasten in der Adventitia könnten zu Myofibroblasten differenzieren und in die Intima migrieren [34]. Nach einer Ballonkatheterverletzung der A. carotis bei Ratten zeigte sich, dass die adventitialen Fibroblasten in die Media und Neointima migrieren können [149]. So könnte die Reduktion der *S1pr1* Expression nach der Verletzung erklärt werden. Auf die Expression von *S1pr1* hatte das Fehlen des S1PR3 in dem untersuchten Mausmodell keinen Einfluss.

In den nicht-operierten Mäusen war *S1pr2* in der Adventitia deutlich höher exprimiert als in der Media (Abbildung 12 C, D). In der Adventitia blieb die Expression zu den verschiedenen Zeitpunkten relativ konstant. In der Media zeigte sich ein signifikanter Anstieg bei den *S1pr3*^{-/-} Mäusen an Tag 14 und Tag 21. Bei den *S1pr3*^{+/+} Mäusen zeigte sich auch ein signifikanter Anstieg an Tag 7, wobei an Tag 21 die Expression wieder auf den Level des Baseline-Wertes sank. An Tag 21 war die Expression von *S1pr3*^{-/-} Mäusen 4-mal höher als in den *S1pr3*^{+/+} Mäusen und somit im Vergleich signifikant erhöht. In SMCs kann die Aktivierung von S1PR2 zur Verringerung der Proliferation und Migration der Zellen führen [147]. Die hemmende Wirkung auf die Migration der SMCs durch S1PR2 wird durch Kopplung an G12/13 und Aktivierung von Rho und die dadurch resultierende Herabregulierung des Rac's hervorgerufen [150].

In *S1pr2*^{-/-} Mäusen wurden nach Ligatur der A. carotis nach 28 Tagen deutlich größere Läsionen beobachtet als bei Wildtyp Mäusen [87]. In Makrophagen führt die Stimulation des S1PR2 über den sekundären Botenstoff cAMP zu einer reduzierten der Akt-Phosphorylierung, wodurch die Migration und letztlich auch deren Rekrutierung gehemmt werden [151]. In Fibroblasten führte das Fehlen des S1PR2s zur Hemmung der Proliferation ebenfalls über Rac [152]. Diese Experimente zeigen, dass S1PR2 eine hemmende Wirkung auf die Proliferation und Migration der SMCs hat. In den *S1pr3*^{-/-} Mäusen war die Expression des *S1pr2* nach der Verletzung stark angestiegen (Abbildung 12D), bei gleichzeitigem Fehlen des *S1pr3*s und unveränderter Expression von *S1pr1* an Tag 21 kann die hemmende Wirkung des S1PR2 auf

Diskussion

die Proliferation und Migration der SMCs überwiegen und eine mögliche Erklärung dafür sein, dass *S1pr3*^{-/-} Mäuse kleinere Läsionen nach der Verletzung der abdominalen Aorta bilden.

In den *S1pr3*^{+/+} Mäusen wurde auch die Expression des *S1pr3* Rezeptors gemessen. In der Adventitia blieb die Expression des Rezeptors relativ konstant (Abbildung 13A). In der Media verringerte sich die Expression an Tag 4 nach der Verletzung, stieg dann aber wieder signifikant an (Abbildung 13B). In den C57/BL6J Mäusen zeigte sich wiederum ein Anstieg der *S1pr3* Expression in der Adventitia und in der Media, wie bei den *S1pr3*^{+/+} Mäusen, eine Verringerung der Expression [140]. Die unterschiedliche Expression in C57/BL6J und *S1pr3*^{+/+} kann eventuell auf Mauslinien-spezifische Effekte beruhen. Im vorherigen Abschnitt 6.2 wurden schon die unterschiedlichen Ergebnisse der Bildung der Intimahyperplasie bei *S1pr3*^{+/+} und *S1pr3*^{-/-} Mäusen in verschiedenen Verletzungsmodellen diskutiert. Da in unserem Verletzungsmodell die *S1pr3*^{+/+} Mäuse vermehrt Läsionen bilden und wir davon ausgehen, dass S1PR3 die Migration und Proliferation fördert, war es überraschend, dass an Tag 4 die Expression in der Media vermindert war. Auch Shimizu et al. konnten diese Beobachtung machen, an Tag 4 nach der Denudation der A. iliofemoralis wurde weniger *S1pr3* in der RT-qPCR detektiert [96]. Vier Tage nach der Operation zeigte sich auch ein starker Verlust von *Sma* und *Myh11* Expression (Abbildung 15A-D). Da *S1pr3* vor allem in den SMCs exprimiert wird, könnte dies auch ein möglicher Grund für die geringere Expression von *S1pr3* an Tag 4 sein. In der Zellkultur zeigte sich, dass überexprimiertes S1PR3 in SMCs die Zellen durch Aktivierung von Rac, Akt und Erk schneller migrieren lassen [96]. Weil die Expression an Tag 14 und 21 wieder signifikant ansteigt, kann dieser Mechanismus für die Ausbildung der verstärkten Intimahyperplasie mitverantwortlich sein.

Die Sphingosinkinase 1 (*Sphk1*) war in nicht-operierten Mäusen in der Adventitia und Media in einem ähnlichen Ausmaß exprimiert (Abbildung 15 A, B). In der Media wurde ein signifikanter Anstieg der Expression am Tag 4 nach der Verletzung beobachtet. In den Wildtyp Mäusen sank die Expression an Tag 21 fast wieder auf das Ausgangsniveau ab, bei *S1pr3*^{-/-} Mäusen blieb die Expression erhöht. Am Tag 21 war in der Media ein signifikanter Unterschied zwischen *S1pr3*^{-/-} und Wildtyp Mäusen zu beobachten. SPHK1 ist im Zytosol exprimiert und für die zytosolische Bildung von S1P verantwortlich. SPHK1 kann von vielen Agonisten (wie PDGF, VEGF, TNF α etc.) aktiviert werden und durch Verlagerung in die Plasmamembran die Produktion von S1P steigern [153]. Eine Aktivierung von Gq-gekoppelten Rezeptoren zeigte,

dass dies zu einer schnellen und langanhaltenden Translokation von SPHK1 zur Plasmamembran führte. Die Translokation war mit der Internalisierung der S1P-Rezeptoren verbunden, die von der katalytischen Aktivität von SPHK1 und der Bindung an den S1P-Rezeptor abhing. SPHK1 zeigt sich als ein wichtiger Effektor von Gq-gekoppelten Rezeptoren, der diese über die Kreuzaktivierung von S1P-Rezeptoren mit Gi- und G12/13-Signalwegen verbindet [154]. Chen et al. zeigten, dass Entzündungsreize, wie TNF α und proinflammatorischer hämodynamischer Stress, die Expression des *Sphk1*-Gens in Endothelzellen aktiviert [155]. Viele Studien haben nachgewiesen, dass die Expression von SPHK1 das Zellwachstum steigert und die Hemmung von SPHK1 die Proliferation verringert und die Apoptose steigert [156]–[158]. In Fibroblasten zeigte sich, dass *S1pr2* die Expression und Aktivität von SPHK1 hemmen kann. *S1pr2*^{-/-} Zellen hatten eine höhere SPHK1-Aktivität im Vergleich zu Wildtyp-Zellen und zeigten auch eine signifikant höhere Proliferationsrate [152]. Wegen dieser Beobachtungen ist es verwunderlich, dass in den *S1pr3*^{-/-} Mäusen die *Sphk1* Expression signifikant ansteigt, obwohl diese Mäuse kleinere Läsionen aufweisen und SPHK1 die Proliferation fördern sollte. Auch sehen wir in den *S1pr3*^{-/-} Mäusen, dass an Tag 21 neben *Sphk1* auch die Expression von *S1pr2* erhöht war, dies steht im Gegensatz zu den Beobachtungen von Goraraju et al. [152], wobei zu beachten ist, dass diese Beobachtungen in der Zellkultur gemacht wurden und deshalb nicht direkt mit Versuchen im Tier vergleichbar sind. Ter Braak et al. [154] zeigten, dass die Aktivierung von SPHK1 mit der Aktivierung von S1P Rezeptoren einhergeht. Wir vermuten daher, dass durch den Anstieg der Expression von *S1pr2* die antiproliferative und antimigrative Wirkung des *S1pr2* in unserem Mausmodell überwiegt und ein pro-proliferatives Signal durch vermehrte *Sphk1*-Expression nur einen geringeren Einfluss hat.

6.3.2 Veränderte Expression von Zellmarkern

Um den Einfluss der Verletzung der abdominalen Aorta in *S1pr3*^{-/-} und *S1pr3*^{+/+} Mäusen noch genauer zu untersuchen, haben wir die Expression bestimmter Zellmarker mittels RT-qPCR bestimmt. Wir haben MYH11 und SMA als Zellmarker für die VSMC, CD68 als Marker für Monozyten/Makrophagen und SCA1 als Stammzellmarker verwendet.

Da MYH11 und SMA Zellmarker für SMCs sind, sind beide hauptsächlich in der Media exprimiert (Abbildung 15B, C). Allerdings zeigte sich auch deutlich die Expression beider

Diskussion

Zellmarker in der Adventitia (Abbildung 15A, C) in unverletztem Mausegewebe. Diese Expression kann durch Myofibroblasten, Vaso vasorum oder auch endotheliale Vorläuferzellen in der Adventitia hervorgerufen werden [159]. Sowohl in der Media als auch in der Adventitia fallen die Expressionen von beiden Genen nach der Verletzung stark ab. Eine Erklärung dafür wäre die Dedifferenzierung der SMCs. Die SMCs können sich von einem differenzierten kontraktilem Phänotyp, der hauptsächlich α -Actin und Myosin enthält, zu einem nicht-kontraktilem Phänotyp umwandeln. Der nicht-kontraktile Phänotyp weist eine höhere Proliferationsrate auf [29], [30]. In verschiedenen Studien wurde auch gezeigt, dass im Blutgefäß die Balloonkatheterverletzung zur Apoptose von SMCs führt [160]. Dies könnte auch eine Erklärung für die verringerte Expression von *Myh11* und *Sma* sein. Zwischen *S1pr3*^{+/+} und *S1pr3*^{-/-} ist bei diesen Genen kein Unterschied in der Expression zu sehen.

Die Adventitia der Maus enthält eine heterogene Population von Vorläuferzellen, von denen die meisten SCA1 exprimieren [161]. Dies spiegelt sich insofern in unseren Ergebnissen wider, dass in nicht-operierten Mäusen *Sca1* hauptsächlich in der Adventitia exprimiert wurde und zu einem geringeren Teil in der Media (Abbildung 16 A, B). SCA1 positive vaskuläre Stammzellen können in der Adventitia nach einer Verletzung in die Media wandern und dort zu SMCs transdifferenzieren [162]. Chen et al. zeigten in einem Venentransplantationsmodell der Maus, dass SCA1 durch Differenzierung in SMCs aktiv an der Pathogenese von Gefäßerkrankungen beteiligt sein können [163]. In der Adventitia sahen wir bei den *S1pr3*^{+/+} Mäusen einen Trend zur höheren Expression bei nicht-operierten Mäusen im Vergleich zu den *S1pr3*^{-/-} Mäusen (nicht-signifikant; $P=0,07$). Nur in den Wildtyp Mäusen sahen wir eine Reduktion der *Sca1* Expression vier Tage nach der Operation der abdominalen Aorta (nicht-signifikant; $P=0,051$). Dies könnte ein Anzeichen dafür sein, dass die *Sca1* positiven Stammzellen in die Media wandern, wobei wir keinen signifikanten Anstieg in der Media bei den *S1pr3*^{+/+} sehen können. Ein signifikanter Anstieg war nur in der Media bei den *S1pr3*^{-/-} Mäusen an Tag 14 zu sehen.

Als Zellmarker für Monozyten/Makrophagen haben wir CD68 untersucht. Sowohl in der Adventitia als auch in der Media war die *Cd68* Expression im unverletzten Mausegefäß im Bereich des Detektionslimits (Abbildung 17A, B). Nach dem Klemmen der Aorta stieg die Expression in der Adventitia und Media stark an, dies könnte ein Hinweis auf einen Entzündungsprozess sein. Dies zeigte sich auch in der Expression der proinflammatorischen

Zytokine, welche nach der Operation stark anstiegen. Es ist möglich, dass durch die Entzündung in der Adventitia Monozyten und Makrophagen von der Adventitia in die Media migrieren und dort für die Entstehung der Intimahyperplasie mitverantwortlich sind [164]. Dies könnte den Verlauf erklären, dass die *Cd68* Expression zuerst in der Adventitia und dann etwas verspätet in der Media ansteigt. In Endothelzellen kann eine S1PR3-Aktivierung sowohl über VEGFR2 die Angiogenese fördern, als auch die Monozyten Adhäsion über ICAM-1 induzieren und die Leukodiapedese über P-Selektin beeinflussen [84]. Allerdings zeigte sich kein Unterschied zwischen *S1pr3+/+* und *S1pr3-/-* Mäusen.

6.3.3 Induktion von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen

Wie zu erwarten war, konnte bei den nicht-operierten Mäusen kaum oder keine Expression der pro- und antiinflammatorischen Zytokine (*Il1b*, *Il10*, *Ccl2*, *Gdf15*) gesehen werden (Abbildung 18-21). Nach dem Klemmen der abdominalen Aorta stieg die Expression aller gemessenen Zytokine an. In der Adventitia sind die Expressionen nach der Verletzung deutlich höher als in der Media, weil sich vor allem in der Adventitia die immunmodulierenden Zellen befinden [159].

IL1B ist ein stark proinflammatorisches Zytokin [107]. IL1B wird vor allem von Monozyten und Makrophagen sezerniert und ist an der Pathophysiologie verschiedener akuter und chronischer Entzündungszustände beteiligt [165]. Sowohl in der Media als auch in der Adventitia stieg die Expression des *Il1b* nach der Verletzung stark an, wobei es in der Adventitia stärker exprimiert wurde. Bei der Ligatur der A. carotis in der Maus zeigte sich, dass *Il1b* mit dem *Il1r1* bedeutend bei der Bildung neointimaler Läsionen ist [166]. Die Signalübertragung des IL1B spielt eine wichtige Rolle, indem sie durch Aktivierung und Hochregulierung andere Wachstumsfaktoren oder Zytokine die Migration und Proliferation der SMCs fördern [167]. Die mitogene Aktivität von IL1B auf SMCs und Fibroblasten ist wahrscheinlich auf die Wirkung von PDGF zurückzuführen [168]. In unserem Verletzungsmodell sehen wir, dass in der Adventitia am Tag 7 nach der Operation die Expression von *Il1b* in den *S1pr3+/+* Mäusen signifikant erhöht war. Dies könnte ein Hinweis sein, dass die Wildtyp-Mäuse mit einer stärkeren Inflammation auf die Verletzung reagieren als die *S1pr3-/-* Mäuse und dadurch eine verstärkte Intimahyperplasie ausbilden, wobei diese unterschiedliche Expression nur an Tag 7 auftritt und sonst die Expression zwischen den zwei

Maustypen sehr ähnlich ist. Da IL1B auch andere Wachstumsfaktoren (z. B: PDGF, VEGF) oder Zytokine (z.B M-CSF, TNF α) hochregulieren kann, könnte es sein, dass diese Mechanismen einen Einfluss auf die vermehrte Bildung von Läsionen bei Wildtyp Mäusen haben.

IL10 ist ein antiinflammatorisches Zytokin [110]. In der Media wurde ein signifikanter Anstieg der Expression von *Il10* bis Tag 14 (Abbildung 19B) gesehen, wogegen in der Adventitia ein leichter Anstieg (nicht signifikant) an Tag 4 zu sehen war, der danach wieder abflacht (Abbildung 19A). In der Media scheint die *Il10* Expression in *S1pr3*^{-/-} Mäusen höher zu sein als in den *S1pr3*^{+/+} Mäusen. Der nachgeschaltete Anstieg der Expression von IL10 könnte ein Hinweis dafür sein, dass zunächst die antiinflammatorische Wirkung in der Adventitia stattfindet und erst anschließend in der Media. IL10 hat einen hemmenden Effekt auf die Monozyten, welche in die Media wandern können [164], [169]. Feldman et al. konnten nachweisen, dass durch die Gabe von rekombinanten humanen IL10 bei Ratten nach Ballonverletzung oder Stentimplantation, die Bildung der Intimahyperplasie gehemmt werden konnte. Dieser Effekt war assoziiert mit einer Hemmung der Freisetzung von IL1B durch zirkulierende Leukozyten und einer geringeren Infiltration der Arterienwand durch aktivierte Makrophagen [170]. Mazighi et al. zeigten ebenfalls, dass IL10 die SMC-Aktivierung und Intimahyperplasie nach einer Ballonverletzung in einer Rattenaorta inhibiert und dies über die Modulierung des NF- κ B/ I- κ B-Systems hervorgerufen wird [171]. Da bei unseren Daten nur ein leichter Trend zu höheren *Il10* Expression in den *S1pr3*^{-/-} Mäusen zu sehen ist, kann deshalb nur vermutet werden, dass *Il10* eventuell eine geringe Auswirkung auf die verringerte Ausbildung der Intimahyperplasie in den *S1pr3*^{-/-} Mäusen hat.

