

Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie

Direktor: Prof. Dr. Rainer H. Böger

Zentrum für Experimentelle Medizin

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

**Die Bedeutung der vasoaktiven  
Signallipide 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und S1P  
für kardiovaskuläre Erkrankungen**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt im Department Chemie

der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

der Universität Hamburg

von

Eileen Moritz

aus Derschen

Hamburg, Mai 2016



1. Gutachter: Prof. Dr. Elke Oetjen

2. Gutachter: PD Dr. Edzard Schwedhelm

Disputation: 15. Juli 2016

Druckfreigabe: 22. Juli 2016



So throw off the bowlines.  
Sail away from the safe harbor.  
Catch the trade winds in your sails.  
Explore. Dream. Discover.

Marc Twain



Mama, Papa und Viola



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>8-iso-Prostaglandin F<sub>2α</sub></b>	<b>1</b>
1.1.1	Metabolismus	1
1.1.2	Zellulärer und molekularer Wirkmechanismus	3
1.1.3	Signaltransduktion	6
1.1.4	Biologische Aktivität	8
1.1.5	TP-Tiermodell	9
1.1.6	Bedeutung für kardiovaskuläre Erkrankungen	9
<b>1.2</b>	<b>Sphingosin-1-phosphat</b>	<b>12</b>
1.2.1	Metabolismus	12
1.2.2	Zellulärer und molekularer Wirkmechanismus	16
1.2.3	Signaltransduktion	17
1.2.4	Biologische Aktivität	19
1.2.5	Bedeutung für kardiovaskuläre Erkrankungen	20
<b>1.3</b>	<b>8-iso-PGF<sub>2α</sub> und S1P</b>	<b>23</b>
1.3.1	Gemeinsamkeiten	23
1.3.2	Zusammenhang	23
<b>1.4</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>26</b>
1.4.1	8-iso-PGF <sub>2α</sub>	26
1.4.2	S1P	26
1.4.3	8-iso-PGF <sub>2α</sub> und S1P	26
<b>2</b>	<b>Methoden</b>	<b>27</b>
<b>2.1</b>	<b>Instrumentelle Analytik</b>	<b>27</b>
2.1.1	Bestimmung der 8-iso-PGF <sub>2α</sub> -Konzentration in murinen und humanen Urinproben	27
2.1.2	Bestimmung der S1P-Konzentration in biologischen Proben	28
<b>2.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>32</b>
2.2.1	DNA-Analysen	32
2.2.2	RNA-Analysen	35

2.2.3	Protein-Analysen	38
<b>2.3</b>	<b>Tierexperimentelle Methoden</b>	<b>43</b>
2.3.1	Generierung von transgenen Mäusen	43
2.3.2	Vasokonstriktorische Messungen am Myographen	43
2.3.3	Intravitalmikroskopie	45
2.3.4	Implantation osmotischer Minipumpen	48
2.3.5	<i>Tail-cuff</i> -Blutdruckmessung	49
2.3.6	Elektronenspinresonanz-Spektroskopie	50
2.3.7	Metabolom-Messung	50
2.3.8	AAV-Injektion	51
2.3.9	Biolumineszenz-Imaging	52
2.3.10	Ligation der Arteria carotis	52
<b>2.4</b>	<b>Klinische Studien</b>	<b>53</b>
2.4.1	ACS-Studie	53
2.4.2	iP4-Studie	53
<b>2.5</b>	<b>Statistik</b>	<b>54</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>55</b>
<b>3.1</b>	<b>8-iso-PGF<sub>2α</sub></b>	<b>55</b>
3.1.1	Nachweis des TP	55
3.1.2	Phänotypisierung von TP-KO und WT-Geschwistern	60
3.1.3	<i>Ex vivo</i> -Effekte von 8-iso-PGF <sub>2α</sub> in TP-KO und WT-Geschwistern	67
3.1.4	<i>In vivo</i> -Effekte von 8-iso-PGF <sub>2α</sub> in TP-KO und WT-Geschwistern	71
3.1.5	Generierung von TP-WT- und TP-MUT-transgenen Mäusen	76
3.1.6	Zielgerichtete Überexpression des murinen TP in pulmonalen Endothelzellen	78
3.1.7	8-iso-PGF <sub>2α</sub> -Konzentrationen in Patienten mit Akutem Koronarsyndrom	84
<b>3.2</b>	<b>Zusammenhang zwischen 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und S1P</b>	<b>89</b>
3.2.1	Netzwerkanalyse	89
3.2.2	S1P-Konzentrationen in TP-KO und WT-Geschwistern	90
3.2.3	Intima-Hyperplasie in TP-KO	91
<b>3.3</b>	<b>S1P</b>	<b>93</b>
3.3.1	Quantifizierung von S1P mittels LC-MS/MS	93

---

3.3.2	S1P-Konzentrationen in verschiedenen Populationen	106
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>119</b>
<b>4.1</b>	<b>8-iso-PGF<sub>2α</sub></b>	<b>119</b>
4.1.1	Nachweis des TP	119
4.1.2	Phänotypisierung von TP-KO und WT-Geschwistern	119
4.1.3	Effekte von 8-iso-PGF <sub>2α</sub> in TP-KO und WT-Geschwistern	121
4.1.4	Generierung von TP-WT- und TP-MUT-transgenen Mäusen	127
4.1.5	Zielgerichtete Überexpression des murinen TP in pulmonalen Endothelzellen	127
4.1.6	8-iso-PGF <sub>2α</sub> im Akuten Koronarsyndrom	128
<b>4.2</b>	<b>S1P</b>	<b>130</b>
4.2.1	Optimierung der LC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von S1P	130
4.2.2	Einflüsse auf die S1P-Konzentration	132
4.2.3	S1P in Gesunden	133
4.2.4	S1P in Patienten mit Gefäßerkrankungen	134
4.2.5	S1P im Akuten Koronarsyndrom	136
4.2.6	S1P bei Pulmonaler Arterieller Hypertonie	138
<b>4.3</b>	<b>Zusammenhang zwischen 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und S1P</b>	<b>139</b>
4.3.1	S1P im TP-Tiermodell	139
4.3.2	8-iso-PGF <sub>2α</sub> und S1P im Patienten	141
<b>4.4</b>	<b>Schlussfolgerung</b>	<b>143</b>
4.4.1	Biologische Aktivität von 8-iso-PGF <sub>2α</sub>	143
4.4.2	S1P als Biomarker	144
4.4.3	8-iso-PGF <sub>2α</sub> und S1P	144
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>145</b>
<b>6</b>	<b>Abstract</b>	<b>147</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>149</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>175</b>
<b>8.1</b>	<b>Materialien</b>	<b>175</b>

8.1.1	Substanzen	175
8.1.2	Primer, Antikörper, AAV-Vektor	179
8.1.3	Puffer und Lösungen	180
8.1.4	Verbrauchsmaterialien und Kits	184
8.1.5	Laborgeräte	186
8.1.6	Software	187
<b>8.2</b>	<b>H- und P-Sätze</b>	<b>188</b>
<b>8.3</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>196</b>
<b>8.4</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>202</b>
<b>8.5</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>206</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>209</b>
<b>10</b>	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>211</b>
<b>11</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>213</b>
<b>12</b>	<b>Danksagung</b>	<b>215</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 8-iso-Prostaglandin F<sub>2α</sub>

### 1.1.1 Metabolismus

#### 1.1.1.1 Biosynthese

Isoprostane sind Prostaglandin-ähnliche Verbindungen, die nach Peroxidation durch reaktive Sauerstoffspezies aus Zellmembran-gebundener Arachidonsäure gebildet werden [1]. Dabei wird nicht zuerst Arachidonsäure von Phospholipase A<sub>2</sub> aus der Zellmembran abgespalten und anschließend oxidiert, sondern die Oxidation findet *in situ* statt und nachfolgend erst die Freisetzung von 8-iso-Prostaglandin F<sub>2α</sub> (8-iso-PGF<sub>2α</sub>) aus der Zellmembran [2]. Anders als bei Prostaglandinen, welche durch Cyclooxygenasen-katalysierte Cyclisierungs- und Oxidationsreaktionen entstehen, finden in der Biosynthese von Isoprostanen keine enzymatischen Vorgänge statt. Oxidativer Stress führt über reaktive Sauerstoffspezies zur Oxidation aller Arten von Biomolekülen, darunter auch von Lipiden. Isoprostane entstehen bei der durch freie Radikale, z. B. durch das Superoxid-Anion O<sub>2</sub><sup>-</sup>, katalysierten Oxidation von Arachidonsäure als Regio- und Stereoisomere der Prostaglandine (Abb. 1) [1]. Die Menge gebildeter Isoprostane spiegelt so das Ausmaß des endogenen oxidativen Stresses wider [3] [4] [5]. Die Isoprostane werden in Analogie zu den Prostaglandinen in Gruppen eingeteilt, darunter die F<sub>2</sub>-Isoprostane. 8-iso-PGF<sub>2α</sub> ist eines von 64 möglichen Isomeren der F<sub>2</sub>-Isoprostane [6].

Die Prostaglandine Prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) und Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) sind gekennzeichnet durch zwei Hydroxygruppen (PGF<sub>2α</sub>) bzw. eine Hydroxy- und eine Ketogruppe (PGE<sub>2</sub>) am Cyclopentanring (Abb. 1). Diese funktionellen Gruppen am Cyclopentanring entsprechen denen der korrespondierenden Isoprostanen 8-iso-PGF<sub>2α</sub> bzw. 8-iso-Prostaglandin E<sub>2</sub> (8-iso-PGE<sub>2</sub>), welche sich jedoch in der Konfiguration an Position 8 von den Prostaglandinen unterscheiden: Während sich die Kohlenwasserstoffketten an Position 8 und 12 des Cyclopentanringes bei Isoprostanen auf der gleichen Seite der Ringebene befinden (*cis*-Form), liegen diese bei Prostaglandinen auf entgegengesetzten Seiten (*trans*-Form).