CCL2 (auch MCP1 genannt) wird von Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen und SMCs exprimiert [172]. In der Adventitia stieg die Expression vier Tage nach der Operation signifikant an (Abbildung 20A). In der Media zeigte sich vor allem am Tag 7 ein signifikanter Anstieg nach der Operation (Abbildung 20B). Zwischen *S1pr3*^{-/-} Mäusen und *S1pr3*^{+/+} Mäusen war kein Unterscheid bei der Expression von *Ccl2* zu erkennen. Da CCL2 für die Rekrutierung von Monozyten bei entzündlichen Erkrankungen verantwortlich ist [118], könnte dieser Verlauf zeigen, dass Monozyten von der Adventitia in die Media einwandern. Im Rattenmodell konnte gezeigt werden, dass durch die Gabe von Anti-MCP-1 nach Carotisverletzung die Bildung neointimaler Läsionen signifikant reduziert werden konnte [173]. In *Apoe*^{-/-} Mäusen, bei denen *Ccl2* überexprimiert wurde, zeigte sich eine erhöhte Progression der Atherosklerose

Diskussion

mit erhöhter Zahl an Makrophagen und Anhäufung von Lipiden [174]. Diese Ergebnisse zeigen, dass *Ccl2* eine Rolle bei der Entstehung einer Intimahyperplasie nach einer Verletzung der Arterie spielen kann. Da die *Ccl2* Expression bei unseren Messungen ebenfalls nach der Verletzung ansteigt, wäre es möglich, dass dies bei uns auch einen Einfluss auf die Bildung der Läsionen in den *S1pr3+/+* und *S1pr3-/-* Mäusen hat. Tatsächlich ist kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mausgenotypen zu finden. In der Media an Tag 21 scheint es eher, dass *S1pr3-/- Ccl2* höher exprimiert als die *S1pr3+/+* Mäuse, dieses Ergebnis ist aber nicht signifikant. In Zellkulturversuchen konnte auch gezeigt werden, dass *Il10* die *Ccl2* Produktion beeinflussen kann [175]. Damit könnte erklärt werden, dass die etwas erhöhte Expression von *Il10* an Tag 21 bei den *S1pr3-/-*, die *Ccl2* Expression beeinflussen könnte.

GDF15 wird in aktivierten Makrophagen und unter pathologischen Bedingungen wie Entzündungen, Gefäßverletzungen, Drucküberlastung und oxidativen Stress von Endothelzellen, SMCs und Adipozyten produziert [121], [176]. In der Adventitia sahen wir über die verschiedenen Zeitpunkte kaum eine Veränderung der *Gdf15* Expression (Abbildung 21A). In der Media erkannten wir dagegen einen signifikanten Anstieg der Expression über den beobachteten Zeitraum (Abbildung 21B). Verschiedene Tierversuche zeigten unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf die Effekte von GDF15 bei Atherosklerose. So fanden Bonaterra et al., dass ein Mangel an GDF15 zu einer Verringerung von atherosklerotischen Läsionen führt [177] und Rochette et al., dass GDF15 die Proliferation der Endothelzellen hemmt und durch die entzündungshemmende Wirkung vor Gewebsschäden schützt [178]. In atherosklerotischen Läsionen von Mäusen zeigte sich, dass GDF15 während des Fortschreitens der Erkrankung in einem ähnlichen Muster wie CD68+-Makrophagen hochreguliert wird [179]. Dieses Muster konnten wir bei unserem Verletzungsmodell in der Media auch erkennen (Abbildung 17B, 21B). GDF15 reguliert die Apoptose, die Autophagie und entzündliche Prozesse von Makrophagen und ist an der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen beteiligt [180]. Unsere Daten zeigen, dass in der Media die Expression von *Gdf15* durch das Klemmen der abdominalen Aorta und der dadurch entstehenden Entzündung hochreguliert wird und eventuell eine Beteiligung an der Bildung der neointimalen Läsion haben kann. Es gab hier keinerlei Unterschiede zwischen *S1pr3-/-* und *S1pr3+/+*.

6.3.4 Veränderte Expression der Thrombinrezeptoren

Die Freisetzung von Thrombin spielt nicht nur bei der Thrombose, sondern auch bei der Bildung von Gefäßläsionen eine wichtige Rolle. Thrombin kann eine Vielzahl von vaskulären und inflammatorischen Zelltypen, die die Wundheilung fördern, aktivieren und durch die Aktivierung des Thrombinrezeptors diese weiter an verschiedene Zellen vermitteln [181]. Es gibt vier verschiedene Thrombinrezeptoren (Protease-Activated Rezeptor PAR1, PAR2, PAR3, PAR4) [123]. Eine Besonderheit bei PAR2 ist, dass es von mehreren Serinproteasen aktiviert werden kann, aber nicht von Thrombin [122]. Da Untersuchungen zeigten, dass PAR2 und PAR4 einen Einfluss auf die Bildung der Intimahyperplasie haben und S1P auch die Expression von PAR4 induzieren kann [123], [124], [127], [182], wurden hier nur PAR2 und PAR4 untersucht. In unseren Daten sehen wir, dass *Par2* und *Par4* in der Adventitia und Media bei nicht-operierten Mäusen ähnlich exprimiert waren. Nach der Verletzung änderte sich die Expression von *Par2* sowohl in der Adventitia und als auch in der Media nicht. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass *Par2* an der Bildung der Neointima beteiligt ist und durch die Aktivierung des Tissue Faktor/Faktor VIIa (TF/FVIIa) Komplexes oder durch den Faktor Xa wahrscheinlich die Migration der SMCs gesteigert werden kann [130], [132], [133]. Bei den Expressionsdaten von *Par4* zeigte sich in der Media eine signifikante Reduktion der Expression nach der Verletzung der abdominalen Aorta. In der Adventitia konnte man ebenfalls einen Trend zur niedrigeren Expression erkennen, dieser war aber nicht signifikant. Durch Verletzungen, diabetischen oder entzündlichen Stress oder Infektion kann die Expression von PAR4 hochreguliert werden. Es kommt dadurch zur Rekrutierung von Neutrophilen, Granulozyten und Monozyten und in den SMCs durch Freisetzung von Zytokinen und Entzündungsmediatoren zu deren Proliferation, Migration und Differenzierung [123]. Mahajan-Thakur et al. zeigten auch, dass S1P die PAR4 Expression hochregulieren konnte und die Zellmigration in Monozyten verstärkte [100]. Die bisherigen Daten weisen darauf hin, dass nach einer Verletzung PAR4 hochreguliert wird. Im Gegensatz dazu fanden wir in unseren Untersuchungen beim Klemmen der Aorta in der Media aber eine Reduktion der Expression von *Par4*. Eine mögliche Ursache dafür wäre, dass es zur Apoptose von SMCs kommen könnte und dadurch die Expression vorübergehend sinkt und am Tag 14 und Tag 21 die Expression wieder steigt. Demgegenüber zeigte sich für *Par2* jedoch keine Abnahme der Expression an Tag 4, so dass zu diesem Zeitpunkt die relative Expression von *Par2* im Verhältnis zu *Par4*

größer ist. Zwischen den *S1pr3+/+* und *S1pr3-/-* Mäusen zeigte weder für *Par2* noch für *Par4* ein Unterschied der Expression im untersuchten unverletzten und verletzten Gefäßabschnitt.

6.3.5 Reduzierte Expression des Transkriptionsfaktors *Crtc1* nach Verletzung

CRTC1 gehört zu der Klasse der CREB Coaktivatoren [129]. Die Expression von *Crtc1* war bei den nicht-operierten Mäusen in der Media und Adventitia ähnlich. Sowohl in der Adventitia als auch in der Media sank die Expression signifikant nach der Verletzung der abdominalen Aorta (Abbildung 23A, B). Diese Beobachtung konnte auch A. Grundler et al. machen, die die Expression von *Crtc1* in *S1pr3+/+* und *S1pr3-/-* nach der Carotisligatur gemessen hatte [133]. Im Herzgewebe zeigte sich, dass CRTC1 eine wichtige Rolle bei der Regulation der Herzfunktion bzw. des Herzwachstums spielen kann [130]. Neben CRTC1 kann S1P auch CREB aktivieren. Die S1P-induzierte CREB-Aktivierung ist von der ERK1/2- und Ca²⁺-Calmodulin abhängige Proteinkinase (CaMK) abhängig [184]. In Gefäßen zeigte sich CREB als ein wichtiger Transkriptionsfaktor für den Prozess des Gefäßumbaus. Hemmung der CREB-Funktion kann die Apoptose von SMCs induzieren und die Neointimabildung nach Gefäßverletzung unterdrücken [185]. Andere Studien zeigten auch, dass die aktive CREB zu einer verringerten Expression von einer Reihe von zellzyklus- und wachstumsbezogenen Genprodukten führt, welches einen potenziellen Mechanismus für die antiproliferative Wirkung von CREB darstellt [186]. CREB könnte in der Lage sein, die Proliferation zu hemmen oder zu fördern, je nach aktivierendem Stimulus oder Mechanismus. Die CRTC-vermittelte CREB-Aktivierung scheint die Proliferation von SMC zu unterdrücken [187]. Wie oben schon beschrieben, zeigte sich bei uns erst eine Reduktion der Expression von *Crtc1*, die am Tag 14 nach der Operation wieder auf den Baseline Niveau angestiegen war. Auch sahen wir keinen Unterschied in der Expression von *Crtc1* zwischen *S1pr3+/+* und *S1pr3-/-* Mäusen. Wir konnten keinen Hinweis dafür finden, dass die Expression von *Crtc1* einen Einfluss auf die unterschiedliche Ausbildung von Intimahyperplasie bei den zwei Mausgenotypen hat.

6.4 S1P und Zytokin-Konzentrationen in Gefäßpatienten

S1P ist ein bioaktives Lipid, das eine wichtige Rolle in der Immunität, Inflammation und kardiovaskulären Physiologie spielt [63]. S1P wird hauptsächlich von Erythrozyten und Endothelzellen, aber auch von Thrombozyten gebildet [44]. S1P wird durch die SphK1 und 2 phosphoryliert und kann durch Phosphatasen oder der S1P Lyase abgebaut werden [40], [42].

Diskussion

In den untersuchten Patienten mit pAVK oder Carotisstenose lag die Serum-S1P Konzentration um 19% höher im Vergleich zur Plasma-S1P Konzentration. Diese Beobachtung stimmt mit bereits publizierten Werten aus einer Kohorte von gesunden Probanden überein, in der die Serum-S1P Konzentration 39% höher lag als S1P Konzentration im Plasma [168]. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass während der Blutgerinnung die Thrombozyten S1P freisetzen [46]. Thrombozyten können S1P bilden und dieses in Vesikeln speichern. Während der Blutgerinnung kommt es zur Thrombozytenaggregation und Freisetzung des gespeicherten S1P [165]. In den untersuchten Patienten mit pAVK oder Carotisstenose kam es zu einem 16%igen Abfall der Plasma-S1P Konzentration während des operativen Eingriffes der Gefäßwiedereröffnung. Die Beobachtung hatte zuvor schon Greiwe et al in einer prospektiven Beobachtungsstudie bei Patienten, die einer Herzoperation unterzogen wurden, gemacht. Diesen Patienten wurde ein initialer i.v. Bolus von 300-400IE/kg Heparin verabreicht [189]. Dort wurde vermutet, dass Heparin für den Abfall des S1P-Spiegels nach der Operation verantwortlich ist. Yatomi et al. und Kobayashi et al. beschrieben, dass S1P durch Thrombin-aktivierte Thrombozyten freigesetzt wird [190], [191]. Heparine bilden einen Komplex mit Antithrombin-III und können dadurch unter anderem Thrombin und Faktor Xa hemmen [192]. Faktor Xa kann die Expression von SphK1 induzieren und dadurch die Bildung von S1P erhöhen [193]. Durch die Hemmung des Thrombins ist es möglich, dass weniger S1P aus den Thrombozyten freigesetzt wird und durch die zusätzliche Hemmung des Faktors Xa, der Spiegel des zirkulierenden S1P verringert wird. Dies würde erklären, warum das Serum-S1P nach der Operation sinkt. Soltau et al. zeigten, dass der Serum-S1P Spiegel bei Patienten mit CS oder pAVK 6 Monate nach einer chirurgischen oder endovaskulären Intervention höher war als vor der Intervention. Es ist zu beachten, dass bei dieser Auswertung Patienten, die eine Antikoagulationstherapie bekommen haben, ausgeschlossen wurden [62].

Bei Patienten mit Sepsis zeigte sich, dass das Plasma-S1P stark absinkt und ein Prognosefaktor für die Sterblichkeit an einer Sepsis sein kann [57], [58]. Auch zeigte sich bei Sepsispatienten, dass die SphK1 Expression in den Thrombozyten signifikant erniedrigt war. Dies könnte ein Hinweis sein, dass die gesunkene SphK1 Expression und die draus folgende reduzierte SphK-Aktivität für die geringeren Plasma-S1P Werte verantwortlich ist [194]. Durch ASS kann es zu einer reduzierten Freisetzung von S1P kommen. Das von Thrombozyten während der Thrombozytenaggregation gebildete Thromboxan A2 aktiviert auto- und parakrin den

Thromboxan A₂-Rezeptor, wodurch es zu einer Proteinkinase C- und ABC-Transporter-abhängigen Freisetzung des S1P kommt [195]. 35 der von uns untersuchten Patienten mit pAVK oder Carotisstenose wurden mit ASS behandelt, so dass es bei diesen Patienten zu einer verminderten S1P-Freisetzung während der Blutgerinnung gekommen sein kann.

Je nach Wahl der Operation, die notwendig ist, um den Blutfluss zu rekonstruieren, kann es unter Umständen zu einem hohen Blutverlust kommen und die Gabe von Bluttransfusionen erforderlich machen. Selim et al. zeigten, dass Erythrozyten-Transfusionen die normale S1P-Homöostase stört und es dadurch zu einer Erniedrigung des S1P-Spiegels kommt [196]. Da 39 unserer Patienten während der Operation eine Transfusion oder einen Flüssigkeitsersatz bekommen haben, könnte dies eine Erklärung für die postoperative Erniedrigung des Plasma-S1P Spiegels sein. Eine weitere Möglichkeit könnte der Verdünnungseffekt nach der Gabe der Erythrozytenkonzentrate oder auch von Flüssigkeit sein, da zusätzliches Volumen in den Blutkreislauf eingebracht wird. Auch zeigte sich, dass Erythrozyten-Transfusionen, die länger gelagert wurden, eine geringere S1P Konzentration aufweisen, da in den Erythrozyten die S1P Lyase und Phosphatase aktiv sind und das S1P degradieren [196].

6.5 Plasma-S1P Spiegel korrelieren mit *IL1B* Konzentrationen

Entzündungen spielen eine zentrale Rolle bei den pathophysiologischen Prozessen der Restenose nach Stentimplantation und chirurgischen Interventionen [197]. Die Stentimplantation und auch bei offen chirurgischen Operationen führt zu einer mechanischen Verletzung, die das lokale Entzündungsmediatorensystem induzieren kann, welche dann die Proliferation der SMCs und die Ablagerung von extrazellulärer Matrix fördern kann. Dies kann zur Bildung der Neointima und einer Restenose führen [97]. Das Zusammenspiel zwischen SphK1 und 2, S1P und S1PRs hat eine wichtige Rolle bei der proinflammatorischen Reaktion von Makrophagen und beeinflusst dadurch ebenfalls die Pathogenese von entzündlichen Erkrankungen [198]. In den ausgewählten 40 Patienten der Gesamtkohorte haben wir verschiedene Zytokine im Blut gemessen und nur *IL1B* korreliert mit dem Plasma-S1P Wert. Es wurde bereits gezeigt, dass *IL1B* nach einer Stentimplantation im Blut (Blutabnahme 20min bzw. 24h nach der Operation) stark ansteigt [197], [199]. Es wird vermutet, dass *IL1B* an der Pathogenese der Restenose beteiligt ist. Während dieses Prozesses wird häufig eine Bildung von Wandthromben beobachtet [199]. Es wurde berichtet, dass die Thromben reich an *IL1B*

sind und IL1B vorwiegend aus den Thrombozyten stammt. Indem IL1B die weitere Zytokinproduktion von SMCs stimuliert, triggert IL1B die lokalen Entzündungsprozesse in der Gefäßwand [200]. Bei unserer Studiengruppe zeigte sich nur ein Trend einer leichten Erhöhung des *IL1B*-Spiegels postoperativ im Vergleich zu präoperativen Werten. Möglicherweise kommt es im weiteren postoperativen Verlauf zu einem stärkeren Anstieg.

In der Korrelationsanalyse zeigte sich eine positive Korrelation zwischen dem postoperativen Plasma-S1P Wert und dem postoperativen *IL1B* Wert. In SMCs von Ratten zeigte sich, dass S1P die *IL1B* induzierte Produktion von NO und die iNOS-Expression inhibieren kann. NO spielt eine kritische Rolle bei der lokalen Gefäßverletzung und -umbau [201]. Andererseits reduzierte in einem Mausmodell der Sepsis die Hemmung von SphK1 sowohl die Sterblichkeit als auch die durch die Sepsis bedingten Lungenschäden. Die Hemmung von SphK1 unterdrückt sowohl die NLRP3/Caspase-1-abhängige IL1B Aktivierung als auch Freisetzung aus den Makrophagen [202]. Das NLRP3-Inflammasom ist eine wichtige Komponente des angeborenen Immunsystems, die die Aktivierung der proinflammatorischen Zytokine IL1B/IL18 als Reaktion auf Infektionen und Zellschäden vermittelt [203]. In einem Zellkulturversuch, bei dem Monozyten aus dem Knochenmark isoliert wurden, zu Makrophagen differenzierten, und durch LPS aktiviert wurden, unterdrückte die Hemmung von S1PR3 die Expression von NLRP3 und pro-IL1B und schwächte die ATP-induzierte NLRP3-Inflammasom Aktivierung ab [204]. Diese Daten verdeutlichen den Zusammenhang zwischen S1P und *IL1B*, zeigen jedoch, dass je nach Modell und Erkrankung eine Stimulation durch S1P dominieren kann. Möglicherweise hängt dies mit den unterschiedlichen S1P-Rezeptoren zusammen.