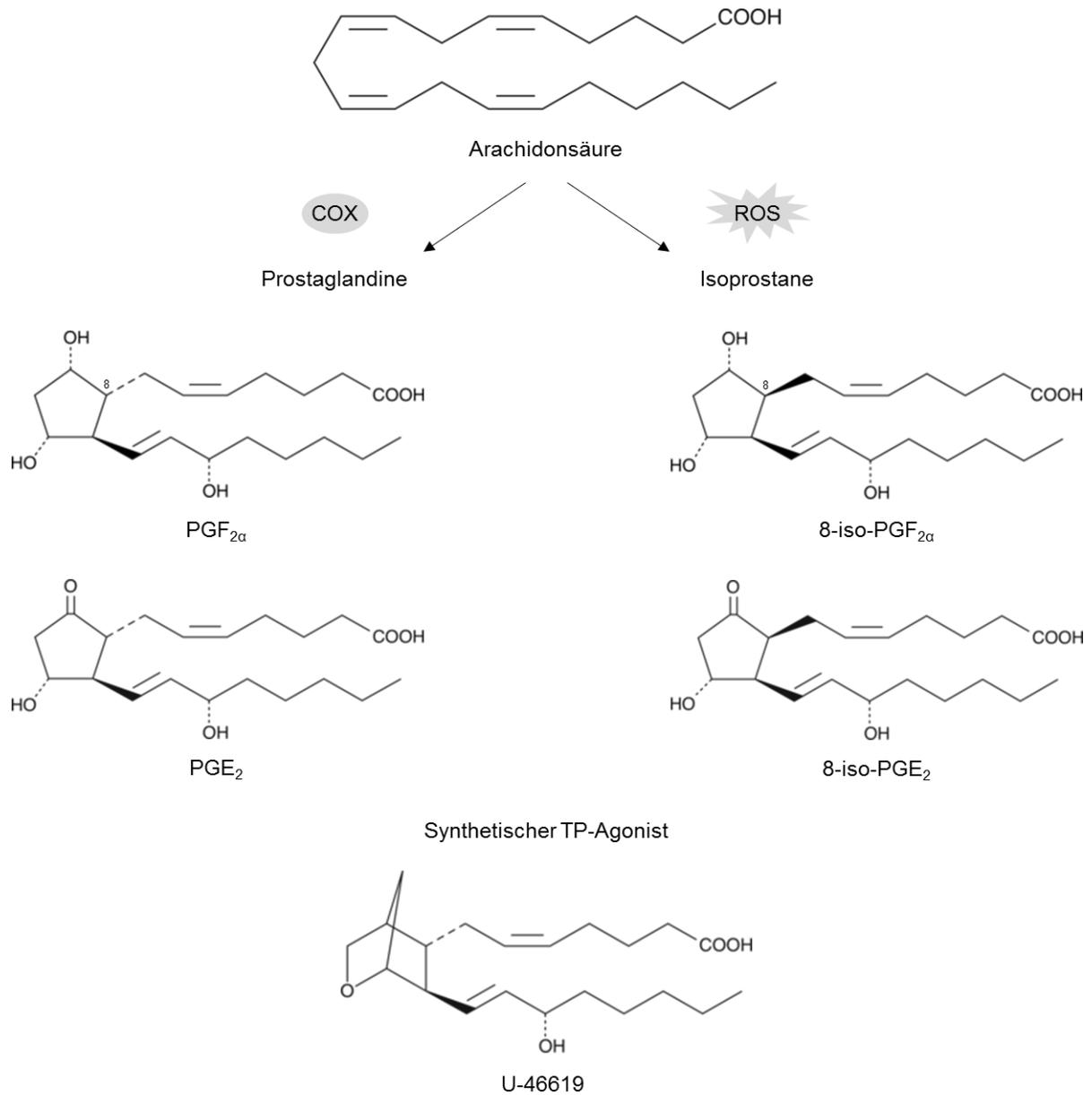


Abb. 1: Biosynthese und Struktur von Prostaglandinen und Isoprostanen. Arachidonsäure als Ausgangssubstanz, Abspaltung aus Zellmembran durch Phospholipase A<sub>2</sub>. Prostaglandine PGF<sub>2α</sub> und PGE<sub>2</sub> via Cyclooxygenasen-katalysierte Cyclisierungs- und Oxidationsreaktionen, Isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub> via Peroxidation durch reaktive Sauerstoffspezies. Struktureller Unterschied: Konfiguration an Position 8, Stereoisomerie. Prostaglandine und Isoprostane als physiologische Agonisten am TP-Rezeptor, U-46619 als vollsynthetischer Agonist. COX Cyclooxygenasen; PGF<sub>2α</sub> Prostaglandin F<sub>2α</sub>; PGE<sub>2</sub> Prostaglandin E<sub>2</sub>; ROS reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*); 8-iso-PGF<sub>2α</sub> 8-iso-Prostaglandin F<sub>2α</sub>; 8-iso-PGE<sub>2</sub> 8-iso-Prostaglandin E<sub>2</sub>; TP Thromboxan-Rezeptor (*thromboxane prostanoid receptor*).<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> modifiziert nach Dissertation Henrike Arnold, Hamburg 2010

<sup>2</sup> modifiziert nach [7]

### 1.1.1.2 Elimination

8-iso-PGF<sub>2α</sub> wird teilweise hepatisch und pulmonal metabolisiert und renal eliminiert. Im Urin von Gesunden beträgt die mediane Konzentration 77 pmol/mmol Kreatinin [8]. Durch β-Oxidation wird 8-iso-PGF<sub>2α</sub> zu 2,3-Dinor-8-iso-PGF<sub>2α</sub> hepatisch metabolisiert. Durch Hydrierung der Doppelbindung C5=C6 in der Lunge entsteht 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> (Abb. 2) [9] [10] [11]. Die mediane Konzentration dieses Metaboliten im Urin beträgt 120 pmol/mmol Kreatinin [8]. 2,3-Dinor-8-iso-PGF<sub>2α</sub> weist als Metabolit die höchste Konzentration im Urin auf, gefolgt von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGF<sub>2α</sub> selbst [11]. Mit der Bestimmung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> sowie den entsprechenden Metaboliten stehen potentielle Biomarker zur Verfügung, die eine Abschätzung der Intensität des oxidativen Stresses *in vivo* erlauben [3] [4] [5] [11]. Neben der hepatischen β-Oxidation unterliegt 8-iso-PGF<sub>2α</sub> auch der hepatischen Glucuronidierung in einer Phase II-Metabolisierung [12].

### 1.1.2 Zellulärer und molekularer Wirkmechanismus

Die biologische Aktivität der Isoprostane wird über den Thromboxan-Rezeptor (TP; *thromboxane prostanoid receptor*) vermittelt, welcher zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR *G protein-coupled receptor*) vom Rhodopsin-Typ zählt (Abb. 3, Abb. 4) [13]. Der TP wird in vielen Geweben, darunter Aorta, Gehirn, Herz und Niere, sowie auf Thrombozyten, Endothelzellen, Kardiomyozyten und glatten Muskelzellen exprimiert [14] [15] [16] [17] [18] [19] [20] [21]. Unterschieden wird zwischen zwei humanen Isoformen: TPα und TPβ [19] [22]. TPα wird u. a. von Thrombozyten exprimiert, TPβ von Endothelzellen. Die Wirkung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> konnte in verschiedenen Versuchsansätzen durch den TP-Antagonisten SQ-29548 antagonisiert werden oder blieb in TP-Knockout-Mäusen (TP-KO) aus [23] [24] [25]. Phenylalanin an Position 196 des heptahelikalen Transmembranproteines ist essentiell für die Bindung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub>. Die Punktmutation Phe196Ala führt zum Verlust der Bindung und agonistischen Aktivität von 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, während andere Agonisten sowie Antagonisten unverändert am TP binden [26] [27]. Im Vergleich zu Thromboxan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>), dem kanonischen Liganden des TP, ist die biologische Halbwertszeit von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> länger und es könnte hierdurch zu einer länger anhaltenden Stimulation des TP kommen. Die Halbwertszeit von TxA<sub>2</sub> beträgt ca. 30 Sekunden, die von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> 4 Minuten [28] [29] [30].

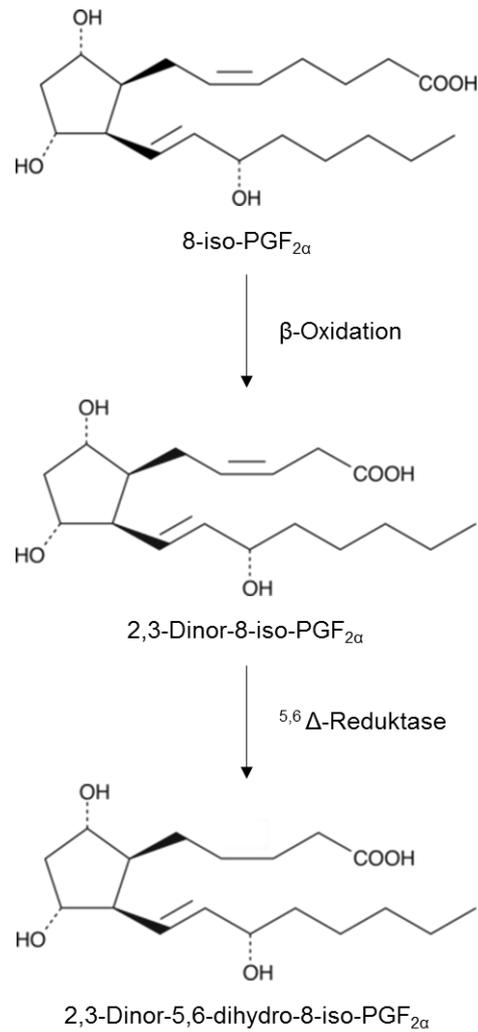


Abb. 2: Metabolismus und renale Elimination von 8-iso-PGF<sub>2α</sub>. Abbau von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> zu 2,3-Dinor-8-iso-PGF<sub>2α</sub> mittels β-Oxidation. Anschließende Reduktion bzw. Hydrierung der Doppelbindung C<sub>5</sub>=C<sub>6</sub> zu 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub>. Renale Elimination von 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, 2,3-Dinor-8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub>. 8-iso-PGF<sub>2α</sub> 8-iso-Prostaglandin F<sub>2α</sub>; 2,3-Dinor-8-iso-PGF<sub>2α</sub> 2,3-Dinor-8-iso-Prostaglandin F<sub>2α</sub>; 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-Prostaglandin F<sub>2α</sub>.<sup>3,4</sup>

<sup>3</sup> modifiziert nach [11]

<sup>4</sup> modifiziert nach [31]