6.6 Fazit

Wir konnten in unserem Verletzungsmodell zeigen, dass nach Klemmen der abdominalen Aorta, die *S1pr3+/+* Mäuse größere Läsionen ausbilden als die *S1pr3-/-* Mäuse. Der S1PR3 hat damit wahrscheinlich einen Einfluss auf die Ausbildung der Intimahyperplasie nach einer Gefäßverletzung. Bei der Untersuchung welche Gene möglicherweise zwischen den zwei Mausgenotypen nach der Verletzung unterschiedlich exprimiert sind, zeigte sich bei der Expression von *S1pr2*, *Sphk1* und *Il1b* zu bestimmten Zeitpunkten signifikante Unterschiede zwischen *S1pr3+/+* und *S1pr3-/-* Mäusen. *S1pr2* war stärker in den *S1pr3-/-* Mäusen exprimiert. Da S1PR2 eine antiproliferative und antimigratorische Wirkung in SMCs zu

Diskussion

gesprochen wird [147] und *S1pr3*^{-/-} Mäuse weniger Läsionen entwickeln, kann die erhöhte Expression von *S1pr2* in den *S1pr3*^{-/-} ein wichtiger Indikator für die verringerte Intimahyperplasie sein. *Il1b* war nach der Verletzung verstärkt in den *S1pr3*^{+/+} Mäusen induziert. IL1b ist ein stark proinflammatorisches Zytokin und spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung, Migration und Proliferation des SMCs [107], [167]. Dies könnte auch erklären, warum *S1pr3*^{+/+} Mäuse eine größere Intimahyperplasie aufweisen. Zusätzlich fanden wir in einer Kohorte von pAVK- und CS-Patienten eine Korrelation zwischen den Plasma-S1P und *IL1B* nach der Operation. Zu beachten ist, dass die Mausdaten Expressionsanalysen aus dem Gewebe sind, wohingegen es sich bei den Patienten sich um Blutanalysen handelt. Weitere Untersuchungen müssen unternommen werden, um zu analysieren, welche Rolle S1P und sein Rezeptor *S1pr3* im Zusammenhang mit *Il1b* bei der Entstehung der Atherosklerose bzw. deren Restenose spielt. *Sphk1* war in den Knockout Mäusen stärker exprimiert. Da Studien zeigen, dass *Sphk1* das Zellwachstum steigert [156]–[158], war dieses Ergebnis entgegen unserer Erwartungen. Es ist zu beachten, dass die signifikanten Unterschiede jeweils nur an einem Zeitpunkt nachweisbar waren. Um genauere Aussagen über die Regulation dieser Gene zu machen, müssen noch weitere Experimente gemacht werden und noch weitere potentiell regulierende Gene in diesem Mausmodell untersucht werden.

7 Ausblick

Um genauere Aussagen über die Regulation der Gene zu machen, müssten weitere Experimente durchgeführt werden. Das Verletzungsmodell der abdominalen Aorta könnte z.B. bei den *S1pr2*^{-/-} Mäusen angewendet werden. Da wir Unterschiede bei der Expression des *S1pr2* zwischen den *S1pr3*^{-/-} und *S1pr3*^{+/+} Mäusen sehen, wäre es interessant wie ausgeprägt die Intimahyperplasie im Verletzungsmodell der abdominalen Aorta in den *S1pr2*^{-/-} Mäusen ist. Neben den Expressionsdaten von *Il1b* in den Mäusen könnte man auch die *Il1b* Konzentration im Blut der operierten Mäuse messen, um herauszufinden, ob sich dort nach der Verletzung der abdominalen Aorta die Konzentration ändert. In der Zellkultur wäre einer der nächsten Schritte Immunzellen, wie z.B die Bone-marrow- derived Macrophages (BMDM) aus den *S1pr3*^{-/-} und *S1pr3*^{+/+} Mäusen zu isolieren und durch Stimulation von LPS die Expression von *Il1b* zu bestimmen. Eine weitere Möglichkeit ist die Transplantation von Knochenmarkszellen der *S1pr3*^{-/-} Mäuse in Wildtyp Mäusen und anschließende Verletzung der abdominalen Aorta, um zu untersuchen ob die Intimahyperplasie geringer ausfällt.

8 Literaturverzeichnis

- [1] C. Dornquast, L. E. Kroll, H. K. Neuhauser, S. N. Willich, T. Reinhold, und M. A. Busch, „Regional Differences in the Prevalence of Cardiovascular Disease“, *Dtsch. Ärztebl. Int.*, Okt. 2016, doi: 10.3238/arztebl.2016.0704.
- [2] „Deutscher Herzbericht 2021“.
- [3] E. Falk, „Pathogenesis of Atherosclerosis“, *J. Am. Coll. Cardiol.*, Bd. 47, Nr. 8, S. C7–C12, Apr. 2006, doi: 10.1016/j.jacc.2005.09.068.
- [4] C. K. Glass, „Atherosclerosis: The Road Ahead“. Cell Press, Volume 104, Issue 4, 23. February 2001, Pages 503-516. [Online]. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00238-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00238-0)
- [5] T. C. Gasser, R. W. Ogden, und G. A. Holzapfel, „Hyperelastic modelling of arterial layers with distributed collagen fibre orientations“, *J. R. Soc. Interface*, Bd. 3, Nr. 6, S. 15–35, Feb. 2006, doi: 10.1098/rsif.2005.0073.
- [6] P. Libby, P. M. Ridker, und G. K. Hansson, „Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis“, *Nature*, Bd. 473, Nr. 7347, S. 317–325, Mai 2011, doi: 10.1038/nature10146.
- [7] R. Ross und J. A. Glomset, „Atherosclerosis and the Arterial Smooth Muscle Cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis.“, *Science*, Bd. 180, Nr. 4093, S. 1332–1339, Juni 1973, doi: 10.1126/science.180.4093.1332.
- [8] P. Rösen, „Endotheliale Dysfunktion: ein Synonym für funktionelle Atherosklerose“.
- [9] G. K. Hansson, „Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease“, *N. Engl. J. Med.*, 2005.
- [10] P. Libby, „Inflammation in atherosclerosis“, Bd. 420, 2002.
- [11] D. P. Faxon *u. a.*, „Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group III: Pathophysiology“, *Circulation*, Bd. 109, Nr. 21, S. 2617–2625, Juni 2004, doi: 10.1161/01.CIR.0000128520.37674.EF.
- [12] A. J. Lusis, „Atherosclerosis“, *Nature*, Bd. 407, Nr. 6801, S. 233–241, Sep. 2000, doi: 10.1038/35025203.
- [13] R. Ross, „Cell Biology of Atherosclerosis“.
- [14] R. Russell, „Atherosclerosis — An Inflammatory Disease“, *N. Engl. J. Med.*, 1999.

- [15] R. Erbel *u. a.*, „Hochfrequenz-Rotationsatherektomie bei koronarer Herzkrankheit“, *DMW - Dtsch. Med. Wochenschr.*, Bd. 114, Nr. 13, S. 487–495, März 2008, doi: 10.1055/s-2008-1066623.
- [16] J. Becker-Lienau, „Direktionale Atherektomie arteriosklerotischer stenosierender Plaques der femoro-poplitealen Strombahn: Endpunktbestimmung mittels invasiver Druckdraht-Messung“.
- [17] Ch. Kügler, „Kathetergestützte Ultraschall-Angioplastie – Grundlagen, Anwendungsmöglichkeiten, klinische Daten“, Bd. *Vasa*, Nr. 33 Suppl. 64, 2004, doi: <https://doi.org/10.1024/0301-1526.33.S64.45>.
- [18] R. Köster, J. Kähler, C. Brockhoff, T. Münzel, und T. Meinertz, „Laser Coronary Angioplasty“, *Am J Cardiovasc Drugs*.
- [19] A. Grüntzig, „Transluminal Dilatation of Coronary-Artery Stenosis“. *The Lancet*, Volume 311, Issue 8058, 4 February 1978, Page 263. [Online]. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(78\)90500-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(78)90500-7)
- [20] Z. A. Ali, „The science of stents: angioplasty turns 40“, *Cardiovasc. Res.*, Bd. 113, Nr. 10, S. e35–e37, Aug. 2017, doi: 10.1093/cvr/cvx119.
- [21] D. L. Fischman *u. a.*, „A Randomized Comparison of Coronary-Stent Placement and Balloon Angioplasty in the Treatment of Coronary Artery Disease“, *N. Engl. J. Med.*, Bd. 331, Nr. 8, S. 496–501, Aug. 1994, doi: 10.1056/NEJM199408253310802.
- [22] M.-C. Morice, E. B. Hayashi, und G. Guagliumi, „A Randomized Comparison of a Sirolimus-Eluting Stent with a Standard Stent for Coronary Revascularization“, *N. Engl. J. Med.*, 2002.
- [23] D. Buccheri, D. Piraino, G. Andolina, und B. Cortese, „Understanding and managing in-stent restenosis: a review of clinical data, from pathogenesis to treatment“, *J. Thorac. Dis.*, Bd. 8, Nr. 10, S. E1150–E1162, Okt. 2016, doi: 10.21037/jtd.2016.10.93.
- [24] D. Piraino, G. Cimino, D. Buccheri, G. Dendramis, G. Andolina, und B. Cortese, „Recurrent in-stent restenosis, certainty of its origin, uncertainty about treatment“, *Int. J. Cardiol.*, Bd. 230, S. 91–96, März 2017, doi: 10.1016/j.ijcard.2016.12.073.
- [25] M. A. Costa und D. I. Simon, „Molecular Basis of Restenosis and Drug-Eluting Stents“, *Circulation*, Bd. 111, Nr. 17, S. 2257–2273, Mai 2005, doi: 10.1161/01.CIR.0000163587.36485.A7.

- [26] B. Mills, T. Robb, und D. Larson, „Intimal hyperplasia: slow but deadly“, *Perfusion*, Bd. 27, Nr. 6, S. 520–528, Nov. 2012, doi: 10.1177/0267659112452316.
- [27] J. S. Forrester, M. Fishbein, R. Helfant, und J. Fagin, „A paradigm for restenosis based on cell biology: Clues for the development of new preventive therapies“, *J. Am. Coll. Cardiol.*, Bd. 17, Nr. 3, S. 758–769, März 1991, doi: 10.1016/S0735-1097(10)80196-2.
- [28] S. O. Marx, H. Totary-Jain, und A. R. Marks, „Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation in Restenosis“, *Circ. Cardiovasc. Interv.*, Bd. 4, Nr. 1, S. 104–111, Feb. 2011, doi: 10.1161/CIRCINTERVENTIONS.110.957332.
- [29] M. S. Lemson, J. H. M. Tordoir, M. J. A. P. Daemen, und P. J. E. H. M. Kitslaar, „Intimal Hyperplasia in Vascular Grafts“, *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, Bd. 19, Nr. 4, S. 336–350, Apr. 2000, doi: 10.1053/ejvs.1999.1040.
- [30] S. Chang *u. a.*, „Phenotypic Modulation of Primary Vascular Smooth Muscle Cells by Short-Term Culture on Micropatterned Substrate“, *PLoS ONE*, Bd. 9, Nr. 2, S. e88089, Feb. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0088089.
- [31] M. G. Davies und P.-O. Hagen, „Pathophysiology of Vein Graft Failure: A Review“, 1995.
- [32] A. C. Newby und A. B. Zaltsman, „Molecular mechanisms in intimal hyperplasia“, *J. Pathol.*, Bd. 190, Nr. 3, S. 300–309, Feb. 2000, doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(200002)190:3<300::AID-PATH596>3.0.CO;2-I.
- [33] J. Clare, J. Ganly, C. A. Bursill, H. Sumer, P. Kingshott, und J. B. de Haan, „The Mechanisms of Restenosis and Relevance to Next Generation Stent Design“, *Biomolecules*, Bd. 12, Nr. 3, S. 430, März 2022, doi: 10.3390/biom12030430.
- [34] G. E. Havelka und M. R. Kibbe, „The Vascular Adventitia: Its Role in the Arterial Injury Response“, *Vasc. Endovascular Surg.*, Bd. 45, Nr. 5, S. 381–390, Juli 2011, doi: 10.1177/1538574411407698.
- [35] J. L. W. Thudicum, *A treatise on the chemical constitutin of the braun*. Bailliere, Tindall, and Cox, 1884.
- [36] A. H. Merrill, „De Novo Sphingolipid Biosynthesis: A Necessary, but Dangerous, Pathway“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 277, Nr. 29, S. 25843–25846, Juli 2002, doi: 10.1074/jbc.R200009200.

- [37] S. Borodzicz, K. Czarzasta, M. Kuch, und A. Cudnoch-Jedrzejewska, „Sphingolipids in cardiovascular diseases and metabolic disorders“, *Lipids Health Dis.*, Bd. 14, Nr. 1, S. 55, Dez. 2015, doi: 10.1186/s12944-015-0053-y.
- [38] J. Iqbal, M. T. Walsh, S. M. Hammad, und M. M. Hussain, „Sphingolipids and Lipoproteins in Health and Metabolic Disorders“, *Trends Endocrinol. Metab.*, Bd. 28, Nr. 7, S. 506–518, Juli 2017, doi: 10.1016/j.tem.2017.03.005.
- [39] W. Wang, P. Toran, R. Sabol, T. Brown, und B. Barth, „Epigenetics and Sphingolipid Metabolism in Health and Disease“, *Int. J. Biopharm. Sci.*, Bd. 1, Nr. 2, Jan. 2018, doi: 10.31021/ijbs.20181105.
- [40] A. C. Lewis, C. T. Wallington-Beddoe, J. A. Powell, und S. M. Pitson, „Targeting sphingolipid metabolism as an approach for combination therapies in haematological malignancies“, *Cell Death Discov.*, Bd. 4, Nr. 1, S. 72, Juni 2018, doi: 10.1038/s41420-018-0075-0.
- [41] R. L. Proia und T. Hla, „Emerging biology of sphingosine-1-phosphate: its role in pathogenesis and therapy“, *J. Clin. Invest.*, Bd. 125, Nr. 4, S. 1379–1387, Apr. 2015, doi: 10.1172/JCI76369.
- [42] Y. Yatomi, Y. Ozaki, T. Ohmori, und Y. Igarashi, „Sphingosine 1-phosphate: synthesis and release“, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, Bd. 64, Nr. 1–4, S. 107–122, Apr. 2001, doi: 10.1016/S0090-6980(01)00103-4.
- [43] M. Maceyka, K. B. Harikumar, S. Milstien, und S. Spiegel, „Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease“, *Trends Cell Biol.*, Bd. 22, Nr. 1, S. 50–60, Jan. 2012, doi: 10.1016/j.tcb.2011.09.003.
- [44] K. Yanagida und T. Hla, „Vascular and Immunobiology of the Circulatory Sphingosine 1-Phosphate Gradient“, *Annu. Rev. Physiol.*, Bd. 79, Nr. 1, S. 67–91, Feb. 2017, doi: 10.1146/annurev-physiol-021014-071635.
- [45] M. Serra und J. D. Saba, „Sphingosine 1-phosphate lyase, a key regulator of sphingosine 1-phosphate signaling and function“, *Adv. Enzyme Regul.*, Bd. 50, Nr. 1, S. 349–362, 2010, doi: 10.1016/j.advenzreg.2009.10.024.
- [46] Y. Yatomi *u. a.*, „Sphingosine 1-Phosphate, a Bioactive Sphingolipid Abundantly Stored in Platelets, Is a Normal Constituent of Human Plasma and Serum“, *J. Biochem. (Tokyo)*, Bd. 121, Nr. 5, S. 969–973, Mai 1997, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021681.

- [47] S. Fukuhara *u. a.*, „The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells regulates lymphocyte trafficking in mice“, *J. Clin. Invest.*, Bd. 122, Nr. 4, S. 1416–1426, Apr. 2012, doi: 10.1172/JCI60746.
- [48] C. Bode *u. a.*, „Erythrocytes serve as a reservoir for cellular and extracellular sphingosine 1-phosphate“, *J. Cell. Biochem.*, S. n/a-n/a, 2010, doi: 10.1002/jcb.22507.
- [49] C. Christoffersen *u. a.*, „Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M“, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Bd. 108, Nr. 23, S. 9613–9618, Juni 2011, doi: 10.1073/pnas.1103187108.
- [50] C. Christoffersen und L. B. Nielsen, „Apolipoprotein M: bridging HDL and endothelial function“, *Curr. Opin. Lipidol.*, Bd. 24, Nr. 4, S. 295–300, Aug. 2013, doi: 10.1097/MOL.0b013e328361f6ad.
- [51] E. Moritz *u. a.*, „Reference intervals for serum sphingosine-1-phosphate in the population-based Study of Health in Pomerania“, *Clin. Chim. Acta*, Bd. 468, S. 25–31, Mai 2017, doi: 10.1016/j.cca.2017.01.029.
- [52] T. H. M. Pham *u. a.*, „Lymphatic endothelial cell sphingosine kinase activity is required for lymphocyte egress and lymphatic patterning“, *J. Exp. Med.*, Bd. 207, Nr. 1, S. 17–27, Jan. 2010, doi: 10.1084/jem.20091619.
- [53] V. Brinkmann *u. a.*, „Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis“, *Nat. Rev. Drug Discov.*, Bd. 9, Nr. 11, S. 883–897, Nov. 2010, doi: 10.1038/nrd3248.
- [54] A. Compston und A. Coles, „Multiple sclerosis“, *The Lancet*, Bd. 359, Nr. 9313, S. 1221–1231, Apr. 2002, doi: 10.1016/S0140-6736(02)08220-X.
- [55] H. Rosen, R. C. Stevens, M. Hanson, E. Roberts, und M. B. A. Oldstone, „Sphingosine-1-Phosphate and Its Receptors: Structure, Signaling, and Influence“, *Annu. Rev. Biochem.*, Bd. 82, Nr. 1, S. 637–662, Juni 2013, doi: 10.1146/annurev-biochem-062411-130916.
- [56] Q. He *u. a.*, „S1P Signaling Pathways in Pathogenesis of Type 2 Diabetes“, *J. Diabetes Res.*, Bd. 2021, S. 1–12, Jan. 2021, doi: 10.1155/2021/1341750.
- [57] M. S. Winkler *u. a.*, „Loss of sphingosine 1-phosphate (S1P) in septic shock is predominantly caused by decreased levels of high-density lipoproteins (HDL)“, *J. Intensive Care*, Bd. 7, Nr. 1, S. 23, Dez. 2019, doi: 10.1186/s40560-019-0376-2.

- [58] M. S. Winkler, A. Nierhaus, A. Poppe, G. Greiwe, M. H. Gräler, und G. Daum, „Sphingosine-1-Phosphate: A Potential Biomarker and Therapeutic Target for Endothelial Dysfunction and Sepsis?“, *Shock*, Bd. 47, Nr. 6, S. 666–672, Juni 2017, doi: 10.1097/SHK.0000000000000814.
- [59] N. Li, „Implication of sphingosin-1-phosphate in cardiovascular regulation“, *Front. Biosci.*, Bd. 21, Nr. 7, S. 1296–1313, 2016, doi: 10.2741/4458.
- [60] N. J. Pyne und S. Pyne, „Sphingosine 1-phosphate and cancer“, *Nat. Rev. Cancer*, Bd. 10, Nr. 7, S. 489–503, Juli 2010, doi: 10.1038/nrc2875.
- [61] N. C. Hait, C. A. Oskeritzian, S. W. Paugh, S. Milstien, und S. Spiegel, „Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases“, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, Bd. 1758, Nr. 12, S. 2016–2026, Dez. 2006, doi: 10.1016/j.bbamem.2006.08.007.
- [62] I. Soltau *u. a.*, „Serum-Sphingosine-1-Phosphate Concentrations Are Inversely Associated with Atherosclerotic Diseases in Humans“, *PLOS ONE*, Bd. 11, Nr. 12, S. e0168302, Dez. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0168302.
- [63] K. J. E. Sattler *u. a.*, „Sphingosine 1-phosphate levels in plasma and HDL are altered in coronary artery disease“, *Basic Res. Cardiol.*, Bd. 105, Nr. 6, S. 821–832, Nov. 2010, doi: 10.1007/s00395-010-0112-5.
- [64] G. Daum, A. Grabski, und M. A. Reidy, „Sphingosine 1-Phosphate: A Regulator of Arterial Lesions“, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, Bd. 29, Nr. 10, S. 1439–1443, Okt. 2009, doi: 10.1161/ATVBAHA.108.175240.
- [65] V. A. Blaho und T. Hla, „An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors“, *J. Lipid Res.*, Bd. 55, Nr. 8, S. 1596–1608, Aug. 2014, doi: 10.1194/jlr.R046300.
- [66] J. Chun, T. Hla, K. R. Lynch, S. Spiegel, und W. H. Moolenaar, „International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid Receptor Nomenclature: TABLE 1“, *Pharmacol. Rev.*, Bd. 62, Nr. 4, S. 579–587, Dez. 2010, doi: 10.1124/pr.110.003111.
- [67] S. Spiegel und S. Milstien, „Sphingosine 1-Phosphate, a Key Cell Signaling Molecule“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 277, Nr. 29, S. 25851–25854, Juli 2002, doi: 10.1074/jbc.R200007200.
- [68] K. Mendelson, T. Evans, und T. Hla, „Sphingosine 1-phosphate signalling“, *Development*, Bd. 141, Nr. 1, S. 5–9, Jan. 2014, doi: 10.1242/dev.094805.
- [69] T. Sanchez, „Sphingosine-1-Phosphate Signaling in Endothelial Disorders“, *Curr. Atheroscler. Rep.*, Bd. 18, Nr. 6, S. 31, Juni 2016, doi: 10.1007/s11883-016-0586-1.

- [70] A. Cartier und T. Hla, „Sphingosine 1-phosphate: Lipid signaling in pathology and therapy“, *Science*, Bd. 366, Nr. 6463, S. eaar5551, Okt. 2019, doi: 10.1126/science.aar5551.
- [71] C. Rutherford *u. a.*, „Regulation of cell survival by sphingosine-1-phosphate receptor S1P1 via reciprocal ERK-dependent suppression of Bim and PI-3-kinase/protein kinase C-mediated upregulation of Mcl-1“, *Cell Death Dis.*, Bd. 4, Nr. 11, S. e927–e927, Nov. 2013, doi: 10.1038/cddis.2013.455.
- [72] E. Jozefczuk, T. J. Guzik, und M. Siedlinski, „Significance of sphingosine-1-phosphate in cardiovascular physiology and pathology“, *Pharmacol. Res.*, Bd. 156, S. 104793, Juni 2020, doi: 10.1016/j.phrs.2020.104793.
- [73] M. L. Allende, T. Yamashita, und R. L. Proia, „G-protein-coupled receptor S1P1 acts within endothelial cells to regulate vascular maturation“, *Blood*, Bd. 102, Nr. 10, S. 3665–3667, Nov. 2003, doi: 10.1182/blood-2003-02-0460.
- [74] Y. Liu *u. a.*, „Edg-1, the G protein–coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation“, *J. Clin. Invest.*, Bd. 106, Nr. 8, S. 951–961, Okt. 2000, doi: 10.1172/JCI10905.
- [75] A. B. Shoham *u. a.*, „S1P1 inhibits sprouting angiogenesis during vascular development“, *Development*, Bd. 139, Nr. 20, S. 3859–3869, Okt. 2012, doi: 10.1242/dev.078550.
- [76] B. Jung *u. a.*, „Flow-Regulated Endothelial S1P Receptor-1 Signaling Sustains Vascular Development“, *Dev. Cell*, Bd. 23, Nr. 3, S. 600–610, Sep. 2012, doi: 10.1016/j.devcel.2012.07.015.
- [77] S. Galvani *u. a.*, „HDL-bound sphingosine 1-phosphate acts as a biased agonist for the endothelial cell receptor S1P₁ to limit vascular inflammation“, *Sci. Signal.*, Bd. 8, Nr. 389, Aug. 2015, doi: 10.1126/scisignal.aaa2581.
- [78] R. Jorgensen *u. a.*, „Deletion of Sphingosine 1-Phosphate receptor 1 in cardiomyocytes during development leads to abnormal ventricular conduction and fibrosis“, *Physiol. Rep.*, Bd. 9, Nr. 19, S. e15060, Okt. 2021, doi: 10.14814/phy2.15060.
- [79] D. T. Bolick *u. a.*, „Sphingosine-1-Phosphate Prevents Tumor Necrosis Factor- α -Mediated Monocyte Adhesion to Aortic Endothelium in Mice“, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, Bd. 25, Nr. 5, S. 976–981, Mai 2005, doi: 10.1161/01.ATV.0000162171.30089.f6.

- [80] M. J. Kluk und T. Hla, „Role of the Sphingosine 1-Phosphate Receptor EDG-1 in Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration“, *Circ. Res.*, Bd. 89, Nr. 6, S. 496–502, Sep. 2001, doi: 10.1161/hh1801.096338.
- [81] J. Braetz, A. Becker, M. Geissen, A. Larena-Avellaneda, S. Schrepfer, und G. Daum, „Sphingosine-1-phosphate receptor 1 regulates neointimal growth in a humanized model for restenosis“, *J. Vasc. Surg.*, Bd. 68, Nr. 6, S. 201S-207S, Dez. 2018, doi: 10.1016/j.jvs.2018.02.053.
- [82] K. Lockman, J. S. Hinson, M. D. Medlin, D. Morris, J. M. Taylor, und C. P. Mack, „Sphingosine 1-Phosphate Stimulates Smooth Muscle Cell Differentiation and Proliferation by Activating Separate Serum Response Factor Co-factors“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 279, Nr. 41, S. 42422–42430, Okt. 2004, doi: 10.1074/jbc.M405432200.
- [83] G. Zhang *u. a.*, „Critical role of sphingosine-1-phosphate receptor 2 (S1PR2) in acute vascular inflammation“, *Blood*, Bd. 122, Nr. 3, S. 443–455, Juli 2013, doi: 10.1182/blood-2012-11-467191.
- [84] Q. Yan, „Sphingosine 1-phosphate and its regulatory role in vascular endothelial cells“, *Histol. Histopathol.*, Bd. 37, Nr. 03, S. 213–226, März 2022, doi: 10.14670/HH-18-428.
- [85] M. Wang, H. Hao, N. J. Leeper, und L. Zhu, „Thrombotic Regulation From the Endothelial Cell Perspectives“, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, Bd. 38, Nr. 6, Juni 2018, doi: 10.1161/ATVBAHA.118.310367.
- [86] A. Skoura *u. a.*, „Sphingosine-1-Phosphate Receptor-2 Function in Myeloid Cells Regulates Vascular Inflammation and Atherosclerosis“, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, Bd. 31, Nr. 1, S. 81–85, Jan. 2011, doi: 10.1161/ATVBAHA.110.213496.
- [87] T. Shimizu *u. a.*, „Sphingosine 1-Phosphate Receptor 2 Negatively Regulates Neointimal Formation in Mouse Arteries“, *Circ. Res.*, Bd. 101, Nr. 10, S. 995–1000, Nov. 2007, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.159228.
- [88] Y. Ryu *u. a.*, „Sphingosine-1-Phosphate, a Platelet-Derived Lysophospholipid Mediator, Negatively Regulates Cellular Rac Activity and Cell Migration in Vascular Smooth Muscle Cells“, *Circ. Res.*, Bd. 90, Nr. 3, S. 325–332, Feb. 2002, doi: 10.1161/hh0302.104455.
- [89] B. R. Wamhoff, K. R. Lynch, T. L. Macdonald, und G. K. Owens, „Sphingosine-1-Phosphate Receptor Subtypes Differentially Regulate Smooth Muscle Cell Phenotype“,

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., Bd. 28, Nr. 8, S. 1454–1461, Aug. 2008, doi: 10.1161/ATVBAHA.107.159392.

[90] A. D. Grabski, T. Shimizu, J. Deou, W. M. Mahoney, M. A. Reidy, und G. Daum, „Sphingosine-1-Phosphate Receptor-2 Regulates Expression of Smooth Muscle Alpha-Actin After Arterial Injury“, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, Bd. 29, Nr. 10, S. 1644–1650, Okt. 2009, doi: 10.1161/ATVBAHA.109.191965.

[91] M.-J. Lee *u. a.*, „Vascular Endothelial Cell Adherens Junction Assembly and Morphogenesis Induced by Sphingosine-1-Phosphate“, *Cell*, Bd. 99, Nr. 3, S. 301–312, Okt. 1999, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81661-X.

[92] C. Nussbaum *u. a.*, „Sphingosine-1-phosphate receptor 3 promotes leukocyte rolling by mobilizing endothelial P-selectin“, *Nat. Commun.*, Bd. 6, Nr. 1, S. 6416, Apr. 2015, doi: 10.1038/ncomms7416.

[93] P. A. Singleton, L. Moreno-Vinasco, S. Sammani, S. L. Wanderling, J. Moss, und J. G. N. Garcia, „Attenuation of Vascular Permeability by Methylnaltrexone: Role of mOP-R and S1P3 Transactivation“, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, Bd. 37, Nr. 2, S. 222–231, Aug. 2007, doi: 10.1165/rcmb.2006-0327OC.

[94] P. Keul *u. a.*, „Sphingosine-1-Phosphate Receptor 3 Promotes Recruitment of Monocyte/Macrophages in Inflammation and Atherosclerosis“, *Circ. Res.*, Bd. 108, Nr. 3, S. 314–323, Feb. 2011, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.235028.

[95] Y. Takuwa, Y. Okamoto, K. Yoshioka, und N. Takuwa, „Sphingosine-1-phosphate signaling and biological activities in the cardiovascular system“, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids*, Bd. 1781, Nr. 9, S. 483–488, Sep. 2008, doi: 10.1016/j.bbali.2008.04.003.

[96] T. Shimizu *u. a.*, „Sphingosine-1-Phosphate Receptor 3 Promotes Neointimal Hyperplasia in Mouse Iliac-Femoral Arteries“, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, Bd. 32, Nr. 4, S. 955–961, Apr. 2012, doi: 10.1161/ATVBAHA.111.241034.

[97] T. Inoue, K. Croce, T. Morooka, M. Sakuma, K. Node, und D. I. Simon, „Vascular Inflammation and Repair“, *JACC Cardiovasc. Interv.*, Bd. 4, Nr. 10, S. 1057–1066, Okt. 2011, doi: 10.1016/j.jcin.2011.05.025.

[98] M. Kono *u. a.*, „The Sphingosine-1-phosphate Receptors S1P1, S1P2, and S1P3 Function Coordinately during Embryonic Angiogenesis“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 279, Nr. 28, S. 29367–29373, Juli 2004, doi: 10.1074/jbc.M403937200.

- [99] A. M. Gressner und T. Arndt, Hrsg., *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. in Springer Reference Medizin. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2019. doi: 10.1007/978-3-662-48986-4.
- [100] D. R. Hathaway, K. L. March, J. A. Lash, L. P. Adam, und R. L. Wilensky, „Vascular smooth muscle. A review of the molecular basis of contractility.“, *Circulation*, Bd. 83, Nr. 2, S. 382–390, Feb. 1991, doi: 10.1161/01.CIR.83.2.382.
- [101] D. M. Milewicz u. a., „Altered Smooth Muscle Cell Force Generation as a Driver of Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections“, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, Bd. 37, Nr. 1, S. 26–34, Jan. 2017, doi: 10.1161/ATVBAHA.116.303229.
- [102] G. K. Owens, M. S. Kumar, und B. R. Wamhoff, „Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease“, *Physiol. Rev.*, Bd. 84, Nr. 3, S. 767–801, Juli 2004, doi: 10.1152/physrev.00041.2003.
- [103] G. Leinenkugel u. a., „Sca-1 is a marker for cell plasticity in murine pancreatic epithelial cells and induced by IFN- β in vitro“, *Pancreatology*, Bd. 22, Nr. 2, S. 294–303, März 2022, doi: 10.1016/j.pan.2022.01.006.
- [104] A. Sinclair und E. Dzierzak, „Cloning of the complete Ly-6E.1 gene and identification of DNase I hypersensitive sites corresponding to expression in hematopoietic cells“, *Blood*, Bd. 82, Nr. 10, S. 3052–3062, Nov. 1993, doi: 10.1182/blood.V82.10.3052.3052.
- [105] D. A. Chistiakov, M. C. Killingsworth, V. A. Myasoedova, A. N. Orekhov, und Y. V. Bobryshev, „CD68/macrosialin: not just a histochemical marker“, *Lab. Invest.*, Bd. 97, Nr. 1, S. 4–13, Jan. 2017, doi: 10.1038/labinvest.2016.116.
- [106] S. S. Rabinowitz und S. Gordon, „Macrosialin, a macrophage-restricted membrane sialoprotein differentially glycosylated in response to inflammatory stimuli.“, *J. Exp. Med.*, Bd. 174, Nr. 4, S. 827–836, Okt. 1991, doi: 10.1084/jem.174.4.827.
- [107] A. Mantovani, M. Muzio, P. Ghezzi, C. Colotta, und M. Introna, „Regulation of Inhibitory Pathways of the Interleukin-1 System“, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, Bd. 840, Nr. 1, S. 338–351, Mai 1998, doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb09573.x.
- [108] N. A. Thornberry u. a., „A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes“, Bd. 356, 1992.

- [109] G. Lopez-Castejon und D. Brough, „Understanding the mechanism of IL-1 β secretion“, *Cytokine Growth Factor Rev.*, Bd. 22, Nr. 4, S. 189–195, Aug. 2011, doi: 10.1016/j.cytogfr.2011.10.001.
- [110] M. Saraiva, P. Vieira, und A. O’Garra, „Biology and therapeutic potential of interleukin-10“, *J. Exp. Med.*, Bd. 217, Nr. 1, S. e20190418, Jan. 2020, doi: 10.1084/jem.20190418.
- [111] D. M. Mosser und X. Zhang, „Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine“, *Immunol. Rev.*, Bd. 226, Nr. 1, S. 205–218, Dez. 2008, doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00706.x.
- [112] G. Grütz, „New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression“, *J. Leukoc. Biol.*, Bd. 77, Nr. 1, S. 3–15, Nov. 2004, doi: 10.1189/jlb.0904484.
- [113] N. Tamassia *u. a.*, „Uncovering an IL-10-dependent NF- κ B recruitment to the IL-1 α promoter that is impaired in STAT3 functionally defective patients“, *FASEB J.*, Bd. 24, Nr. 5, S. 1365–1375, Mai 2010, doi: 10.1096/fj.09-145573.
- [114] R. Dewaalmaefyt, M. Roncarolo, H. Spits, und J. Devries, „Interleukin-10“, *Curr. Opin. Immunol.*, Bd. 4, Nr. 3, S. 314–320, Juni 1992, doi: 10.1016/0952-7915(92)90082-P.
- [115] M. Xu, Y. Wang, R. Xia, Y. Wei, und X. Wei, „Role of the CCL2-CCR2 signalling axis in cancer: Mechanisms and therapeutic targeting“, *Cell Prolif.*, Bd. 54, Nr. 10, Okt. 2021, doi: 10.1111/cpr.13115.
- [116] H. Zhang *u. a.*, „Role of the CCL2-CCR2 axis in cardiovascular disease: Pathogenesis and clinical implications“, *Front. Immunol.*, Bd. 13, S. 975367, Aug. 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.975367.
- [117] S. L. Deshmane, S. Kremlev, S. Amini, und B. E. Sawaya, „Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview“, *J. Interferon Cytokine Res.*, Bd. 29, Nr. 6, S. 313–326, Juni 2009, doi: 10.1089/jir.2008.0027.
- [118] V. Bianconi, A. Sahebkar, S. L. Atkin, und M. Pirro, „The regulation and importance of monocyte chemoattractant protein-1“:“, *Curr. Opin. Hematol.*, Bd. 25, Nr. 1, S. 44–51, Jan. 2018, doi: 10.1097/MOH.0000000000000389.
- [119] J. Wischhusen, I. Melero, und W. H. Fridman, „Growth/Differentiation Factor-15 (GDF-15): From Biomarker to Novel Targetable Immune Checkpoint“, *Front. Immunol.*, Bd. 11, S. 951, Mai 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.00951.