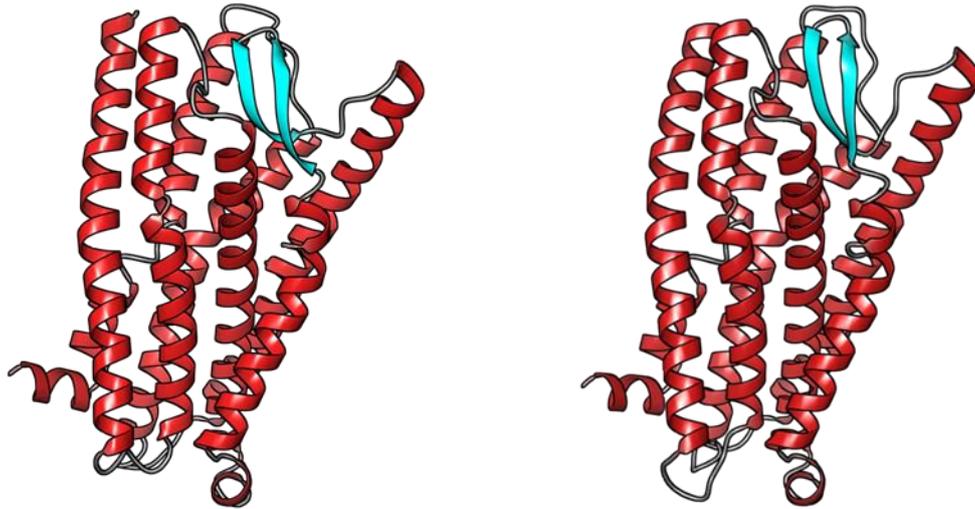


Abb. 3: Schematische Darstellung der heptahelikalen Struktur des TP. Zwei GPCR-Homologiemodelle, zur Verfügung gestellt von Francesca Fanelli, Department of Chemistry, Dulbecco Telethon Institute, University of Modena and Reggio Emilia [32].<sup>5</sup>

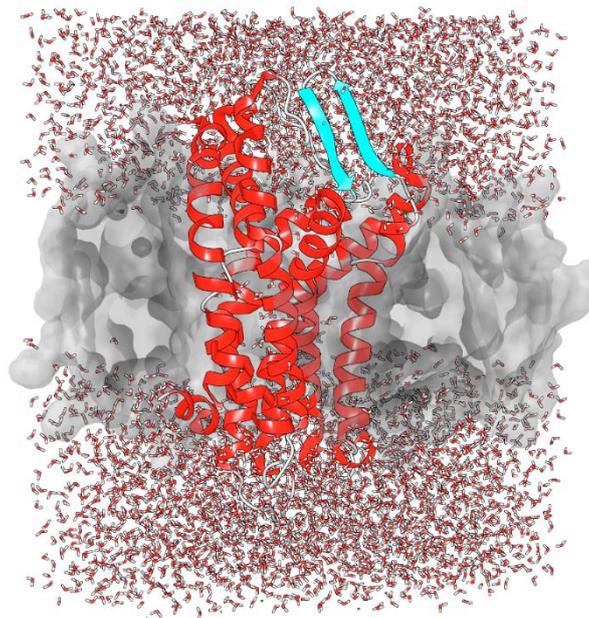


Abb. 4: Schematische Darstellung des TP in der Zellmembran. Dargestellt im Querschnitt. TP (Mitte) umgeben von Lipidmembran (transparente molekulare Oberfläche). Oben extrazellulärer bzw. unten intrazellulärer Bereich mit Wassermolekülen.<sup>5</sup>

<sup>5</sup> erstellt von Alexander Weber, AG Dr. Thomas Lemcke, Institut für Pharmazie, Universität Hamburg, Bachelorarbeit 2014

### 1.1.3 Signaltransduktion

Durch Bindung eines Liganden, so beispielsweise 8-iso-PGF<sub>2α</sub> oder TxA<sub>2</sub>, an den TP kommt es zur Aktivierung der membranständigen Guanosintriphosphat (GTP)-bindenden Proteine (G-Proteine). Die G-Proteine setzen sich aus drei Untereinheiten zusammen: α, β und γ. Je nach α-Untereinheit werden 4 Klassen unterschieden: Gα<sub>q</sub>-, Gα<sub>s</sub>-, Gα<sub>i</sub>- und Gα<sub>12/13</sub>-Proteine. Aktivierte G-Proteine modulieren die nachgeschaltete Signaltransduktion und beeinflussen die Konzentration verschiedener *second messenger* [17]. Aktiviert der TP die Gα<sub>q</sub>-Untereinheit, folgt die Stimulation der Phospholipase C (PLC) (Abb. 5) [33] [34] [35]. Phospholipase C katalysiert die Synthese von Diacylglycerol (DG) und Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>). DG wiederum aktiviert die Proteinkinase C (PKC) und IP<sub>3</sub> bewirkt die Freisetzung von Calcium-Ionen (Ca<sup>2+</sup>). Daraus resultieren intrazellulär erhöhte Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen, wodurch u. a. die Kontraktion von glatten Gefäßmuskelzellen ausgelöst werden kann. Die Gα<sub>s</sub>-Untereinheit aktiviert die Adenylatcyclase (AC), welche die Bildung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP) katalysiert [36]. Durch erhöhte cAMP-Konzentrationen kommt es nachfolgend zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) und damit des Transkriptionsfaktors CREB (*cAMP-response element binding protein*) sowie zur Bildung von Epacs (*exchange proteins directly activated by cAMP*) (Abb. 5). Die aktivierte Gα<sub>i</sub>-Untereinheit dagegen inhibiert die Aktivität der AC (Abb. 5) [36]. Die dazugehörige βγ-Untereinheit führt über Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) zur Stimulation der Proteinkinase B (Akt) [37]. Hierbei wird PIP<sub>2</sub> zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>) phosphoryliert. Außerdem kommt es zur Aktivierung von ERKs (*extracellular signal-regulated kinases*) [38]. Des Weiteren werden durch die aktivierte Gα<sub>12/13</sub>-Untereinheit sogenannte kleine G-Proteine der *Ras homologue (Rho)*-Familie aktiviert (Abb. 5) [38] [39] [40]. Insgesamt repräsentieren Signalkaskaden, die über Gq-Proteine induziert werden, die hauptsächliche Signaltransduktion des TP, wobei Ca<sup>2+</sup> einen wichtigen Botenstoff darstellt [22] [35].

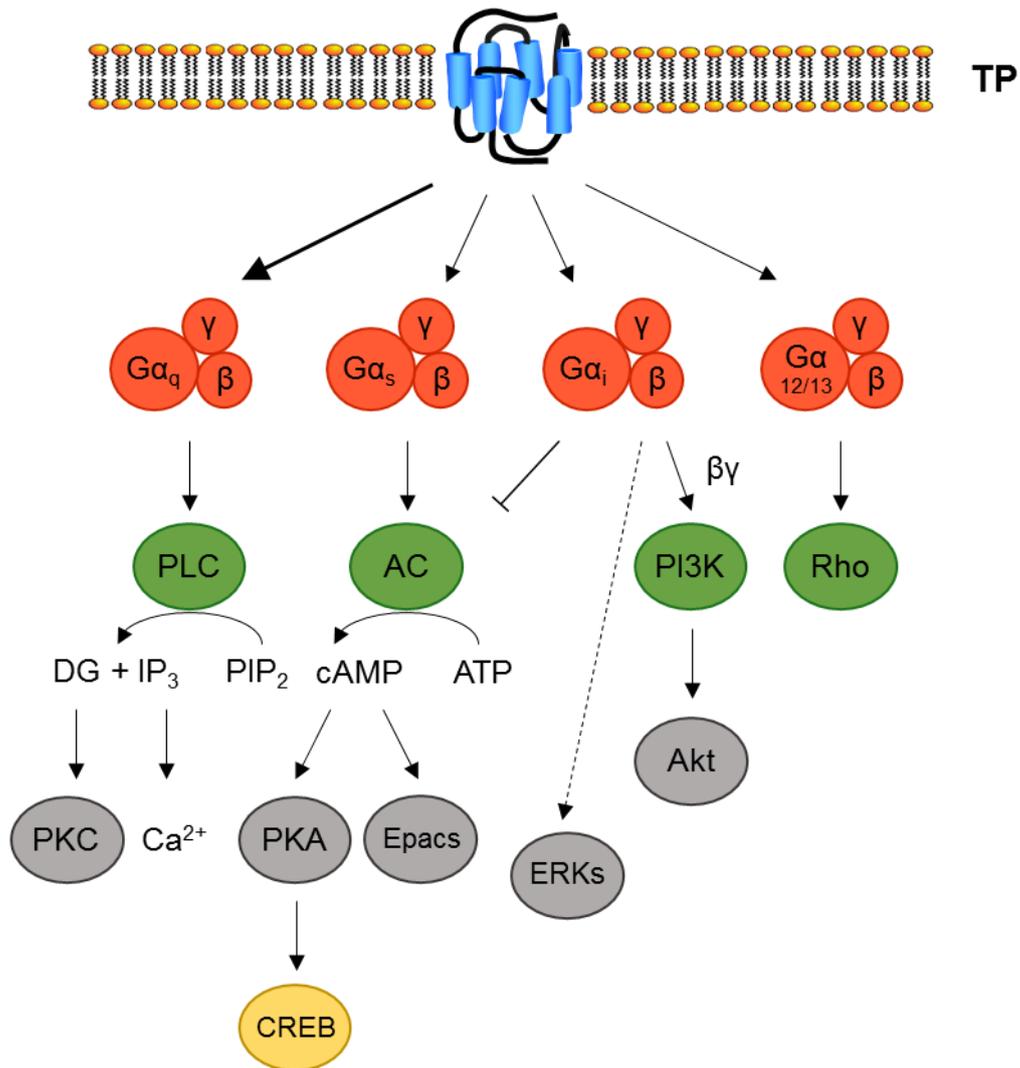


Abb. 5: Signaltransduktion des TP. Nach Bindung eines Liganden erfolgt die Aktivierung der membranständigen heterotrimeren Guanosintriphosphat (GTP)-bindende Proteine (G-Proteine). Diese setzen sich aus drei Untereinheiten zusammen:  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ . Je nach  $\alpha$ -Untereinheit werden 4 Klassen unterschieden:  $G\alpha_q$ -Proteine (Phospholipase C-gekoppelte G-Proteine),  $G\alpha_s$ -Proteine (stimulierende G-Proteine; Aktivierung der Adenylatcyclase),  $G\alpha_i$ -Proteine (inhibitorische G-Proteine; Hemmung der Adenylatcyclase) und  $G\alpha_{12/13}$ -Proteine (Aktivierung von kleinen G-Proteinen der *Rho*-Familie). Die G-Protein-Untereinheiten aktivieren verschiedene Enzymsysteme, sog. *second messenger* (z. B.  $IP_3$ , cAMP) werden gebildet, die wiederum weitere Enzymsysteme aktivieren. TP *thromboxane prostanoid receptor*;  $G\alpha_x$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  G-Protein-Untereinheiten; PLC Phospholipase C; AC Adenylatcyclase; PI3K Phosphoinositid-3-Kinase; *Rho* kleine G-Proteine der *Ras homologue*-Familie; DG Diacylglycerol;  $IP_3$  Inositoltrisphosphat;  $PIP_2$  Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; cAMP cyclisches Adenosinmonophosphat; ATP Adenosintriphosphat; Akt Proteinkinase B; PKC Proteinkinase C;  $Ca^{2+}$  Calcium-Ion; PKA Proteinkinase A; Epacs *exchange proteins directly activated by cAMP*; ERKs *extracellular signal-regulated kinases*; CREB *cAMP-response element binding protein*.<sup>6</sup>