- [120] E. C. Hsiao, L. G. Koniaris, T. Zimmers-Koniaris, S. M. Sebald, T. V. Huynh, und S.-J. Lee, „Characterization of Growth-Differentiation Factor 15, a Transforming Growth Factor Superfamily Member Induced following Liver Injury“, *MOL CELL BIOL*, Bd. 20, 2000.
- [121] J. Wang, L. Wei, X. Yang, und J. Zhong, „Roles of Growth Differentiation Factor 15 in Atherosclerosis and Coronary Artery Disease“, *J. Am. Heart Assoc.*, Bd. 8, Nr. 17, S. e012826, Sep. 2019, doi: 10.1161/JAHA.119.012826.
- [122] P. Arora, T. K. Ricks, und J. Trejo, „Protease-activated receptor signalling, endocytic sorting and dysregulation in cancer“, *J. Cell Sci.*, Bd. 120, Nr. 6, S. 921–928, März 2007, doi: 10.1242/jcs.03409.
- [123] A. Fender, B. Rauch, T. Geisler, und K. Schrör, „Protease-Activated Receptor PAR-4: An Inducible Switch between Thrombosis and Vascular Inflammation?“, *Thromb. Haemost.*, Bd. 117, Nr. 11, S. 2013–2025, 2017, doi: 10.1160/TH17-03-0219.
- [124] G. M. Tennant, R. M. Wadsworth, und S. Kennedy, „PAR-2 mediates increased inflammatory cell adhesion and neointima formation following vascular injury in the mouse“, *Atherosclerosis*, Bd. 198, Nr. 1, S. 57–64, Mai 2008, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2007.09.043.
- [125] N. Vergnolle, „Proteinase-activated receptor-2-activating peptides induce leukocyte rolling, adhesion, and extravasation in vivo“, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, Bd. 163, Nr. 9, S. 5064–5069, Nov. 1999.
- [126] M. Nakanishi-Matsui, Y.-W. Zheng, D. J. Sulciner, E. J. Weiss, M. J. Ludeman, und S. R. Coughlin, „PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin“, *Nature*, Bd. 404, Nr. 6778, S. 609–613, Apr. 2000, doi: 10.1038/35007085.
- [127] S. Mahajan-Thakur *u. a.*, „Sphingosine-1-phosphate induces thrombin receptor PAR-4 expression to enhance cell migration and COX-2 formation in human monocytes“, *J. Leukoc. Biol.*, Bd. 96, Nr. 4, S. 611–618, Juli 2014, doi: 10.1189/jlb.3AB1013-567R.
- [128] K. A. Papavassiliou und A. G. Papavassiliou, „Transcription Factor Drug Targets: TARGETING TRANSCRIPTION FACTORS“, *J. Cell. Biochem.*, Bd. 117, Nr. 12, S. 2693–2696, Dez. 2016, doi: 10.1002/jcb.25605.
- [129] G. Canettieri *u. a.*, „The coactivator CRTC1 promotes cell proliferation and transformation via AP-1“, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Bd. 106, Nr. 5, S. 1445–1450, Feb. 2009, doi: 10.1073/pnas.0808749106.

- [130] K. Morhenn *u. a.*, „Mechanistic role of the CREB-regulated transcription coactivator 1 in cardiac hypertrophy“, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, Bd. 127, S. 31–43, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.yjmcc.2018.12.001.
- [131] K. A. Kovács *u. a.*, „TORC1 is a calcium- and cAMP-sensitive coincidence detector involved in hippocampal long-term synaptic plasticity“, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Bd. 104, Nr. 11, S. 4700–4705, März 2007, doi: 10.1073/pnas.0607524104.
- [132] M. D. Conkright *u. a.*, „TORCs: Transducers of Regulated CREB Activity“, *Mol. Cell.*
- [133] A. L. Grundler, „Kardialer und kardiomyozytärer Stoffwechsel in CRT1-defizienten Mäusen“, Fachbereich Chemie der Universität Hamburg, 2021.
- [134] V. Gorenoi, C.-M. Dintsios, und A. Hagen, „Senkung der Restenoserate durch Einsatz beschichteter Stents bei koronarer Herzkrankheit“. Deutsche Agentur für Health Technology Assessment des Deutschen Instituts für Medizinische Dokumentation und Information.
- [135] H. Ullrich, M. Olschewski, T. Münzel, und T. Gori, „Coronary In-Stent Restenosis: Predictors and Treatment“, *Dtsch. Ärztebl. Int.*, Sep. 2021, doi: 10.3238/arztebl.m2021.0254.
- [136] J. Kersting, L. Kamper, M. Das, und P. Haage, „Guideline-Oriented Therapy of Lower Extremity Peripheral Artery Disease (PAD) – Current Data and Perspectives“, *RöFo - Fortschritte Auf Dem Geb. Röntgenstrahlen Bildgeb. Verfahr.*, Bd. 191, Nr. 04, S. 311–322, Apr. 2019, doi: 10.1055/a-0690-9365.
- [137] T. G. Mastenbroek *u. a.*, „Vascular protective effect of aspirin and rivaroxaban upon endothelial denudation of the mouse carotid artery“, *Sci. Rep.*, Bd. 10, Nr. 1, S. 19360, Nov. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-76377-8.
- [138] Y. Yin, X. Zhao, Y. Fang, und L. Huang, „Carotid Artery Wire Injury Mouse Model with a Nonmicrosurgical Procedure“, *Vascular*, Bd. 18, Nr. 4, S. 221–226, Aug. 2010, doi: 10.2310/6670.2010.00031.
- [139] A. S. Shirali, A. I. McDonald, J. J. Mack, und M. L. Iruela-Arispe, „Reproducible Arterial Denudation Injury by Infrarenal Abdominal Aortic Clamping in a Murine Model“, *J. Vis. Exp.*, Nr. 117, S. 54755, Nov. 2016, doi: 10.3791/54755.
- [140] Y. Jiang, „Clamping of the infrarenal aorta results in intimal hyperplasia and distinct changes of S1P receptor expression in the intima-media and adventitia“, Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

- [141] C. Weigel, J. Bellaci, und S. Spiegel, „Sphingosine-1-phosphate and its receptors in vascular endothelial and lymphatic barrier function“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 299, Nr. 6, S. 104775, Juni 2023, doi: 10.1016/j.jbc.2023.104775.
- [142] C. Indolfi *u. a.*, „Activation of cAMP–PKA signaling in vivo inhibits smooth muscle cell proliferation induced by vascular injury“, *Nat. Med.*, Bd. 3, Nr. 7, S. 775–779, Juli 1997, doi: 10.1038/nm0797-775.
- [143] H. Chen *u. a.*, „Sphingosine 1-phosphate receptor, a new therapeutic direction in different diseases“, *Biomed. Pharmacother.*, Bd. 153, S. 113341, Sep. 2022, doi: 10.1016/j.biopha.2022.113341.
- [144] T. Asakura und T. Karino, „Flow patterns and spatial distribution of atherosclerotic lesions in human coronary arteries.“, *Circ. Res.*, Bd. 66, Nr. 4, S. 1045–1066, Apr. 1990, doi: 10.1161/01.RES.66.4.1045.
- [145] H. Tseng, T. E. Peterson, und B. C. Berk, „Fluid Shear Stress Stimulates Mitogen-Activated Protein Kinase in Endothelial Cells“, *Circ. Res.*, Bd. 77, Nr. 5, S. 869–878, Nov. 1995, doi: 10.1161/01.RES.77.5.869.
- [146] L. Aslanidou, „A 1D model of the arterial circulation in mice“, *ALTEX*, S. 13–28, 2016, doi: 10.14573/altex.1507071.
- [147] J. Ouyang, Z. Shu, S. Chen, H. Xiang, und H. Lu, „The role of sphingosine 1-phosphate and its receptors in cardiovascular diseases“, *J. Cell. Mol. Med.*, Bd. 24, Nr. 18, S. 10290–10301, Sep. 2020, doi: 10.1111/jcmm.15744.
- [148] H. Naito, T. Iba, und N. Takakura, „Mechanisms of new blood-vessel formation and proliferative heterogeneity of endothelial cells“, *Int. Immunol.*, Bd. 32, Nr. 5, S. 295–305, Mai 2020, doi: 10.1093/intimm/dxaa008.
- [149] R. Siow, „Migration of adventitial myofibroblasts following vascular balloon injury: insights from in vivo gene transfer to rat carotid arteries“, *Cardiovasc. Res.*, Bd. 59, Nr. 1, S. 212–221, Juli 2003, doi: 10.1016/S0008-6363(03)00292-X.
- [150] N. Sugimoto, N. Takuwa, H. Okamoto, S. Sakurada, und Y. Takuwa, „Inhibitory and Stimulatory Regulation of Rac and Cell Motility by the G_{12/13}-Rho and G_i Pathways Integrated Downstream of a Single G Protein-Coupled Sphingosine-1-Phosphate Receptor Isoform“, *Mol. Cell. Biol.*, Bd. 23, Nr. 5, S. 1534–1545, März 2003, doi: 10.1128/MCB.23.5.1534-1545.2003.

- [151] J. Michaud, D.-S. Im, und T. Hla, „Inhibitory Role of Sphingosine 1-Phosphate Receptor 2 in Macrophage Recruitment during Inflammation“, *J. Immunol.*, Bd. 184, Nr. 3, S. 1475–1483, Feb. 2010, doi: 10.4049/jimmunol.0901586.
- [152] S. K. Goparaju u. a., „The S1P₂ Receptor Negatively Regulates Platelet-Derived Growth Factor-Induced Motility and Proliferation“, *Mol. Cell. Biol.*, Bd. 25, Nr. 10, S. 4237–4249, Mai 2005, doi: 10.1128/MCB.25.10.4237-4249.2005.
- [153] S. E. Alvarez, S. Milstien, und S. Spiegel, „Autocrine and paracrine roles of sphingosine-1-phosphate“, *Trends Endocrinol. Metab.*, Bd. 18, Nr. 8, S. 300–307, Okt. 2007, doi: 10.1016/j.tem.2007.07.005.
- [154] M. ter Braak u. a., „Gαq-mediated plasma membrane translocation of sphingosine kinase-1 and cross-activation of S1P receptors“, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids*, Bd. 1791, Nr. 5, S. 357–370, Mai 2009, doi: 10.1016/j.bbalip.2009.01.019.
- [155] X.-L. Chen u. a., „Sphingosine kinase-1 mediates TNF-α-induced MCP-1 gene expression in endothelial cells: upregulation by oscillatory flow“, *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.*, Bd. 287, Nr. 4, S. H1452–H1458, Okt. 2004, doi: 10.1152/ajpheart.01101.2003.
- [156] P. Xia u. a., „An oncogenic role of sphingosine kinase“, *Curr. Biol.*, Bd. 10, Nr. 23, S. 1527–1530, Nov. 2000, doi: 10.1016/S0960-9822(00)00834-4.
- [157] T. A. Taha u. a., „Down-regulation of Sphingosine Kinase-1 by DNA Damage“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 279, Nr. 19, S. 20546–20554, Mai 2004, doi: 10.1074/jbc.M401259200.
- [158] A. Olivera u. a., „Sphingosine Kinase Expression Increases Intracellular Sphingosine-1-Phosphate and Promotes Cell Growth and Survival“, *J. Cell Biol.*, Bd. 147, Nr. 3, S. 545–558, Nov. 1999, doi: 10.1083/jcb.147.3.545.
- [159] K. R. Stenmark u. a., „The Adventitia: Essential Regulator of Vascular Wall Structure and Function“, *Annu. Rev. Physiol.*, Bd. 75, Nr. 1, S. 23–47, Feb. 2013, doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183802.
- [160] K. Walsh, R. C. Smith, und H.-S. Kim, „Vascular Cell Apoptosis in Remodeling, Restenosis, and Plaque Rupture“, *Circ. Res.*, Bd. 87, Nr. 3, S. 184–188, Aug. 2000, doi: 10.1161/01.RES.87.3.184.
- [161] I. Kokkinopoulos u. a., „Adventitial SCA-1 + Progenitor Cell Gene Sequencing Reveals the Mechanisms of Cell Migration in Response to Hyperlipidemia“, *Stem Cell Rep.*, Bd. 9, Nr. 2, S. 681–696, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.stemcr.2017.06.011.

- [162] G. Luna, J. Paez, und D. J. E. Cardier, „Expression of the Hematopoietic Stem Cell Antigen Sca-1 (LY-6A/E) in Liver Sinusoidal Endothelial Cells: Possible Function of Sca-1 in Endothelial Cells“.
- [163] Y. Chen *u. a.*, „Adventitial Stem Cells in Vein Grafts Display Multilineage Potential That Contributes to Neointimal Formation“, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, Bd. 33, Nr. 8, S. 1844–1851, Aug. 2013, doi: 10.1161/ATVBAHA.113.300902.
- [164] J. N. Wilcox und N. A. Scott, „Potential role of the adventitia in arteritis and atherosclerosis“, *Int. J. Cardiol.*, Bd. 54, S. S21–S35, Aug. 1996, doi: 10.1016/S0167-5273(96)02811-2.
- [165] M. Puhlmann, D. M. Weinreich, J. M. Farma, N. M. Carroll, E. M. Turner, und H. R. Alexander, „Interleukin-1 β induced vascular permeability is dependent on induction of endothelial Tissue Factor (TF) activity“, *J. Transl. Med.*, Bd. 3, Nr. 1, S. 37, Dez. 2005, doi: 10.1186/1479-5876-3-37.
- [166] J. Chamberlain *u. a.*, „Interleukin-1 β and Signaling of Interleukin-1 in Vascular Wall and Circulating Cells Modulates the Extent of Neointima Formation in Mice“, *Am. J. Pathol.*, Bd. 168, Nr. 4, S. 1396–1403, Apr. 2006, doi: 10.2353/ajpath.2006.051054.
- [167] M. Bujak und N. G. Frangogiannis, „The role of IL-1 in the pathogenesis of heart disease“, *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, Bd. 57, Nr. 3, S. 165–176, Juni 2009, doi: 10.1007/s00005-009-0024-y.
- [168] G. Daum *u. a.*, „Determinants of Serum- and Plasma Sphingosine-1-Phosphate Concentrations in a Healthy Study Group“, *TH Open*, Bd. 04, Nr. 01, S. e12–e19, Jan. 2020, doi: 10.1055/s-0040-1701205.
- [169] R. de Waal Malefyt, J. Abrams, B. Bennett, C. G. Figdor, und J. E. de Vries, „Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes.“, *J. Exp. Med.*, Bd. 174, Nr. 5, S. 1209–1220, Nov. 1991, doi: 10.1084/jem.174.5.1209.
- [170] L. J. Feldman *u. a.*, „Interleukin-10 Inhibits Intimal Hyperplasia After Angioplasty or Stent Implantation in Hypercholesterolemic Rabbits“, *Circulation*, Bd. 101, Nr. 8, S. 908–916, Feb. 2000, doi: 10.1161/01.CIR.101.8.908.

- [171] M. Mazighi *u. a.*, „IL-10 inhibits vascular smooth muscle cell activation in vitro and in vivo“, *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.*, Bd. 287, Nr. 2, S. H866–H871, Aug. 2004, doi: 10.1152/ajpheart.00918.2003.
- [172] L. Gu, *Monocyte chemoattractant protein-1*. Chem Immunol., 1999. [Online]. Verfügbar unter: <https://books.google.de/books?id=2otANXpoUaEC&lpg=PA7&ots=SQZ52qbKZ8&dq=%20Gu%20L%2C%20Tseng%20SC%2C%20Rollins%20BJ.%20Monocyte%20chemoattractant%20protein-1.%20Chem%20Immunol.%201999%3B72%3A%207%E2%80%93329.&lr&pg=PA7#v=onepage&q&f=false>
- [173] Y. Furukawa *u. a.*, „Anti-Monocyte Chemoattractant Protein-1/Monocyte Chemotactic and Activating Factor Antibody Inhibits Neointimal Hyperplasia in Injured Rat Carotid Arteries“, *Circ. Res.*, Bd. 84, Nr. 3, S. 306–314, Feb. 1999, doi: 10.1161/01.RES.84.3.306.
- [174] R. J. Aiello *u. a.*, „Monocyte Chemoattractant Protein-1 Accelerates Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice“, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, Bd. 19, Nr. 6, S. 1518–1525, Juni 1999, doi: 10.1161/01.ATV.19.6.1518.
- [175] M. Seitz, P. Loetscher, B. Dewald, H. Towbin, H. Gallati, und M. Baggiolini, „Interleukin-10 differentially regulates cytokine inhibitor and chemokine release from blood mononuclear cells and fibroblasts“, *Eur. J. Immunol.*, Bd. 25, Nr. 4, S. 1129–1132, Apr. 1995, doi: 10.1002/eji.1830250443.
- [176] V. W. W. Tsai, Y. Husaini, A. Sainsbury, D. A. Brown, und S. N. Breit, „The MIC-1/GDF15-GFRAL Pathway in Energy Homeostasis: Implications for Obesity, Cachexia, and Other Associated Diseases“, *Cell Metab.*, Bd. 28, Nr. 3, S. 353–368, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.cmet.2018.07.018.
- [177] G. A. Bonaterra *u. a.*, „Growth Differentiation Factor-15 Deficiency Inhibits Atherosclerosis Progression by Regulating Interleukin-6–Dependent Inflammatory Response to Vascular Injury“, *J. Am. Heart Assoc.*, Bd. 1, Nr. 6, S. e002550, Nov. 2012, doi: 10.1161/JAHA.112.002550.