<sup>6</sup> modifiziert nach [35]

## 1.1.4 Biologische Aktivität

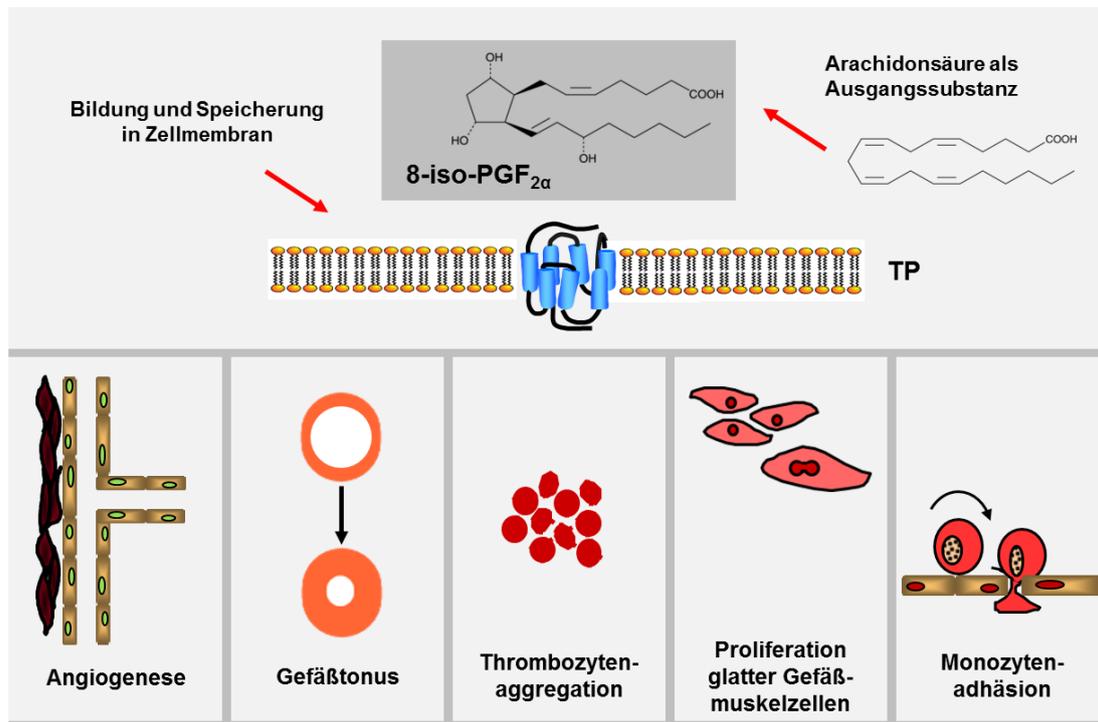


Abb. 6: Biologische Aktivität von 8-iso-PGF<sub>2α</sub>. Die Inhibition der Angiogenese, Vasokonstriktion, Beeinflussung der Thrombozytenaggregation, Proliferation glatter Gefäßmuskulzellen und Monozytenadhäsion sind Pathomechanismen der Isoprostan-Wirkung. 8-iso-PGF<sub>2α</sub> 8-iso-Prostaglandin F<sub>2α</sub>; TP *thromboxane prostanoid receptor*.<sup>7</sup>

Die in Kap. 1.1.3 und Abb. 5 dargestellte Signaltransduktion des TP vermittelt verschiedene biologische Funktionen der TP-Liganden. 8-iso-PGF<sub>2α</sub> hemmt beispielsweise die *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)-induzierte Migration und Kapillarröhrenbildung von Endothelzellen, sowie die Angiogenese *in vitro* und *in vivo* [25]. Darüber hinaus besitzt 8-iso-PGF<sub>2α</sub> vasokonstriktorische Eigenschaften (Abb. 6). Diese sind in bestimmten Gefäßbetten besonders ausgeprägt, so u. a. in Aorten- und Pulmonalarterien-Ringen von Ratten [41]. An isolierten Koronararterien von Schweinen und Rindern erwies sich 8-iso-PGF<sub>2α</sub> ebenso als potenter Vasokonstriktor [42]. Die vasokonstriktorischen Eigenschaften von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> konnten auch an humanen Präparaten der *Arteria mammaria interna* beobachtet werden, woraus möglicherweise eine relevante Beeinflussung des humanen Gefäßtonus resultiert [43]. Außerdem moduliert 8-iso-PGF<sub>2α</sub> die Thrombozytenaggregation und führt zur Proliferation glatter Gefäßmuskul- sowie Endothelzellen (Abb. 6) [23] [7] [44]. Des Weiteren triggert 8-iso-PGF<sub>2α</sub> die Adhäsion von Monozyten und neutrophilen Granulozyten an Endothelzellen und deren transendotheliale Infiltration (Abb. 6) [45] [46]. Die beschriebenen Effekte spielen eine

<sup>7</sup> modifiziert nach [7]

entscheidende Rolle in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen: Die Bildung arteriosklerotischer Plaques wird begünstigt, das Risiko für akute Ereignisse, z. B. eines Myokardinfarktes, steigt. Erhöhte 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentrationen können somit zur Pathogenese arteriosklerotischer Erkrankungen beitragen [47] [48].

### 1.1.5 TP-Tiermodell

Zur Untersuchung der *in vivo*-Funktionen des TP stehen TP-KO-Mäuse zur Verfügung [49] [50]. Ein bekannter Phänotyp der TP-KO-Mäuse ist die verlängerte Blutungszeit am kupierten Schwanz [49]. Grund dafür ist die in TP-KO-Mäusen ausbleibende TxA<sub>2</sub>-medierte Thrombozytenaggregation über den TP [49]. Weiterhin trat in TP-KO-Mäusen nach Bolusgabe der TP-Agonisten 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und U-46619 im Gegensatz zu Wildtyp (WT)-Geschwistern keine Veränderung des mittleren arteriellen Blutdruckes (MAP; *mean arterial pressure*) auf [23] [49].

### 1.1.6 Bedeutung für kardiovaskuläre Erkrankungen

#### 1.1.6.1 Kardiovaskuläre Risikofaktoren

Bereits die Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen, z. B. Rauchen, Adipositas, Diabetes mellitus und Hypercholesterinämie, führen zu einer vermehrten endogenen Bildung von Isoprostanen. Die 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentrationen in Plasma und Urin sind bei Rauchern gegenüber Nichtrauchern erhöht [51] [52]. Eine Änderung der Rauchgewohnheiten spiegelt sich zeitnah in der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration und -Ausscheidung wider: Nach zweiwöchiger Abstinenz sinkt diese signifikant ab, steigt bei erneutem Zigarettenkonsum innerhalb einer Woche wieder an [51] [52] [53]. Eine antioxidative Vitamintherapie mit Vitamin C und E bei Rauchern reduziert die Ausscheidung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> [52]. Bei Adipositas liegt ebenfalls eine erhöhte 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Ausscheidung vor [54] [55]. Des Weiteren weisen Patienten mit Diabetes mellitus eine erhöhte 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Ausscheidung auf, welche mit entsprechenden Blutglucose-Werten korreliert und sich bei Vitamin E-Supplementation verringert [56] [57]. Eine Vitamin E-Supplementation reduziert außerdem die 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Exkretion von Patienten mit Hypercholesterinämie, die im Vergleich zu Gesunden eine erhöhte 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration im Urin zeigen, welche mit entsprechenden Gesamtcholesterin-Werten korreliert [58] [59].

### 1.1.6.2 Arteriosklerose

Über die in Abb. 6 dargestellten Pathomechanismen kann 8-iso-PGF<sub>2α</sub> TP-vermittelt zu arteriosklerotischen Veränderungen beitragen. Im Vergleich zu nicht-arteriosklerotischen Gefäßen treten in humanen arteriosklerotischen Gefäßen deutlich erhöhte Konzentrationen von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> auf, 8-iso-PGF<sub>2α</sub> konnte histologisch in arteriosklerotischen Plaques nachgewiesen werden [60] [61]. In Apolipoprotein E (ApoE)-Knockout-Mäusen ist 8-iso-PGF<sub>2α</sub> vermehrt nachweisbar [62]. In einem ApoE-TP-Doppelknockout-Mausmodell führte die TP-Defizienz, verglichen mit dem einfachen ApoE-Knockout-Modell, zu reduzierten arteriosklerotischen Läsionen, zeigte demnach einen protektiven Effekt hinsichtlich der Pathogenese einer Arteriosklerose [63].