- [178] L. Rochette, M. Zeller, Y. Cottin, und C. Vergely, „Insights Into Mechanisms of GDF15 and Receptor GFRAL: Therapeutic Targets“, *Trends Endocrinol. Metab.*, Bd. 31, Nr. 12, S. 939–951, Dez. 2020, doi: 10.1016/j.tem.2020.10.004.
- [179] S. C. A. de Jager *u. a.*, „Growth differentiation factor 15 deficiency protects against atherosclerosis by attenuating CCR2-mediated macrophage chemotaxis“, *J. Exp. Med.*, Bd. 208, Nr. 2, S. 217–225, Feb. 2011, doi: 10.1084/jem.20100370.
- [180] A. Schwarz, R. Kinscherf, und G. A. Bonaterra, „Role of the Stress- and Inflammation-Induced Cytokine GDF-15 in Cardiovascular Diseases: From Basic Research to Clinical Relevance“, *Rev. Cardiovasc. Med.*, Bd. 24, Nr. 3, S. 81, März 2023, doi: 10.31083/j.rcm2403081.
- [181] D. Baykal, J. F. Schmedtje, und M. S. Runge, „Role of the thrombin receptor in restenosis and atherosclerosis“, *Am. J. Cardiol.*, Bd. 75, Nr. 6, S. 82B-87B, Feb. 1995, doi: 10.1016/0002-9149(95)80019-O.
- [182] K. Marutsuka, K. Hatakeyama, Y. Sato, A. Yamashita, A. Sumiyoshi, und Y. Asada, „Protease-activated receptor 2 (PAR2) mediates vascular smooth muscle cell migration induced by tissue factor/factor VIIa complex“, *Thromb. Res.*, Bd. 107, Nr. 5, S. 271–276, Sep. 2002, doi: 10.1016/S0049-3848(02)00345-6.
- [183] K. Jobi *u. a.*, „Redox regulation of human protease-activated receptor-2 by activated factor X“, *Free Radic. Biol. Med.*, Bd. 51, Nr. 9, S. 1758–1764, Nov. 2011, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.08.003.
- [184] F. A. Mathieson und G. F. Nixon, „Sphingolipids differentially regulate mitogen-activated protein kinases and intracellular Ca²⁺ in vascular smooth muscle: effects on CREB activation“, Bd. 147.
- [185] T. Tokunou *u. a.*, „Apoptosis Induced by Inhibition of Cyclic AMP Response Element–Binding Protein in Vascular Smooth Muscle Cells“, *Circulation*, Bd. 108, Nr. 10, S. 1246–1252, Sep. 2003, doi: 10.1161/01.CIR.0000085164.13439.89.
- [186] D. J. Klemm *u. a.*, „cAMP Response Element-binding Protein Content Is a Molecular Determinant of Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 276, Nr. 49, S. 46132–46141, Dez. 2001, doi: 10.1074/jbc.M104769200.
- [187] Smith, Newby, und Bond, „Ending Restenosis: Inhibition of Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation by cAMP“, *Cells*, Bd. 8, Nr. 11, S. 1447, Nov. 2019, doi: 10.3390/cells8111447.

- [188] C. Tolksdorf *u. a.*, „Platelet-Derived S1P and Its Relevance for the Communication with Immune Cells in Multiple Human Diseases“, *Int. J. Mol. Sci.*, Bd. 23, Nr. 18, S. 10278, Sep. 2022, doi: 10.3390/ijms231810278.
- [189] G. Greiwe *u. a.*, „Dynamics of Vascular Protective and Immune Supportive Sphingosine-1-Phosphate During Cardiac Surgery“, *Front. Immunol.*, Bd. 12, S. 761475, Okt. 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.761475.
- [190] Y. Yatomi *u. a.*, „Sphingosine 1-phosphate as a major bioactive lysophospholipid that is released from platelets and interacts with endothelial cells“, *Blood*, Bd. 96, Nr. 10, S. 3431–3438, Nov. 2000, doi: 10.1182/blood.V96.10.3431.
- [191] N. Kobayashi *u. a.*, „Sphingosine 1-phosphate is released from the cytosol of rat platelets in a carrier-mediated manner“, *J. Lipid Res.*, Bd. 47, Nr. 3, S. 614–621, März 2006, doi: 10.1194/jlr.M500468-JLR200.
- [192] C. Mewis und B. M. Balletshofer, Hrsg., *Kardiologie compact: alles für Station und Facharztprüfung ; 189 Tabellen, 2.*, Unveränd. Aufl. Stuttgart: Thieme, 2006.
- [193] A. Böhm *u. a.*, „Factor-Xa-induced mitogenesis and migration require sphingosine kinase activity and S1P formation in human vascular smooth muscle cells“, *Cardiovasc. Res.*, Bd. 99, Nr. 3, S. 505–513, Aug. 2013, doi: 10.1093/cvr/cvt112.
- [194] X. Wu *u. a.*, „Inverse Correlation Between Plasma Sphingosine-1-Phosphate and Ceramide Concentrations in Septic Patients and Their Utility in Predicting Mortality“, *Shock*, Bd. 51, Nr. 6, S. 718–724, Juni 2019, doi: 10.1097/SHK.0000000000001229.
- [195] T. Ulrych *u. a.*, „Release of sphingosine-1-phosphate from human platelets is dependent on thromboxane formation“, *J. Thromb. Haemost.*, Bd. 9, Nr. 4, S. 790–798, Apr. 2011, doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04194.x.
- [196] S. Selim *u. a.*, „Plasma levels of sphingosine 1-phosphate are strongly correlated with haematocrit, but variably restored by red blood cell transfusions“, *Clin. Sci.*, Bd. 121, Nr. 12, S. 565–572, Dez. 2011, doi: 10.1042/CS20110236.
- [197] R. Zhang *u. a.*, „Serum Levels of IL-1 β , IL-6, TGF- β , and MMP-9 in Patients Undergoing Carotid Artery Stenting and Regulation of MMP-9 in a New *In Vitro* Model of THP-1 Cells Activated by Stenting“, *Mediators Inflamm.*, Bd. 2015, S. 1–12, 2015, doi: 10.1155/2015/956082.

- [198] A. Weigert, C. Olesch, und B. Brüne, „Sphingosine-1-Phosphate and Macrophage Biology—How the Sphinx Tames the Big Eater“, *Front. Immunol.*, Bd. 10, S. 1706, Juli 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.01706.
- [199] G. Sardella *u. a.*, „Early elevation of interleukin-1 β and interleukin-6 levels after bare or drug-eluting stent implantation in patients with stable angina“, *Thromb. Res.*, Bd. 117, Nr. 6, S. 659–664, Jan. 2006, doi: 10.1016/j.thromres.2005.06.002.
- [200] H. Loppnow *u. a.*, „Platelet-Derived Interleukin-1 Induces Cytokine Production, but not Proliferation of Human Vascular Smooth Muscle Cells“, *Blood*, Bd. 91, Nr. 1, S. 134–141, Jan. 1998, doi: 10.1182/blood.V91.1.134.
- [201] T. Machida *u. a.*, „Sphingosine 1-Phosphate Inhibits Nitric Oxide Production Induced by Interleukin-1 β in Rat Vascular Smooth Muscle Cells“, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Bd. 325, Nr. 1, S. 200–209, Apr. 2008, doi: 10.1124/jpet.107.127290.
- [202] M. Zhong *u. a.*, „Inhibition of Sphingosine Kinase 1 Attenuates Sepsis-induced Microvascular Leakage *via* Inhibiting Macrophage NLRP3 Inflammasome Activation in Mice“, *Anesthesiology*, Bd. 132, Nr. 6, S. 1503–1515, Juni 2020, doi: 10.1097/ALN.0000000000003192.
- [203] N. Kelley, D. Jeltama, Y. Duan, und Y. He, „The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation“, *Int. J. Mol. Sci.*, Bd. 20, Nr. 13, S. 3328, Juli 2019, doi: 10.3390/ijms20133328.
- [204] Y. Wang *u. a.*, „Inhibition of sphingosine-1-phosphate receptor 3 suppresses ATP-induced NLRP3 inflammasome activation in macrophages *via* TWIK2-mediated potassium efflux“, *Front. Immunol.*, Bd. 14, S. 1090202, Jan. 2023, doi: 10.3389/fimmu.2023.1090202.

9 Anhang

9.1 Material

9.1.1 Lösungen und Substanzen

Name	Hersteller
Sigmacote®	Sigma-Aldrich Co. LLC
Acetoniril LC-MS	Honeywell International Inc
Methanol LC-MS	Honeywell International Inc
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich Co. LLC
Buprevent® Buprenorphin 0,3mg/ml	Bayer Vital GmbH
Novaminsuflon-ratiopharm 500mg/ml Tropfen	ratiopharm GmbH
Vidisc Augengel	Dr. Mann Pharma GmbH
Ringer-Infusionslösung B.Braun	B. Braun Melsungen AG
Narcoren® Pentobaribital-Natrium 16g/100ml	Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH
Rimadyl® Carporfen 50g/20ml	Pfizer GmbH
Baxter Isoflurane 250ml	Baxter Deutschland GmbH
Betaisodona 0.1g/ml	ACA Müller/ADAG Pharma AG
Formafix 4% gepuffert	Grimm med. Logistik GmbH
RNAlater™ Lösung	Thermo Fischer Scientific
80% Ethanol	Walter CMP
Enzym Mix	
Hank's balanced salt solution 500ml	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Soybean trypsin inhibitor 100mg	Worthington Biochemical Co.
Elastase type III	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Collagenase 10ku	Worthington Biochemical Co.
Gibco 2-Mercaptoethanol	Thermo Fischer Scientific
Isopropanol (70, 80, 85, 90, 96, 100%)	Th. Geyer GmbH & Co. KG
Tissue-Tek® Paraffinwachs TEK III	Sakura Finetek Germany GmbH
Ethanol (70%, 96%, 99%)	Walter CMP
Xylol z.A.	Th. Geyer GmbH & Co. KG

Anhang

Resorcin-Fuchsin-Lösung nach Weigert 1%	Waldeck GmbH & Co KG
Eisenhämatoxylin A nach Weigert	Waldeck GmbH & Co KG
Eisenhämatoxylin B nach Weigert	Waldeck GmbH & Co KG
Pikrinsäure Lösung 1,2%	AppliChem GmbH
Thiazinrot R	Waldeck GmbH & Co KG
Eukitt® schnellhärtendes Eindeckmittel	Sigma-Aldrich Co. LLC.

9.1.2 Primer

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
GAPDH	5'-TCCTGCACCACCAACTGCTT-3'	5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'
S1pr1	5'-ATCATGGGCTGGAAGTGCATCA-3'	5'-CGAGTCCTGACCAAGGAGTAGAT-3'
S1pr2	5'-CAGACGCTAGCCCTGCTCAAGA-3'	5'-TAGTGGGCTTTGTAGAGGA-3'
S1pr3	5'-ACAACCGCATGTACTTTTTTCAT-3'	5'-TACTGCCCTCCCTGAGGAACCA-3'
Myh11	5'-ATGAGGTGGTCGTGGAGTTG-3'	5'-GCCTGAGAAGTATCGCTCCC-3'
Sca1	5'-AGGAGGCAGCAGTTATTGTGG-3'	5'-CGTTGACCTTAGTACCCAGGA-3'
Cd68	5'-ACTTCGGGCCATGTTTCTCT-3'	5'-GGCTGGTAGGTTGATTGTCGT-3'
Sma	5'-CCCAGACATCAGGGAGTAATGG-3'	5'-TCTATCGGATACTTCAGCGTCA-3'
Sphk1	5'-GGTGAATGGGCTAATGGAACG-3'	5'-CTGCTCGTACCCAGCATAGTG-3'
Crtc1	5'-AGACAGACAAGACCCTTTCTAAGCA-3'	5'-CAGGACTTGGGCCTGGAA-3'
Il10	5'-CTTACTGACTGGCATGAGGATCA-3'	5'-GCAGCTCTAGGAGCATGTGG-3'
Ccl2	5'-TAAAAACCTGGATCGGAACCAAA-3'	5'-GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT-3'
Gdf15	5'-CTGGCAATGCCTGAACAACG-3'	5'-GGTCGGGACTTGGTTCTGAG-3'
Il1b	5'-GCAACTGTTCTGAACTCAACT-3'	5'-ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT-3'
Par2	5'-GAAACACCCCGCCGTGATTTA-3'	5'-CTCCCCGTAGACCCAGTTG-3'
Par4	5'-CCAACGACAGTGACACGCT-3'	5'-GCCACCACAAGCCCATAGAG-3'

Anhang

9.1.3 Verbrauchsmaterialien und Kits

9.1.3.1 Kits

Name	Komponenten	Hersteller
RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (50)	RNeasy Mini Spin Columns RLT Puffer Proteinase K RW1 Buffer RPE Buffer RNase-free Water	Qiagen GmbH
Rnase-Free Dnase Set	Rnase-free Dnase I RDD Buffer Rnase-free Water	Qiagen GmbH
Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR	5X Reaction Mix (Reaction buffer, dNTPs, oligo(dT)18, randomized Hexamer-Primer) Maxima Enzyme Mix (Maxima Reverse Transcriptase, RiboLock Rnase Inhibitor) Rnase-free Water	Thermo Fischer Scientific
Rotor Gene® SYBR® Green PCR Kit (400)	2x Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix (HotStarTaq®Plus DNA Polymerase, Rotor-Gene SYBR Green PCR Buffer, SYBR Green I dye, dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP))	Qiagen GmbH

Anhang

9.1.3.2 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Pipettenspitzen 10µl	Sarstedt AG & Co. KG
Pipettenspitzen 200µl	Sarstedt AG & Co. KG
Pipettenspitzen 1000µl	Biozym Scientific GmbH
Reaktionsgefäß 1,5ml	Sarstedt AG & Co. KG
SafeSeal Reaktionsgefäß 2ml	Sarstedt AG & Co. KG
Reaktionsgefäß 0,5ml	Sarstedt AG & Co. KG
Multiply®-µStrip Pro 8er Kette	Sarstedt AG & Co. KG
SuperFrost® Plus Objektträger	R. Langenbrinck GmbH
Automat Star Deckgläser 24x60mm	Engelbrecht GmbH
PCR 0,1 ml 4-Tube & 4-Cap Strips	Biozym Scientific GmbH
Objektträger, geschnitten, Mattrand	Hecht Assistant®
Skalpell präzisa	P.J. Dahlhausen & Co. GmbH
MoliCare Bettunterlagen	Paul Hartmann GmbH
TC-Schale 35, Standard	Sarstedt AG&Co
Vasofix Safety Venenverweilkanüle 20G	B. Braun Melsungen AG
Low Binding Reagiergefäß 1,5ml	Sarstedt AG & Co. KG
TPE Capmat 96	Micronic Holding B.V.
BD PLASTIPAK® sterile Spritze (20ml)	Becton, Dickinson and Company
10-0 Ethicon® Ethilon™ Poliamid6, schwarz monofil chirug. Nahtmaterial	Ethicon LLC
6-0 Ethicon® Prolene™, Polypropylen, blau monofil chirug. Nahtmaterial	Ethicon LLC
7-0 Ethicon® Perma-Hand™ Seide, schwarz geflochten chirug. Nahtmaterial	Ethicon LLC
Sterile Mullkomresse, 10x10cm, 12-fach	Fink&Walter GmbH
Wattestäbchen unsteril	Meditrade GmbH
BD Micro-Fine™ 0,5ml, 0,30mm (30G) x 8mm	Becton, Dickinson and Company
Metallkugeln, Stainless Steel Beads, 7mm	Qiagen

Anhang

9.1.4 Laborgeräte und chirurgische Materialien

9.1.4.1 Laborgeräte

Bezeichnung	Hersteller
Autosampler	Varian, Palo Alto, CA, USA
HPLC	Varian ProStar Model 210
Trennsäule	Zorbax SB-C8 (Agilent; 2,1mm x 50mm x 1,8µm)
Massenspektrometer	Varian L1200 MS/MS
Zentrifuge 5424R	Eppendorf AG
Isis AESCULAP® Rasierer	B. Braun Melsungen AG
Leica Mikroskop S6D	Leica microsystems AG
Harvard Apparatus Isoflurane Key-Fill Vaporiter	Harvard Apparatus
Leica M60 Mikroskope	Leica microsystems AG
Thermolux Wärmeunterlage	Witte+Sutor GmbH
Zentrifuge 5810	Eppendorf AG
Thermomixer comfort	Eppendorf AG
Bio-Rad T100™ Thermal Cycler	Bio-Rad laboratories, Inc.
Rotor-Gene Q real-time PCR cycler	Qiagen GmbH
TissueLyser LT	Qiagen GmbH
Zeiss Axio Scan Z1	Carl Zeiss AG
IKA® Vortex Genius 3	IKA-Werke GmbH & CO. KG
Minizentrifuge	Biozym Scientific GmbH
Eppendorf research Pipette 10-100µL	Eppendorf SE
Eppendorf research Pipette 20-200µL	Eppendorf SE
Eppendorf research Pipette 100-1000µL	Eppendorf SE
Eppendorf research Pipette 1-10µL	Eppendorf SE
Eppendorf research Pipette 0,5-2,5µL	Eppendorf SE
Epoch™ Spektralphotometer	BioTek®
Microtoms	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH
TES 99 Paraffin-Ausgießstation	Medite Medical GmbH
Shandon Citadel 2000 Gewebeeinbettautomat	Thermo Fisher Scientific GmbH