### 1.1.6.3 Koronare Herzkrankheit

Arteriosklerotische Plaques in den Koronararterien verursachen durch Gefäßverengung und Minderdurchblutung die Koronare Herzkrankheit (KHK). Als Leitsymptom einer manifesten KHK gilt die Angina pectoris, eine anfallsartig auftretende Brustenge bei Belastung. Im Urin von Patienten mit KHK treten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden erhöhte Konzentrationen von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und dem Metaboliten 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> auf [8] [64]. Insbesondere bei Patienten mit KHK, die nicht ausreichend auf eine Plättchenaggregationshemmung mit Acetylsalicylsäure ansprechen, zeigte sich eine erhöhte Isoprostanausscheidung, die positiv mit der residualen Plättchenaktivität korrelierte [65]. Darüber hinaus korrelierte bei diesen Patienten die Isoprostanausscheidung mit der Anzahl der kardiovaskulären Risikofaktoren (Rauchen, Adipositas, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und Hypertonie) [8]. Im Plasma von Patienten mit KHK wurden ebenso erhöhte 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentrationen nachgewiesen [64] [66] [67]. Daraus ergibt sich eine plausible Verknüpfung der translationalen Ergebnisse aus Mausmodell, *ex vivo* und *in vivo*-Studien.

### 1.1.6.4 Myokardinfarkt

Eine anhaltende Ischämie aufgrund hochgradiger Koronarstenose durch arteriosklerotische Plaques und/oder Thrombenbildung löst einen akuten Myokardinfarkt aus. Patienten nach Myokardinfarkt weisen signifikant erhöhte 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentrationen in Plasma und Urin auf [68] [69]. Dieser Anstieg scheint jedoch erst bei anschließender Reperfusion aufzutreten, da im Tiermodell unmittelbar nach induzierter Okklusion einer Koronararterie keine Änderung in der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration festgestellt werden konnte, sondern erst nach Wiederherstellung des Blutflusses [69]. In humanen Urinproben zeichnet sich folgende Kinetik

ab: Unmittelbar nach operativer Reperfusion steigen die 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentrationen signifikant an und fallen postoperativ innerhalb 24 Stunden wieder auf präoperative Ausgangslevel ab [69] [70].

### 1.1.6.5 Herzinsuffizienz

Ein Myokardinfarkt kann zur Herzinsuffizienz führen, einer funktionellen Störung mit verminderter Pumpfunktion und folglich unzureichender Sauerstoffversorgung des großen Blutkreislaufes. Die Stadieneinteilung erfolgt anhand der NYHA (*New York Heart Association*)-Klassifikation in vier Stadien I - IV, wobei Stadium IV den höchsten Schweregrad darstellt. Im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden weisen Patienten mit Herzinsuffizienz signifikant höhere Konzentrationen an 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in Plasma und Urin auf, ebenso im Vergleich zu Patienten mit KHK [64] [71] [72]. Außerdem zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration und den NYHA-Stadien I - IV [64]. Zwischen der linksventrikulären Ejektionsfraktion und der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration wurde eine negative Korrelation beobachtet [64]. Erhöhte 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentrationen konnten auch in perikardialer Flüssigkeit von Patienten mit Herzinsuffizienz nachgewiesen werden [73].

### 1.1.6.6 Pulmonale Arterielle Hypertonie

Eine Rechtsherzinsuffizienz stellt eine Unterform der Herzinsuffizienz dar, welche durch Pulmonale Arterielle Hypertonie (PAH) verursacht werden kann. Einer PAH liegt die Erhöhung des Gefäßwiderstandes und daraus resultierend der Anstieg des Blutdruckes im Lungenkreislauf zugrunde. Auch hier spielt oxidativer Stress eine Rolle in der Pathogenese. PAH kann durch verschiedene Ursachen hervorgerufen werden, die aktuelle Klassifikation beruht auf dem 5. *World Symposium on Pulmonary Hypertension 2013 in Nice, France*, und unterscheidet zwischen idiopathischer PAH (iPAH; primäre PAH, keine Komplikation einer anderen Grunderkrankung), hereditärer PAH, durch Medikamente oder Toxine verursachter PAH, mit Bindegewebserkrankungen, portaler Hypertension oder angeborenen Herzfehlern assoziierter PAH, Pulmonaler Venookklusiver Erkrankung (PVO *pulmonary veno-occlusive disease*) sowie sekundärer PH (Pulmonale Hypertonie) infolge Linksherzerkrankungen, infolge Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie, Chronisch Thrombo-embolischer PH (CTEPH) sowie PH mit unklarem oder multifaktoriellem Mechanismus [74] [75]. Die 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentrationen im Urin von Patienten mit PAH waren im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden signifikant erhöht [76]. Hinsichtlich pulmonaler Vasoreaktivität nach Stickstoffmonoxid (NO)-Inhalation (NO als Vasodilatator) zeigte sich eine negative Korrelation mit der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration, d.h. je höher die 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration, desto geringer das Ansprechen auf NO [76]. Neben der diagnostischen Bedeutung, ist 8-iso-PGF<sub>2α</sub> im Urin

ein unabhängiger Biomarker für die Gesamtmortalität bei Patienten mit PAH [77]. Dies gilt auch für die 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration im Plasma, hier zeigte sich außerdem eine positive bzw. negative Korrelation mit dem mittleren rechtsatrialen Druck bzw. der 6-Minuten-Gehstrecke [78]. Außerdem konnte im Verlauf folgende Entwicklung der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentrationen beobachtet werden: Bei Patienten mit erhöhter 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration und verkürztem Überleben stieg die 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration weiter an, wohingegen bei Patienten mit niedrigerer 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration und längerem Überleben eine abfallende Tendenz ersichtlich war [78]. Insgesamt stellt 8-iso-PGF<sub>2α</sub> erstmalig einen Biomarker für PAH mit diagnostischer sowie prognostischer Bedeutung dar. 8-iso-PGF<sub>2α</sub> spielt jedoch genauso eine Rolle in der Pathogenese der Erkrankung. *Ex vivo* induziert 8-iso-PGF<sub>2α</sub> die Vasokonstriktion explantierter Pulmonalarterien-Ringe aus Ratten, *in vivo* führt die intravenöse Injektion von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> zur Erhöhung des mittleren pulmonalarteriellen Druckes in Ratten [41] [79]. Demnach ist 8-iso-PGF<sub>2α</sub> ein potentieller Mediator zur Erhöhung des Gefäßwiderstandes in der Pulmonalarterie. Unter hypoxischen Bedingungen werden vermehrt reaktive Sauerstoffspezies gebildet [80] [81] [82] [83]. Entsprechend wurden in einem experimentellen Hypoxie-Modell zur Induktion einer PAH bei neugeborenen Ratten erhöhte 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentrationen in der Lunge festgestellt, woraus eine TP-vermittelte Erhöhung von Endothelin-1 resultierte, einem weiteren vasokonstriktorischen Triggerfaktor der Erkrankung [84].

Zusammengefasst ist 8-iso-PGF<sub>2α</sub> ein Biomarker und Mediator bei Arteriosklerose, KHK, Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz und PAH [85]. 8-iso-PGF<sub>2α</sub> selbst besitzt biologische Aktivität, die pathophysiologische Prozesse kardiovaskulärer Erkrankungen begünstigt.

## 1.2 Sphingosin-1-phosphat

### 1.2.1 Metabolismus

#### 1.2.1.1 Biosynthese

Sphingosin-1-phosphat (S1P) ist ein Sphingolipid. Sphingolipide zählen neben Glycerophospholipiden zu den Phospholipiden und damit zu den Hauptbestandteilen der Zellmembran. Die Grundstruktur Sphingosin lässt sich bereits durch die Benennung dieser Lipidklasse erahnen. Anders als bei Glycerin, einem gesättigten dreiwertigen Alkohol und Grundgerüst der Glycerophospholipide, handelt es sich bei Sphingosin um einen ungesättigten zweiwertigen Aminoalkohol. S1P wiederum ist ein Phosphorsäureester am C<sub>1</sub> des Sphingosins. Sphingomyeline dienen als Ausgangsstoff in der Biosynthese von S1P. Hier liegt

das Sphingosin über eine Esterbindung am C<sub>1</sub> an Phosphocholin und über eine Amidbindung am C<sub>2</sub> an eine Fettsäure gebunden vor. Durch das Enzym Sphingomyelinase entsteht unter Abspaltung des Phosphocholinrestes ein Ceramid (Abb. 7) [86]. Alternativ können Ceramide auch *de novo* synthetisiert werden [87] [88]. Anschließend erfolgt durch Ceramidase-Aktivität die Hydrolyse der Amidbindung und somit die Abspaltung des Fettsäurerestes, z. B. Stearinsäure (18:0) (Abb. 7) [89] [90]. Im letzten Schritt wird das dabei entstandene Sphingosin durch Sphingosinkinasen (SphK) zum S1P phosphoryliert (Abb. 7) [91]. Bei den Sphingosinkinasen unterscheidet man zwei Isoformen: SphK1 und SphK2 [92] [93] [94] [95].

S1P ist ein physiologischer Bestandteil des Blutserums und -plasmas. Erste Messungen im Blut von acht gesunden Probanden ergaben durchschnittliche Konzentrationen von  $0,484 \pm 0,082 \mu\text{mol/L}$  im Serum bzw.  $0,191 \pm 0,079 \mu\text{mol/L}$  im Plasma [96] [97]. Andere Messungen ergaben unabhängig voneinander  $0,663 \pm 0,117 \mu\text{mol/L}$  im Serum (n=11) und  $0,350 \mu\text{mol/L}$  (Spannweite:  $0,217 - 0,708 \mu\text{mol/L}$ ) im Plasma (n=85) [98] [99]. Der Unterschied zwischen der Serum- und Plasmakonzentration kann durch die S1P-Ausschüttung aktivierter Thrombozyten während der Blutgerinnung bei Serumgewinnung erklärt werden. Bei Plasmagewinnung bleibt dieser Effekt aus, da hier den Entnahmesystemen Antikoagulantien zugesetzt sind [97]. Thrombozyten stellen somit eine mögliche Quelle für S1P dar [97]. Dies wird zudem durch den Vergleich der S1P-Konzentrationen in Thrombozyten-reichem (PRP *platelet-rich plasma*) und Thrombozyten-armem Plasma (PPP *platelet-poor plasma*) bestätigt:  $1,03 \pm 0,14 \mu\text{mol/L}$  vs.  $0,55 \pm 0,13 \mu\text{mol/L}$  (PRP vs. PPP; n=10) [100]. S1P wird in Thrombozyten vorwiegend durch die SphK2 synthetisiert [101] [102]. Die Serum-Konzentration von S1P korreliert positiv mit der Thrombozytenzahl [103]. Darüber hinaus moduliert S1P nach Freisetzung aus Thrombozyten die Plättchenaggregation [102] [104]. Neben Thrombozyten tragen auch Erythrozyten zur S1P-Konzentration im Blut bei [105] [106]. Die Plasma-Konzentration von S1P zeigt eine positive Korrelation mit der Erythrozytenzahl [107]. Ferner stellen Endothelzellen eine nicht-hämatopoetische Quelle für S1P dar [108]. Im Blut liegt S1P zu 40% an das Plasmaeiweiß Albumin und zu 60% an das Lipoprotein HDL (*high-density lipoprotein*) gebunden vor [109] [110]. Innerhalb der HDL-Partikel bindet S1P an Apolipoprotein M (ApoM) [111]. Die S1P-Konzentration korreliert wiederum positiv mit der HDL-Cholesterin-Konzentration im Serum [112].