Anhang

9.1.4.2 Chirurgische Materialien

Name	Hersteller
Chirurgische Schere	Fine Science Tools (F.T.S)
Feine Schere (gewinkelt)	Fine Science Tools (F.T.S)
Vanas-Federschere	Fine Science Tools (F.T.S)
Dumont #5 Pinzette	Fine Science Tools (F.T.S)
Round Handle Suture Tying Forceps	Fine Science Tools (F.T.S)
Round Handled Needle Holder	Fine Science Tools (F.T.S)
Schwartz Micro Klemme	Fine Science Tools (F.T.S)
Student Micro-Adson Pinzette	Fine Science Tools (F.T.S)
Magnetic Fixator Retraction System	Fine Science Tools (F.T.S)
Magnetische Platte	Fine Science Tools (F.T.S)
Kleiner Magnetstand	Fine Science Tools (F.T.S)
Großer Magnetstand	Fine Science Tools (F.T.S)
Elastomer	Fine Science Tools (F.T.S)
Blunt Reactors	Fine Science Tools (F.T.S)

9.1.5 Software

Bezeichnung	Hersteller	Anwendung
Varian MS Workstation Software 6.9	Agilent Technologies	Auswertung LC-MS/MS
Rotor-Gene Q Series, Version 2.3.1	Qiagen GmbH	Auswertung qPCR
Gen5™2.0	BioTek®	RNA Konzentration
netScope® Viewer	Net-Base Software GmbH	Histologische Bilder
ImageJ 2.1.0	National Institute of Health, USA	Histologische Auswertung
GraphPad Prism® 8	GraphPad Software	Statistik und Abbildungen
IBM SPSS Statistics 28	IBM Corporation	Statistik
Microsoft Office (Excel, PowerPoint, Word)	Microsoft Corporation	Statistik, Abbildungen und Textverarbeitung
Zotero 6.0.20	Center for History and Media, George Mason University	Literaturverwaltung

Anhang

9.2 Auflistung der verwendeten Gefahrenstoffe nach GHS

Bezeichnung	Gefahrenbezeichnung (H-Sätze)	Vorsichtsmaßnahmen (P-Sätze)
Sigmacote®	H304	P301+P310; P331
Acetonitril	H225; H302+H312+H332; H319	P210; P280; P301+P312; P303+P361+P353; P304+P340+P312; P305+P351+P338
Formafix 4% gepuffert	H302; H317; H341; H350	P280; P308+P313; P302+P352
Ethanol	H225; H319	P210; P233; P305+P351+P338
Collagenase	H315; H317; H319; H334; H335	P261; P280; P305+P351+P338; P342+P311
2-Mercaptoethanol	H361; H317	P261; P201; P280; P302+P352; P308+P313; P333+P313
Isopropanol	H225; H319; H336	P210; P280; P305+P351+P338; P337+P313
Xylol	H226; H304; H312+H332; H315; H319; H335; H373	P210; P260; P280; P301+P310; P303+P361+P353; P305+P351+P338
Resorcin-Fuchsin-Lösung nach Weigert	H225; H290; H302+H312+H332; H318; H336; H370	P210; P260; P280; P302+P342; P305+P351+P338; P308+P311
Weigerts- Eisenhämatoxylin-Färbekit	H225; H290; H318; H336	P210; P280; P302+P352; P304+P340; P305+P351+P338; P312

Anhang

Pikrinsäure Lösung 1,2%	H314; H318	P280; P301+P330+P331; P303+P361+P353; P304+P340; P310; P305+P351+P338
Thiazinrot R	H319	P280; P305+P351+P338; P337+P313
Eukitt®	H304; H412	P301+P310; P331
Methanol	H225; H301+H311+H331; H370	P210; P270; P280; P303+361+P353; P304+P340; P308+P311
Isofluran	H336; H373; H361	P260; P304+P340; P312

H-Sätze

H200	Instabil, explosiv.
H201	Explosiv, Gefahr der Massenexplosion.
H202	Explosiv; große Gefahr durch Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
H203	Explosiv; Gefahr durch Feuer, Luftdruck oder Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
H204	Gefahr durch Feuer oder Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
H205	Gefahr der Massenexplosion bei Feuer. H220 Extrem entzündbares Gas.
H221	Entzündbares Gas.
H222	Extrem entzündbares Aerosol.
H223	Entzündbares Aerosol.
H224	Flüssigkeit und Dampf extrem entzündbar.
H225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
H226	Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
H227	Brennbare Flüssigkeit.
H228	Entzündbarer Feststoff.
H229	Behälter steht unter Druck: Kann bei Erwärmung bersten.
H230	Kann auch in Abwesenheit von Luft explosionsartig reagieren.
H231	Kann auch in Abwesenheit von Luft bei erhöhtem Druck und/oder erhöhter Temperatur explosionsartig reagieren.
H240	Erwärmung kann Explosion verursachen.
H241	Erwärmung kann Brand oder Explosion verursachen.
H242	Erwärmung kann Brand verursachen.
H250	Entzündet sich in Berührung mit Luft von selbst.
H251	Selbsterhitzungsfähig; kann in Brand geraten.
H252	In großen Mengen selbsterhitzungsfähig; kann in Brand geraten.
H260	In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase, die sich spontan entzünden können.
H261	In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase.
H270	Kann Brand verursachen oder verstärken; Oxidationsmittel.
H271	Kann Brand oder Explosion verursachen; starkes Oxidationsmittel.
H272	Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel.

Anhang

H280	Enthält Gas unter Druck; kann bei Erwärmung explodieren.
H281	Enthält tiefgekühltes Gas; kann Kälteverbrennungen oder -verletzungen verursachen.
H290	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
H300	Lebensgefahr bei Verschlucken.
H301	Giftig bei Verschlucken.
H302	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
H303	Kann bei Verschlucken gesundheitsschädlich sein.
H304	Kann bei Verschlucken und Eindringen in die Atemwege tödlich sein.
H305	Kann bei Verschlucken und Eindringen in die Atemwege gesundheitsschädlich sein.
H310	Lebensgefahr bei Hautkontakt.
H311	Giftig bei Hautkontakt.
H312	Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.
H313	Kann bei Berührung mit der Haut gesundheitsschädlich sein.
H314	Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
H315	Verursacht Hautreizungen.
H316	Verursacht leichte Hautreizungen.
H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
H318	Verursacht schwere Augenschäden.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
H320	Verursacht Augenreizungen.
H330	Lebensgefahr bei Einatmen.
H331	Giftig bei Einatmen.
H332	Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
H333	Kann bei Einatmen gesundheitsschädlich sein.
H334	Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
H335	Kann die Atemwege reizen.
H336	Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
H340	Kann genetische Defekte verursachen.
H341	Kann vermutlich genetische Defekte verursachen.
H350	Kann Krebs erzeugen.
H351	Kann vermutlich Krebs erzeugen.
H360	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen.
H361	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen
H362	Kann Säuglinge über die Muttermilch schädigen.
H370	Schädigt die Organe.
H371	Kann die Organe schädigen.
H372	Schädigt die Organe bei längerer oder wiederholter Exposition.
H373	Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition.
H300 + H310	Lebensgefahr bei Verschlucken oder Hautkontakt
H300 + H310 + H330	Lebensgefahr bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen
H300 + H330	Lebensgefahr bei Verschlucken oder Einatmen
H301 + H311	Giftig bei Verschlucken oder Hautkontakt
H301 + H311 + H331	Giftig bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen
H301 + H331	Giftig bei Verschlucken oder Einatmen
H302 + H312	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Hautkontakt
H302 + H312 + H332	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen
H302 + H332	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Einatmen

Anhang

H303 + H313	Kann bei Verschlucken oder Hautkontakt gesundheitsschädlich sein.
H303 + H313 + H333	Kann bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen gesundheitsschädlich sein.
H303 + H333	Kann bei Verschlucken oder Einatmen gesundheitsschädlich sein.
H310 + H330	Lebensgefahr bei Hautkontakt oder Einatmen
H311 + H331	Giftig bei Hautkontakt oder Einatmen
H312 + H332	Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt oder Einatmen
H313 + H333	Kann bei Hautkontakt oder Einatmen gesundheitsschädlich sein.
H315 + H320	Verursacht Haut- und Augenreizungen.
H400	Sehr giftig für Wasserorganismen.
H401	Giftig für Wasserorganismen.
H402	Schädlich für Wasserorganismen.
H410	Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.
H411	Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
H412	Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
H413	Kann für Wasserorganismen schädlich sein, mit langfristiger Wirkung.
H420	Schädigt die öffentliche Gesundheit und die Umwelt durch Ozonabbau in der äußeren Atmosphäre
P-Sätze	
P101	Ist ärztlicher Rat erforderlich, Verpackung oder Kennzeichnungsetikett bereithalten.
P102	Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.
P103	Vor Gebrauch Kennzeichnungsetikett lesen.
P201	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
P202	Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
P210	Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen und anderen Zündquellen fernhalten. Nicht rauchen.
P211	Nicht gegen offene Flamme oder andere Zündquelle sprühen.
P220	Von Kleidung und anderen brennbaren Materialien fernhalten.
P221	Mischen mit brennbaren Stoffen/... unbedingt verhindern.
P222	Keinen Kontakt mit Luft zulassen.
P223	Keinen Kontakt mit Wasser zulassen.
P230	Feucht halten mit ...
P231	Inhalt unter inertem Gas/... handhaben und aufbewahren.
P232	Vor Feuchtigkeit schützen.
P233	Behälter dicht verschlossen halten.
P234	Nur in Originalverpackung aufbewahren.
P235	Kühl halten.
P240	Behälter und zu befüllende Anlage erden.
P241	Explosionsschutz elektrische Geräte/Lüftungsanlagen/Beleuchtungsanlagen/... verwenden.
P242	Funkenarmes Werkzeug verwenden.
P243	Maßnahmen gegen elektrostatische Entladungen treffen.
P244	Ventile und Ausrüstungsteile öl- und fettfrei halten.
P250	Nicht schleifen/stoßen/reiben/... .
P251	Nicht durchstechen oder verbrennen, auch nicht nach Gebrauch.
P260	Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen.
P261	Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.
P262	Nicht in die Augen, auf die Haut oder auf die Kleidung gelangen lassen.
P263	Berührung während Schwangerschaft und Stillzeit vermeiden.
P264	Nach Gebrauch ... gründlich waschen.

Anhang

P270	Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.
P271	Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden.
P272	Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.
P273	Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
P281	Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden.
P282	Schutzhandschuhe mit Kälteisolierung/Gesichtsschild/Augenschutz tragen.
P283	Schwer entflammbare oder flammhemmende Kleidung tragen.
P284	[Bei unzureichender Belüftung] Atemschutz tragen.
P285	Bei unzureichender Belüftung Atemschutz tragen.
P231 + P232	Inhalt unter inertem Gas/... handhaben und aufbewahren. Vor Feuchtigkeit schützen.
P235 + P410	Kühl halten. Vor Sonnenbestrahlung schützen.
P301	BEI VERSCHLUCKEN:
P302	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT:
P303	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar):
P304	BEI EINATMEN: P305 BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN:
P306	BEI KONTAKT MIT DER KLEIDUNG:
P307	BEI Exposition:
P308	BEI Exposition oder falls betroffen
P309	BEI Exposition oder Unwohlsein:
P310	Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/.../anrufen.
P311	GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/.../anrufen.
P312	Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/... anrufen.
P313	Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P314	Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P315	Sofort ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P320	Besondere Behandlung dringend erforderlich (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).
P321	Besondere Behandlung (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).
P322	Gezielte Maßnahmen (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).
P330	Mund ausspülen.
P331	KEIN Erbrechen herbeiführen.
P332	Bei Hautreizung:
P301 + P310	BEI VERSCHLUCKEN: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/.../anrufen.
P301 + P312	BEI VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/... anrufen.
P301 + P330 + P331	BEI VERSCHLUCKEN: Mund ausspülen. KEIN Erbrechen herbeiführen.
P302 + P334	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: In kaltes Wasser tauchen oder nassen Verband anlegen.
P302 + P350	BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen.
P302 + P352	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser/.../waschen.
P303 + P361 + P353	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen [oder duschen].
P304 + P312	BEI EINATMEN: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
P304 + P340	BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.
P304 + P341	BEI EINATMEN: Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
P305 + P351 + P338	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

Anhang

P306 + P360	BEI KONTAKT MIT DER KLEIDUNG: Kontaminierte Kleidung und Haut sofort mit viel Wasser abwaschen und danach Kleidung ausziehen.
P307 + P311	BEI Exposition: GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
P308 + P311	BEI Exposition oder falls betroffen: GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/.../anrufen.
P308 + P313	BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P309 + P311	BEI Exposition oder Unwohlsein: GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
P332 + P313	Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P333	Bei Hautreizung oder -ausschlag:
P334	In kaltes Wasser tauchen [oder nassen Verband anlegen].
P335	Lose Partikel von der Haut abbürsten.
P336	Vereiste Bereiche mit lauwarmem Wasser auftauen. Betroffenen Bereich nicht reiben.
P337	Bei anhaltender Augenreizung:
P338	Eventuell Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.
P340	Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.
P341	Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
P342	Bei Symptomen der Atemwege:
P350	Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen.
P351	Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen.
P352	Mit viel Wasser/.../waschen.
P353	Haut mit Wasser abwaschen [oder duschen].
P360	Kontaminierte Kleidung und Haut sofort mit viel Wasser abwaschen und danach Kleidung ausziehen.
P361	Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen.
P362	Kontaminierte Kleidung ausziehen.
P363	Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen.
P364	Und vor erneutem Tragen waschen.
P370	Bei Brand:
P371	Bei Großbrand und großen Mengen:
P372	Explosionsgefahr.
P373	KEINE Brandbekämpfung, wenn das Feuer explosive Stoffe/Gemische/Erzeugnisse erreicht.
P374	Brandbekämpfung mit üblichen Vorsichtsmaßnahmen aus angemessener Entfernung.
P375	Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.
P376	Undichtigkeit beseitigen, wenn gefahrlos möglich.
P377	Brand von ausströmendem Gas: Nicht löschen, bis Undichtigkeit gefahrlos beseitigt werden kann.
P378	... zum Löschen verwenden.
P380	Umgebung räumen.
P381	Bei Undichtigkeit alle Zündquellen entfernen.
P390	Verschüttete Mengen aufnehmen, um Materialschäden zu vermeiden.
P391	Verschüttete Mengen aufnehmen.
P333 + P313	Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P335 + P334	Lose Partikel von der Haut abbürsten. In kaltes Wasser tauchen/nassen Verband anlegen.
P337 + P313	Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P342 + P311	Bei Symptomen der Atemwege: GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/.../anrufen.

Anhang

P361 + P364	Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.
P362 + P364	Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.
P370 + P376	Bei Brand: Undichtigkeit beseitigen, wenn gefahrlos möglich.
P370 + P378	Bei Brand: ... zum Löschen verwenden.
P370 + P380	Bei Brand: Umgebung räumen.
P370 + P380 + P375	Bei Brand: Umgebung räumen. Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.
P371 + P380 + P375	Bei Großbrand und großen Mengen: Umgebung räumen. Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.
P401	Aufbewahren gemäß
P402	An einem trockenen Ort aufbewahren.
P403	An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
P404	In einem geschlossenen Behälter aufbewahren.
P405	Unter Verschluss aufbewahren.
P406	In korrosionsbeständigem/... Behälter mit widerstandsfähiger Innenauskleidung aufbewahren.
P407	Luftspalt zwischen Stapeln oder Paletten lassen.
P410	Vor Sonnenbestrahlung schützen.
P411	Bei Temperaturen nicht über ... °C/...°F aufbewahren.
P412	Nicht Temperaturen über 50 °C/122 °F aussetzen.
P413	Schüttgut in Mengen von mehr als ... kg/... lbs bei Temperaturen nicht über ... °C/... °F aufbewahren.
P420	Getrennt aufbewahren.
P422	Inhalt in/unter ... aufbewahren
P402 + P404	An einem trockenen Ort aufbewahren. In einem geschlossenen Behälter aufbewahren.
P403 + P233	An einem gut belüfteten Ort aufbewahren. Behälter dicht verschlossen halten.
P403 + P235	An einem gut belüfteten Ort aufbewahren. Kühl halten.
P410 + P403	Vor Sonnenbestrahlung schützen. An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
P410 + P412	Vor Sonnenbestrahlung schützen und nicht Temperaturen über 50 °C/122 °F aussetzen.
P411 + P235	Bei Temperaturen nicht über ... °C/...°F aufbewahren. Kühl halten.
P501	Inhalt/Behälter ... zuführen.
P502	Informationen zur Wiederverwendung oder Wiederverwertung beim Hersteller oder Lieferanten erfragen.