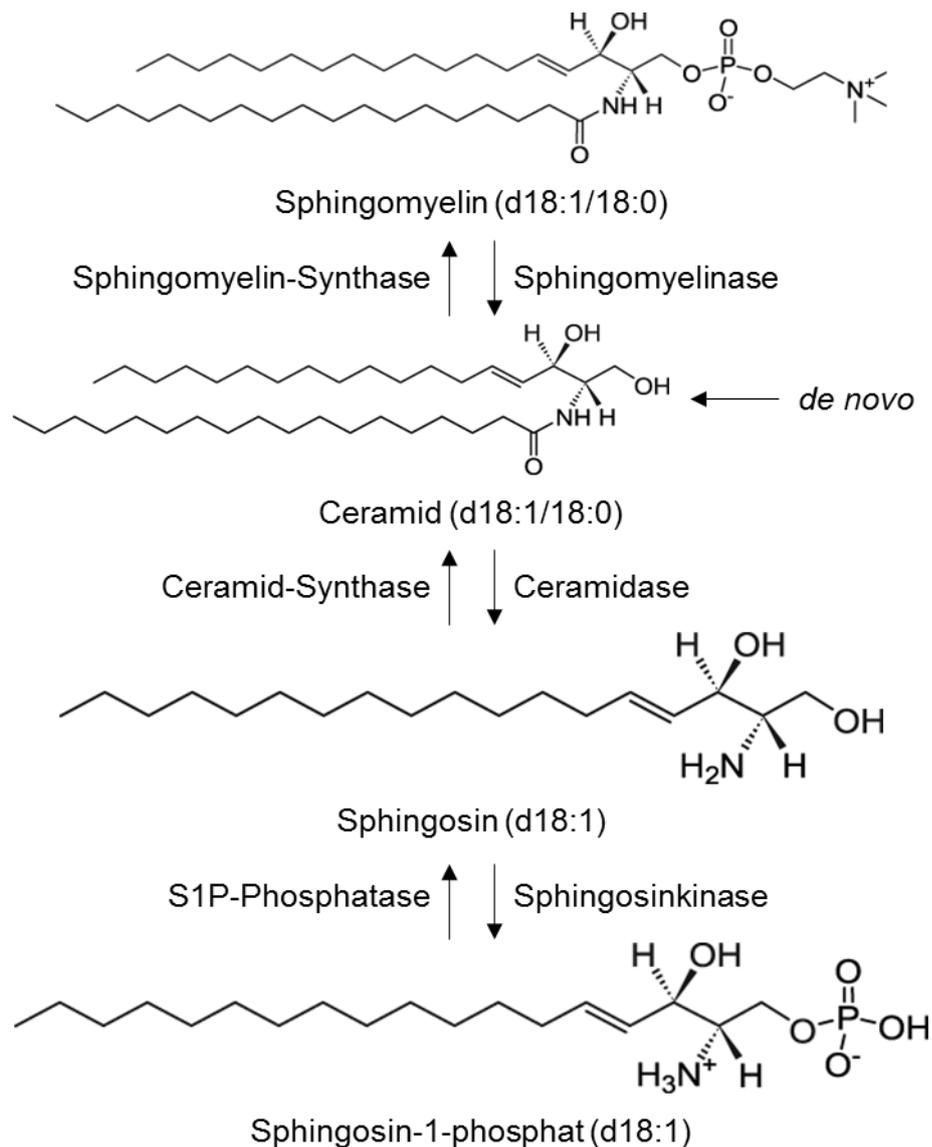


Abb. 7: Biosynthese und Struktur von S1P. Aus Sphingomyelin wird durch die Sphingomyelinase die Abspaltung des Phosphocholinrestes zum Ceramid (alternativ *de novo*-Synthese), durch die Ceramidase die Abspaltung des Acylrestes (hier z. B. 18:0) zum Sphingosin und durch die Sphingosinkinase die Phosphorylierung zum Sphingosin-1-phosphat katalysiert. S1P Sphingosin-1-phosphat.<sup>8</sup>

### 1.2.1.2 Katabolismus

Der S1P-Plasmahalbwertszeit von 15 Minuten liegt eine schnelle Clearance durch abbauende Enzyme zugrunde [108]. Der daraus resultierende schnelle Umsatz von S1P setzt adäquate Quellen zur Aufrechterhaltung der S1P-Konzentration voraus, was durch Thrombozyten, Erythrozyten und Endothelzellen gewährleistet wird (Kap. 1.2.1.1) [114]. S1P kann durch zwei

<sup>8</sup> modifiziert nach [113]

verschiedene Enzyme abgebaut werden: auf der einen Seite durch die S1P-Phosphatase, auf der anderen Seite durch die S1P-Lyase. S1P-Phosphatasen stellen die Gegenspieler der Sphingosinkinasen dar und dephosphorylieren S1P reversibel zu Sphingosin (Abb. 7, Abb. 8) [115]. Analog zu den Sphingosinkinasen, unterscheidet man bei den S1P-Phosphatasen zwei Isoformen: SPP1 und SPP2 [116] [117] [118]. Das entstandene Sphingosin kann bei Aktivität der Ceramid-Synthase, dem Gegenspieler der Ceramidase, zum Ceramid acyliert werden (Abb. 7) [119] [120]. Anschließend entsteht unter Anwesenheit eines Phosphatidylcholins und Katalyse der Sphingomyelin-Synthase, als Gegenspieler der Sphingomyelinase, wieder die Ausgangssubstanz Sphingomyelin (Abb. 7) [121]. Insgesamt aktivieren S1P-Phosphatasen den Anabolismus von Ceramiden und Sphingomyelinen. S1P-Lyasen dagegen bewirken eine irreversible Molekülsplaltung zwischen C<sub>2</sub> und C<sub>3</sub>, sodass aus dem Edukt S1P die Produkte 2-Hexadecenal und Phosphoethanolamin resultieren (Abb. 8) [122] [123] [124].

Thrombozyten weisen keine S1P-Lyase-Aktivität auf, sodass S1P in Thrombozyten akkumuliert [125]. Dieser Effekt wird durch eine erhöhte Sphingosin-Kinase-Aktivität verstärkt [126]. Erythrozyten besitzen weder S1P-Lyase- noch S1P-Phosphatase-Aktivität, sodass in Erythrozyten ebenfalls hohe S1P-Konzentrationen vorliegen, dies trotz schwächerer Sphingosin-Kinase-Aktivität als in Thrombozyten [127].

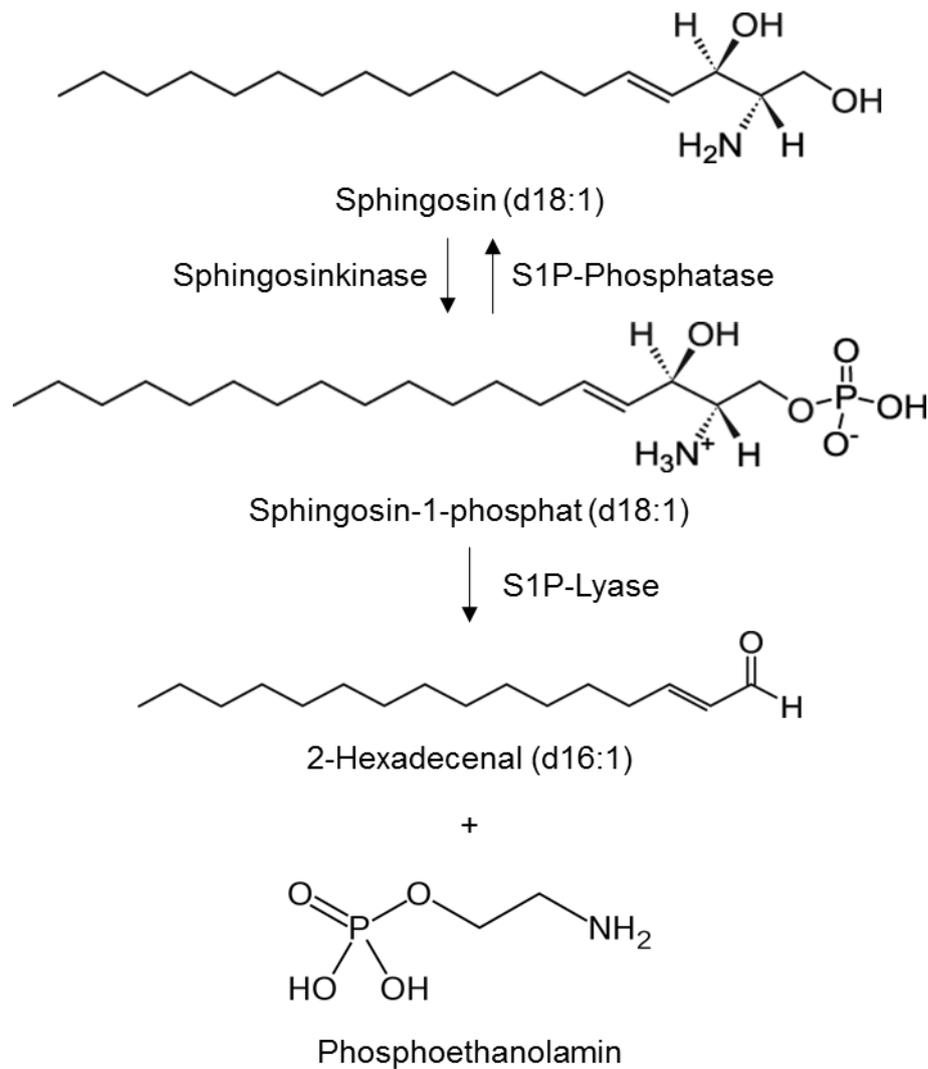


Abb. 8: Katabolismus von S1P. Die S1P-Phosphatase katalysiert die Dephosphorylierung zum Sphingosin, die S1P-Lyase die irreversible Spaltung von S1P in 2-Hexadecenal und Phosphoethanolamin. S1P Sphingosin-1-phosphat.<sup>9</sup>