9.3 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 Anatomischer Aufbau einer gesunden Arterie;** Die innerste Schicht ist die Intima mit einer Schicht von Endothelzellen, die mittlere Schicht ist die Media, die vor allem aus glatten Muskelzellen (SMCs) besteht und die äußerste Schicht ist die Adventitia. Die Lamina elastica interna und externa trennt die Media von der Intima bzw. Adventitia ab; modifiziert nach Libby et al. 2011 [6] 5
- Abbildung 2 Entwicklung einer atherosklerotischen Plaque;** 1: Die ersten Veränderungen, die der zur Bildung von Atherosklerose führen, finden im Endothel statt. Zu diesen Veränderungen gehört eine erhöhte endotheliale Permeabilität für Lipoproteine, die Hochregulierung von Leukozyten- und Endothel-Adhäsionsmolekülen und die Migration von Leukozyten in die Arterienwand; 2: Die „fatty streaks“ bestehen zunächst aus lipidbeladenen Monozyten und Makrophagen zusammen mit T-Lymphozyten. Später erfolgt dann die Migration von glatten Muskelzellen; 3: Die „fatty streaks“ bilden eine fibröse Kappe, die die Läsion vom Lumen abgrenzt. Die fibröse Kappe umgibt eine Mischung aus Leukozyten, Lipiden und Debris, die einen nekrotischen Kern bilden können; 4: Eine Ruptur der fibrösen Kappe tritt in der Regel an Stellen auf an denen die fibröse Kappe ausgedünnt ist. Die Ausdünnung der fibrösen Kappe ist offenbar auf den anhaltenden Zustrom und die Aktivierung von Makrophagen zurückzuführen. Abbildung modifiziert von Ross R. [14] 7
- Abbildung 3 pathophysiologischer Prozess der In-stent Restenose;** 1: atherosklerotische Plaque vor dem Eingriff; 2: Unmittelbar nach der Stent-Platzierung, Endothel-Denudation und Thrombozyten/Fibrinogen-Anlagerung; 3 und 4: Leukozytenrekrutierung, Infiltration sowie SMC Proliferation und Migration in den Tagen nach der Verletzung; 5: Neointimale Verdickung in den Wochen nach der Verletzung mit fortgesetzter SMC Proliferation und Monozytenrekrutierung; 6: Langfristige (Wochen bis Monate) Veränderung von einer überwiegend zellulären zu einer weniger zellulären und mehr ECM-reichen Plaque; Abbildung modifiziert von Costa und Simon [25] 12
- Abbildung 4 Biosynthese des Sphingosin-1-phosphats;** SPT: Serin-Palmitoyltransferase; CerS: Ceramidsynthase; DEGS: Desaturierung; SPHK1/2: Sphingosinekinase 1/2; SPP1/2: Sphingosinephosphatase; SMase: Sphingomyelase; SMS: Sphingomyelinsynthase; GCS: Glucosylceramid synthase [40]..... 13
- Abbildung 5 Signalweg des Sphingosin-1-phosphats;** Die S1P Rezeptoren (S1PR1-3) sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren. S1PR1 koppelt nur an Gi, S1PR2 und S1PR3 koppeln an Gi, Gq und G12/13. Diese Kopplung führt zur Aktivierung von kleinen GTPasen wie Rho, Rac und Ras. Weitere nachgeschaltete Aktivierungen von S1P-Rezeptoren betrifft die Adenylat-Cylase, PI-3-Kinase (PI3K), Phospholipase C (PLC) und Proteinkinase C (PKC) und intrazelluläres Kalzium. ERK: extracellular-signal regulated Kinase; eNOS: endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase; erstellt mit Biorender.com; modifiziert nach Mendelson et al. [68]..... 17
- Abbildung 6 Schematische Darstellung der S1pr3 Gen-Targeting-Strategie** [98] Oben: Die Struktur des S1pr3 Lokus der Maus; Mitte: die Struktur des S1pr3-Zielvektors; Unten:

Anhang

vorhergesagte Struktur des homolog kombinierten Lokus; B: BamHI; Bg: BglII; N: NcoI; TK: Thymidin-Kinase-Gen; Neo: Neomycin-Resistenz-Gen	25
Abbildung 7 Klemmen der abdominalen Aorta	26
Abbildung 8 Beispiel der morphometrischen Auswertung; Eine Schnittebene der abdominalen Aorta von einer WT-Maus 28 Tage nach der Operation; EvG-Färbung; gelbe Linie: Lamina elastica externa (LEE); rote Linie: Lamina elastica interna (LEI); orange Linie: Abgrenzung des Lumens	29
Abbildung 9 Beispiel einer Kalibriergerade zur Bestimmung der S1P-Konzentration; Ordinate: Peakflächenverhältnis von S1P und S1P-d7 der Kalibratoren; Abszisse: S1P-Konzentration der Kalibratoren; Angabe von der Gleichung der linearen Regressionsgerade und des Bestimmtheitsmaßes R^2	37
Abbildung 10 Histologische Bilder der abdominalen Aorta von <i>S1pr3+/+</i> und <i>S1pr3-/-</i> Mäusen; Links: zwei ausgewählte Beispielbilder der <i>S1pr3+/+</i> Mäuse mit stark ausgeprägter Intimahyperplasie; Rechts: zwei ausgewählte Beispielbilder der <i>S1pr3-/-</i> Mäuse mit geringer bis keiner Ausbildung einer Intimahyperplasie; EvG-Färbung; Maßstab: 200 μ m	40
Abbildung 11 Morphometrische Analyse der histologischen Schnitte; A: Das I/M Verhältnis von <i>S1pr3+/+</i> und <i>S1pr3-/-</i> Mäusen; B: Zahl der Läsionen pro Schnittebene (1-10) von <i>S1pr3+/+</i> und <i>S1pr3-/-</i> ; C: Das mittlere I/M Verhältnis pro Schnittebene (1-10); WT: Wildtyp; ** $P < 0,01$; 2-seitiger T-test (<i>S1pr3+/+</i> und <i>S1pr3-/-</i>)	41
Abbildung 12 <i>S1pr1</i> und <i>S1pr2</i> Expression in der Adventitia und Media der abdominalen Aorta im Zeitverlauf; A: Expression von <i>S1pr1</i> in der Adventitia; B: Expression von <i>S1pr1</i> in der Media; C: Expression von <i>S1pr2</i> in der Adventitia; D: Expression von <i>S1pr2</i> in der Media; n= 5 Pools á 2 Aorten; \pm SEM; WT: Wildtyp * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; 2-seitiger T-test (<i>S1pr3+/+</i> und <i>S1pr3-/-</i>) und Two-way ANOVA (baseline vs. 4d o. 7d o. 14d o. 21d)	43
Abbildung 13 <i>S1pr3</i> Expression in der Adventitia und Media der abdominalen Aorta im Zeitverlauf; A: Expression von <i>S1pr3</i> in der Adventitia; B: Expression von <i>S1pr3</i> in der Media n= 5 Pools á 2 Aorten; \pm SEM; Two-way ANOVA (baseline vs. 4d o. 7d o. 14d o. 21d)	44
Abbildung 14 <i>Sphk1</i> Expression in der Adventitia und Media der abdominalen Aorta im Zeitverlauf; A: Expression von <i>Sphk1</i> in der Adventitia; B: Expression von <i>Sphk1</i> in der Media n= 5 Pools á 2 Aorten; \pm SEM; WT: Wildtyp; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; 2-seitiger T-test (<i>S1pr3+/+</i> und <i>S1pr3-/-</i>) und Two-way ANOVA (baseline vs. 4d o. 7d o. 14d o. 21d)	44
Abbildung 15 <i>Myh11</i> und <i>Sma</i> Expression in der Adventitia und Media der abdominalen Aorta im Zeitverlauf; A: Expression von <i>Myh11</i> in der Adventitia; B: Expression von <i>Myh11</i> in der Media; C: Expression von <i>Sma</i> in der Adventitia; D: Expression von <i>Sma</i> in der Media; n= 5 Pools á 2 Aorten; WT: Wildtyp; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; \pm SEM;	

Anhang

2-seitiger T-test (<i>S1pr3+/+</i> und <i>S1pr3-/-</i>) und Two-way ANOVA (baseline vs. 4d o. 7d o. 14d o. 21d).....	46
Abbildung 16 <i>Sca1</i> Expression in der Adventitia und Media der abdominalen Aorta im Zeitverlauf; A: Expression von <i>Sca1</i> in der Adventitia; B: Expression von <i>Sca1</i> in der Media; n= 5 Pools á 2 Aorten; ±SEM; WT: Wildtyp; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; 2-seitiger T-test (<i>S1pr3+/+</i> und <i>S1pr3-/-</i>) und Two-way ANOVA (baseline vs. 4d o. 7d o. 14d o. 21d).....	47
Abbildung 17 <i>Cd68</i> Expression in der Adventitia und Media der abdominalen Aorta im Zeitverlauf; A: Expression von <i>Cd68</i> in der Adventitia; B: Expression von <i>Cd68</i> in der Media; n= 5 Pools á 2 Aorten; ±SEM; WT: Wildtyp; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001; 2-seitiger T-test (<i>S1pr3+/+</i> und <i>S1pr3-/-</i>) und Two-way ANOVA (baseline vs. 4d o. 7d o. 14d o. 21d).....	48
Abbildung 18 <i>I11b</i> Expression in der Adventitia und Media der abdominalen Aorta im Zeitverlauf; A: Expression von <i>I11b</i> in der Adventitia; B: Expression von <i>I11b</i> in der Media; n= 5 Pools á 2 Aorten; ±SEM; WT: Wildtyp; *P<0,05; **P<0,01; 2-seitiger T-test (<i>S1pr3+/+</i> und <i>S1pr3-/-</i>) und Two-way ANOVA (baseline vs. 4d o. 7d o. 14d o. 21d).....	50
Abbildung 19 <i>I110</i> Expression in der Adventitia und Media der abdominalen Aorta im Zeitverlauf; A: Expression von <i>I110</i> in der Adventitia; B: Expression von <i>I110</i> in der Media; n= 5 Pools á 2 Aorten; ±SEM; *P<0,05; **P<0,01; 2-seitiger T-test (<i>S1pr3+/+</i> und <i>S1pr3-/-</i>) und Two-way ANOVA (baseline vs. 4d o. 7d o. 14d o. 21d).....	51
Abbildung 20 <i>Ccl2</i> Expression in der Adventitia und Media der abdominalen Aorta im Zeitverlauf; A: Expression von <i>Ccl2</i> in der Adventitia; B: Expression von <i>Ccl2</i> in der Media; n= 5 Pools á 2 Aorten; ±SEM; WT: Wildtyp; *P<0,05; **P<0,01; 2-seitiger T-test (<i>S1pr3+/+</i> und <i>S1pr3-/-</i>) und Two-way ANOVA (baseline vs. 4d o. 7d o. 14d o. 21d).....	52
Abbildung 21 <i>Gdf15</i> Expression in der Adventitia und Media der abdominalen Aorta im Zeitverlauf; A: Expression von <i>Gdf15</i> in der Adventitia; B: Expression von <i>Gdf15</i> in der Media; n= 5 Pools á 2 Aorten; ±SEM; WT: Wildtyp; *P<0,05; **P<0,01; 2-seitiger T-test (<i>S1pr3+/+</i> und <i>S1pr3-/-</i>) und Two-way ANOVA (baseline vs. 4d o. 7d o. 14d o. 21d).....	53
Abbildung 22 <i>Par2</i> und <i>Par4</i> Expression in der Adventitia und Media der abdominalen Aorta im Zeitverlauf; A: Expression von <i>Par2</i> in der Adventitia; B: Expression von <i>Par2</i> in der Media; C: Expression von <i>Par4</i> in der Adventitia; D: Expression von <i>Par4</i> in der Media; n= 5 Pools á 2 Aorten; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ±SEM; WT: Wildtyp; 2-seitiger T-test (<i>S1pr3+/+</i> und <i>S1pr3-/-</i>) und Two-way ANOVA (baseline vs. 4d o. 7d o. 14d o. 21d).....	54
Abbildung 23 <i>Crtc1</i> Expression in der Adventitia und Media der abdominalen Aorta im Zeitverlauf; A: Expression von <i>Crtc1</i> in der Adventitia; B: Expression von <i>Crtc1</i> in der Media; n= 5 Pools á 2 Aorten; ±SEM; WT: Wildtyp; *P<0,05; **P<0,01; 2-seitiger T-	

Anhang

test (<i>S1pr3</i> ^{+/+} und <i>S1pr3</i> ^{-/-}) und Two-way ANOVA (baseline vs. 4d o. 7d o. 14d o. 21d).....	55
Abbildung 24 Vergleich der prä- und postoperativen Plasma-S1P Spiegel der Subgruppe; ***<i>P</i><0,001; Wilcoxon-Test	57
Abbildung 25 Vergleich der prä- und postoperativen Zytokinspiegel; A: prä- und postoperativer <i>IL1B</i>-Spiegel, B: prä- und postoperativer <i>IL10</i>-Spiegel; C: prä- und postoperativer <i>CCL2</i>-Spiegel; Wilcoxon-Test.....	58
Abbildung 26 Korrelationsanalyse zwischen postoperativen plasma-S1P Spiegel und postoperativen Zytokinspiegel; A: Assoziation zwischen post plasma-S1P und post <i>IL1B</i>; B: Assoziation zwischen post plasma-S1P und post <i>IL10</i>; C: Assoziation zwischen post plasma-S1P und post <i>CCL2</i>; rho: Spearman-Koeffizient; <i>p</i>< 0,05 = statistisch signifikant.....	59
9.4 Tabellenverzeichnis	
Tabelle 1 Ablauf der Dehydrierung und Fixierung des Gefäßes	27
Tabelle 2 Zusammensetzung des Reaktionsansatzes der cDNA-Synthese	31
Tabelle 3 RT-qPCR Reaktionsprotokoll.....	32
Tabelle 4 log ₂ Robust Mikro-Array Average (RMA) Mittelwerte der Mikroarray Analyse der denudierten Iliofemoralis Arterie von <i>S1pr3</i> ^{-/-} und <i>S1pr3</i> ^{+/+} Mäusen 4 Tage nach der Verletzung; ΔRMA: Differenz zwischen <i>S1pr3</i> ^{-/-} und <i>S1pr3</i> ^{+/+}	49
Tabelle 5 Baseline Charakteristika der Gesamtkohorte und Subgruppe	56
Tabelle 6 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse des Verletzungsmodells	60

10 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Edzard Schwedhelm sehr bedanken, für die ausgezeichnete Betreuung, nicht nur wissenschaftlich, sondern auch persönlich; für die ständige Erreichbarkeit und dass er immer ein offenes Ohr für meine Anliegen hatte; und auch für die Freiheiten, die er mir bei meiner Arbeit gegeben hat.

Ein großes Dankeschön geht auch an Prof. Dr. Elke Oetjen für die Übernahme der Betreuung im Fachbereich Chemie und für die freundliche und immer hilfsbereite Unterstützung und, dass sie und Sabine Schröder mich immer im Labor herzlich willkommen hießen.

Prof. Dr. Elke Oetjen, Prof. Dr. Louisa Temme, Dr. Thomas Hackl, Prof. Dr. Viachselva Nikolaev und Prof. Dr. Edzard Schwedhelm danke ich dafür, dass sie sich die Zeit genommen haben, Mitglieder meiner Prüfungskommission zu sein.

Dr. Günter Daum danke ich für die freundliche Aufnahme in ihrem Labor und die ständige Hilfsbereitschaft und den wissenschaftlichen Austausch und für die Bereitstellung der Mikroarray Daten und der S1PR3 Mäuse.

Ich möchte auch Prof. Dr. Sebastian Debus und Prof. Dr. Axel Larena-Avellaneda für die Bereitstellung der Patientenproben der Kohortenstudie, sowie Dr. Kerstin Troidl für die Messung der Zytokine in den Patientenproben danken.

Dr. Markus Geißen und Sophia Deden möchte ich ganz besonders für die tatkräftige Unterstützung im Labor bedanken und, dass sie immer ein offenes Ohr für mich bei wissenschaftlichen Fragen aber auch bei privaten Anliegen hatten. Vielen Dank für die zahlreichen lustigen Laborstunden und auch mal längeren Kaffeepausen.

Yu Jang und Astrid Becker möchte ich danken, dass sie sich die Zeit genommen haben mir die verschiedenen OP -Techniken beizubringen.

Ich danke unserem Institutsleiter der klinischen Pharmakologie und Toxikologie Prof. Dr. Rainer H. Böger für die Aufnahme in sein Institut. Ich möchte mich auch bei allen Mitarbeitern der klinischen Pharmakologie und Toxikologie und des Labors der Gefäßmedizin für das tolle Arbeitsumfeld bedanken. Vor allem möchte ich mich auch bei Heike Stang und Lena Schmidt-

Danksagung

Hutten für die schöne gemeinsame Zeit während der Doktorarbeit bedanken, dass sie immer Zeit für Gespräche hatten und immer eine hilfreiche Unterstützung waren.

Ich möchte auch dem DZHK für die finanzielle Unterstützung meines Projektes bedanken.

Meinen Eltern möchte ich am meisten danken, dass sie immer für mich da sind und in jeder Lebenslage für mich erreichbar sind und mich immer unterstützen, wo sie können. Meinen Geschwistern und Freunden danke ich für ihre ständige Unterstützung und dass sie immer für mich da sind.

11 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende, an der Universität Hamburg eingereichte Dissertation mit dem Titel

Die Rolle von Sphingosin-1-phosphat und Sphingosin-1-phosphat Rezeptor 3 bei der
Restenose

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die Dissertation wurde unter der Anleitung von Prof. Edzard Schwedhelm und der Betreuung von Prof. Elke Oetjen am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf verfasst. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Hamburg, den 19.06.2023

Mirjam von Lucadou