## 1.2.2 Zellulärer und molekularer Wirkmechanismus

S1P kann an 5 verschiedene GPCRs der EDG (*endothelial differentiation gene*)-Familie binden und diese aktivieren [128] [129] [130] [131]. Jedem dieser Proteine wurde eine zusätzliche Bezeichnung als S1P-Rezeptor (S1PR) zugeteilt: EDG-1/S1PR<sub>1</sub>, EDG-3/S1PR<sub>3</sub>, EDG-5/S1PR<sub>2</sub>, EDG-6/S1PR<sub>4</sub> und EDG-8/S1PR<sub>5</sub> [132] [133] [134] [135]. Endothelzellen exprimieren S1PR<sub>1</sub> und S1PR<sub>3</sub>, glatte Gefäßmuskelzellen S1PR<sub>1</sub>, S1PR<sub>2</sub> und S1PR<sub>3</sub> [136]. S1PR<sub>4</sub> und S1PR<sub>5</sub> hingegen werden nicht in Blutgefäßen exprimiert [136]. Damit S1P als Agonist an den S1PRs wirken kann, sorgen ABCC1- und ABCC4-Transporter (Subfamilie C der *ATP-binding cassette transporter*) für den Auswärtstransport aus der Zelle in den

<sup>9</sup> modifiziert nach [113]

Extrazellulärraum [137] [100]. Neben dieser auto- sowie parakrinen Wirkung auf S1PRs, fungiert S1P intrazellulär zudem als *second messenger* [138] [139]. Dabei kommt es intrazellulär zu einer G-Protein- und Inositoltrisphosphat-unabhängigen Calcium-Freisetzung [140] [141] [[142].

### 1.2.3 Signaltransduktion

S1PRs koppeln an  $G\alpha_q$ -,  $G\alpha_i$ - und  $G\alpha_{12/13}$ -, jedoch nicht an  $G\alpha_s$ -Proteine [143]. Dabei aktiviert S1PR<sub>1</sub> ausschließlich  $G\alpha_i$ -Proteine [144] [145]. S1PR<sub>2</sub> und S1PR<sub>3</sub> aktivieren  $G\alpha_q$ -,  $G\alpha_i$ - sowie  $G\alpha_{12/13}$ -, S1PR<sub>4</sub> und S1PR<sub>5</sub> vorrangig  $G\alpha_i$ - sowie  $G\alpha_{12/13}$ -Proteine [143] [145] [146] [147] [148] [149]. Die aktivierte  $G\alpha_q$ -Untereinheit stimuliert die PLC zur Bildung von DG und IP<sub>3</sub> aus PIP<sub>2</sub>, was im Falle des DG zur Aktivierung der PKC bzw. im Falle des IP<sub>3</sub> zur Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> führt (Abb. 9) [147] [150] [151]. Weiterhin kommt es durch PKC und Ca<sup>2+</sup> zur Aktivierung der AC (Abb. 9) [143] [152]. Die AC katalysiert die Synthese von cAMP (Abb. 9). Die aktivierte  $G\alpha_i$ -Untereinheit dagegen inhibiert die Aktivität der AC (Abb. 9) [146] [152] [153] [154]. Die dazugehörige  $\beta\gamma$ -Untereinheit führt zur Aktivierung der PLC, wodurch diese Kaskade in die der  $G\alpha_q$ -Untereinheit einmündet (Abb. 9) [149][153]. Außerdem kommt es zur Aktivierung von ERKs und über Aktivierung der PI3K nachfolgend zur Stimulation von Akt (Abb. 9) [155] [156] [157] [158] [159]. Ferner werden kleine G-Proteine der *Rho*-Familie durch die  $G\alpha_{12/13}$ -Untereinheit aktiviert (Abb. 9) [160] [161] [162]. Sowohl unterschiedliche Expressionsmuster der S1PRs in verschiedenen Zelltypen und Geweben als auch die Möglichkeit der Aktivierung unterschiedlicher G-Proteine und nachgeschalteter Signalkaskaden führen zu unterschiedlichen Effekten: S1P bewirkt S1PR<sub>1</sub>-vermittelt, hauptsächlich  $G\alpha_i$ -gekoppelt, die Aktivierung der PI3K, Akt und ERKs, S1PR<sub>2</sub>-vermittelt, insbesondere  $G\alpha_{12/13}$ -gekoppelt, die Aktivierung von *Rho*-GTPasen sowie S1PR<sub>3</sub>-vermittelt, vorwiegend  $G\alpha_q$ -gekoppelt, die Aktivierung der PLC und Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> [143] [149].

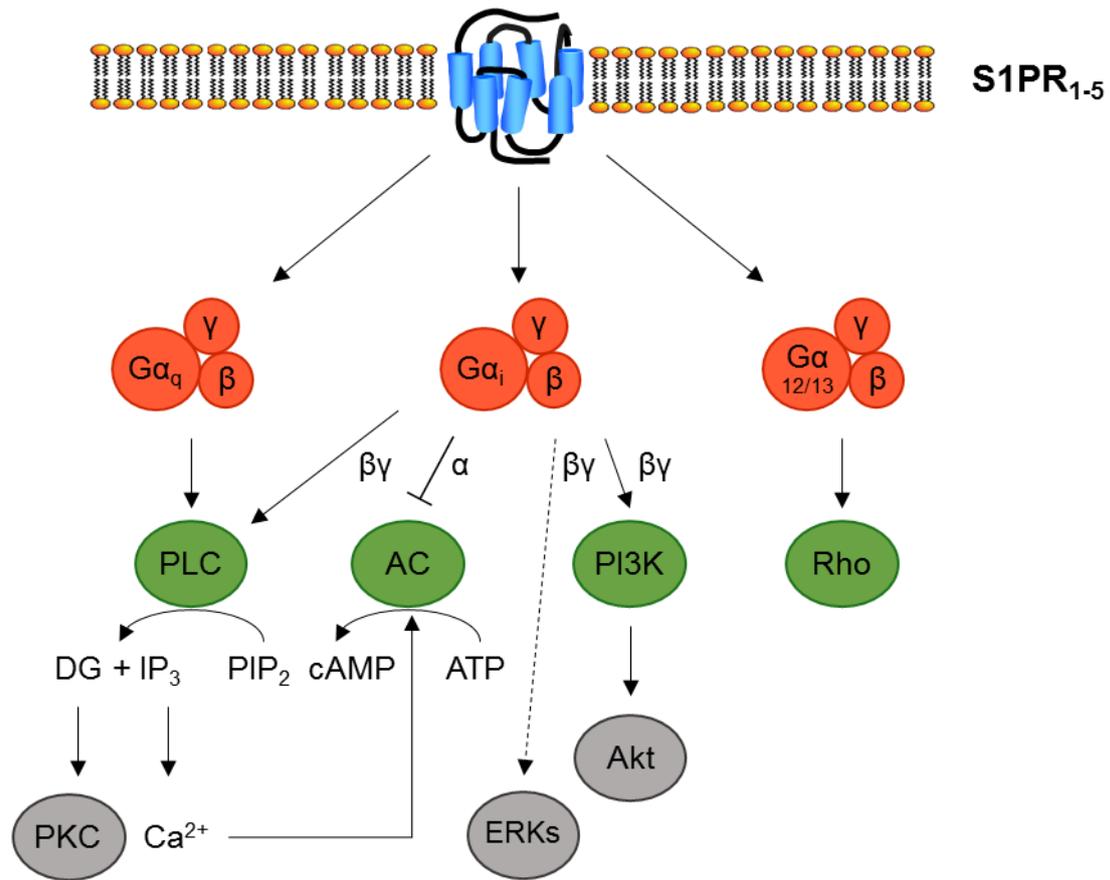


Abb. 9: Signaltransduktion der S1PRs. Nach Bindung von S1P erfolgt die Aktivierung der membranständigen heterotrimeren G-Proteine G<sub>αq</sub>, G<sub>αi</sub> oder G<sub>α12/13</sub> (vgl. Abb. 5). Diese setzen sich aus drei Untereinheiten zusammen: α, β und γ. G<sub>αq</sub>-Proteine sind PLC-gekoppelte G-Proteine, G<sub>αi</sub>-Proteine sind inhibitorische G-Proteine (Hemmung der AC) und G<sub>α12/13</sub>-Proteine aktivieren kleine G-Proteine der *Rho*-Familie. Durch G-Protein-Untereinheiten werden verschiedene Enzymsysteme aktiviert und *second messenger* (z. B. IP<sub>3</sub>, cAMP) werden gebildet, die wiederum weitere Enzymsysteme aktivieren. Durch PKC und Ca<sup>2+</sup> bzw. durch G<sub>αi</sub>-Untereinheit kommt es zur Aktivierung bzw. Hemmung der AC. S1PR<sub>1-5</sub> S1P-Rezeptoren 1-5; G-Proteine Guanosintriphosphat (GTP)-bindende Proteine; G<sub>αx</sub>, β, γ G-Protein-Untereinheiten; PLC Phospholipase C; AC Adenylatcyclase; PI3K Phosphoinositid-3-Kinase; *Rho* kleine G-Proteine der *Ras homologue*-Familie; DG Diacylglycerol; IP<sub>3</sub> Inositoltrisphosphat; PIP<sub>2</sub> Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; cAMP cyclisches Adenosinmonophosphat; ATP Adenosintriphosphat; Akt Proteinkinase B; PKC Proteinkinase C; Ca<sup>2+</sup> Calcium-Ion; ERKs *extracellular signal-regulated kinases*.<sup>10</sup>

<sup>10</sup> modifiziert nach [143] [163]

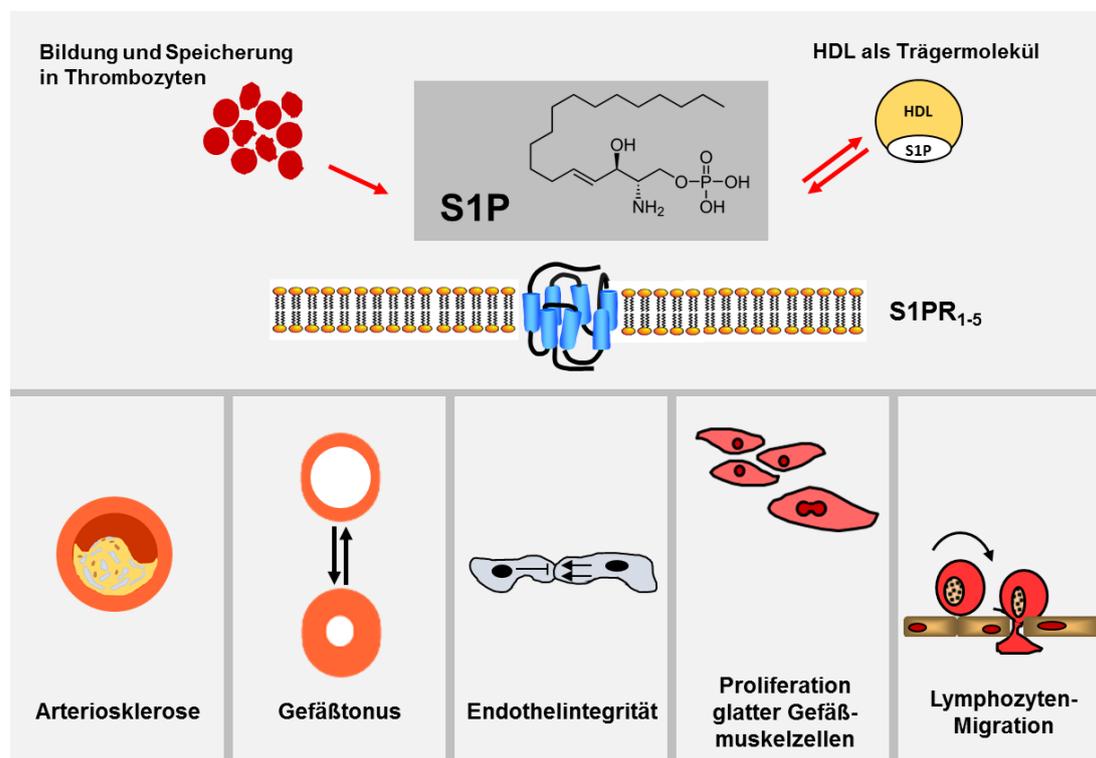


Abb. 10: Biologische Aktivität von S1P. Die Beeinflussung der Pathogenese von Arteriosklerose, des Gefäßtonus sowie der Endothelintegrität, Proliferation glatter Gefäßmuskulzellen und Lymphozyten-Migration sind Mechanismen der S1P-Wirkung. S1P Sphingosin-1-phosphat; S1PR<sub>1-5</sub> S1P-Rezeptoren 1-5; HDL *high-density lipoprotein*.

### 1.2.4 Biologische Aktivität

Das in Thrombozyten gebildete und gespeicherte sowie von HDL transportierte S1P aktiviert die S1P-Rezeptoren S1PR<sub>1-5</sub> diverser Zelltypen. Hinsichtlich der Arteriosklerose weist S1P sowohl pro- als auch antiarteriosklerotische Eigenschaften auf [164] (Abb. 10). Auf der einen Seite wirkt das S1P-Analogon FTY720 (Fingolimod, Gilenya®) protektiv in murinen Arteriosklerose-Modellen mit *low-density lipoprotein* (LDL)-Rezeptor- und ApoE-Knockout-Mäusen [165] [166]. Dem zugrunde liegt möglicherweise eine erhöhte Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und eine dadurch vermehrte NO-Bildung [167]. Andererseits verstärkt S1P proinflammatorische Vorgänge in Blutgefäßen, u. a. die Expression des Adhäsionsmoleküls *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) auf Endothelzellen [168] [169] [170]. Im murinen Hinterlauf-Ischämie-Modell induziert S1P die post-ischämische Angiogenese und Wiederherstellung des Blutflusses [171]. Neben der Bedeutung des S1PR<sub>1</sub> für die Angiogenese weist S1P hinsichtlich des Gefäßtonus sowohl vasokonstriktorische als auch vasodilatatorische Eigenschaften auf [172] [173] [174] [175] (Abb. 10). In *ex vivo*-

Untersuchungen verursacht S1P die Konstriktion intrapulmonaler Arterien aus Ratten und von Pulmonalarterien aus Schweinen, wobei mit Phenylephrin vorkonstringierte thorakale Aorten aus Ratten und Schweinen unter S1P-Zugabe dilatieren [167] [176] [177]. Die gegensätzlichen Effekte hängen von S1P-Herkunft, -Konzentration, Rezeptorsubtyp-Expressionsmuster und G-Protein-Kopplung in vaskulären Zellen ab [164] [175]. Des Weiteren trägt S1P zur Endothelintegrität bei [178] [179] (Abb. 10). In diesem Zusammenhang konnte S1P als der entscheidende Mediator zur Aufrechterhaltung der Gefäßbarriere durch Thrombozyten identifiziert werden [180]. Die synonyme Bezeichnung der S1P-Rezeptoren als EDG-Rezeptoren impliziert bereits die proliferative Wirkung von S1P auf Endothelzellen [178] [181] [182]. Aus Aktivierung dieser Rezeptoren durch S1P resultiert zudem die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen [183] [184] (Abb. 10). Nach Ligation der *Arteria carotis* unterschieden sich S1PR<sub>2</sub>-Knockout-Mäuse durch ausgeprägte Neointima-Bildung und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen von entsprechenden Wildtyp-Geschwistern, wohingegen S1PR<sub>3</sub>-Knockout-Mäuse im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Geschwistern keine Neointima-Bildung und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen nach Denudation der *Arteria femoralis* aufwiesen [185] [186]. S1PR<sub>2</sub> bzw. S1PR<sub>3</sub> inhibiert bzw. induziert die Neointima-Bildung und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen in Gefäßverletzungsmodellen. Diese gegensätzlichen Beobachtungen hängen vom Expressionsmuster der jeweiligen S1PRs in den entsprechenden Arterien und der Kopplung an verschiedene G-Proteine ab [164] [186]. Ferner baut sich zwischen Gewebe (nanomolare S1P-Konzentration) und Blut (mikromolare S1P-Konzentration) ein Gradient auf, infolgedessen S1PR<sub>1</sub>-exprimierende Lymphozyten aus primären und sekundären Lymphorganen Richtung Blut und Lymphe migrieren [187] [188] [189] (Abb. 10). FTY720 wiederum hemmt diese Migration und verstärkt das sog. Lymphozyten-Homing, den Rückzug in Lymphorgane [190] [191]. Gerade in arteriosklerotischen Läsionen kann S1P sowohl an immunologischen und inflammatorischen Prozessen als auch an der Entstehung von Gefäßverschlüssen beteiligt sein [192] [193] [194] [195].

### **1.2.5 Bedeutung für kardiovaskuläre Erkrankungen**

Wie in Kap. 1.2.4 und Abb. 10 beschrieben, kann S1P an verschiedenen Pathomechanismen der kardiovaskulären Erkrankungen beteiligt sein, wobei sich mehrere Einzeleffekte gleichzeitig additiv auswirken können.

### 1.2.5.1 Koronare Herzkrankheit

Im Serum von Patienten mit KHK konnten höhere S1P-Konzentrationen nachgewiesen werden als in gesunden Kontrollprobanden, diese stiegen mit zunehmenden Schweregrad der zugrunde liegenden Koronarstenose weiter an (geringgradige Stenose: 0,894  $\mu\text{mol/L}$ ; mittelgradige Stenose: 0,960  $\mu\text{mol/L}$ ; hochgradige Stenose: 1,035  $\mu\text{mol/L}$  vs. Kontrolle: 0,663  $\mu\text{mol/L}$ ) [98]. S1P war neben Alter und Geschlecht ein unabhängiger Prädiktor für Prävalenz und Schweregrad der Arteriosklerose [98]. In einer weiteren Studie im Plasma von Patienten mit KHK wurden im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden niedrigere S1P-Konzentrationen gemessen (0,305  $\mu\text{mol/L}$  vs. 0,350  $\mu\text{mol/L}$ ), nach Normalisierung auf entsprechende HDL-Konzentrationen im Plasma bestätigten sich allerdings die zuvor beobachteten höheren S1P-Konzentrationen in Patienten mit KHK (0,725  $\mu\text{mol/g HDL}$  vs. 0,542  $\mu\text{mol/g HDL}$ ) [99]. Bei Betrachtung des S1P-Gehaltes der isolierten HDL-Fraktionen in Plasma und Serum fiel jedoch eine Reduktion in Patienten mit KHK auf [99] [196]. Diese Reduktion konnte kausal mit der bei Arteriosklerose auftretenden HDL-Dysfunktion verknüpft werden und sowohl *ex* als auch *in vivo* durch S1P-Beladung funktionell behoben werden, wodurch eine S1P-Substitution möglicherweise ein neues Therapiekonzept zur Behandlung der HDL-Dysfunktion in Patienten mit KHK darstellt [197] [198]. HDL stellt somit nicht nur ein wichtiges Transport-Lipoprotein für S1P dar, sondern S1P ist essentiell für dessen physiologisch protektive Funktion, z. B. die HDL-induzierte Freisetzung der antiatherogenen und antithrombotischen Faktoren NO und Prostacyclin [199].

### 1.2.5.2 Myokardinfarkt

Als Folge der KHK kann ein Myokardinfarkt auftreten. Bei diesem kardiovaskulären Akutereignis waren im Plasma von Patienten mit Myokardinfarkt, verglichen mit gesunden Kontrollprobanden und Patienten mit Koronarer Herzkrankheit, zuerst keine Veränderungen der S1P-Konzentration ersichtlich [99]. Nach Normalisierung auf die entsprechende HDL-Konzentration im Plasma war die S1P-Konzentration in Patienten mit Myokardinfarkt erhöht, sowohl im Vergleich mit Gesunden (0,902  $\mu\text{mol/g}$  vs. 0,542  $\mu\text{mol/g}$ ) als auch mit Patienten mit stabiler KHK (0,902  $\mu\text{mol/g}$  vs. 0,725  $\mu\text{mol/g}$ ) [99]. Bereits bei transienter kardialer Ischämie während elektiver perkutaner Koronarinterventionen wurden erhöhte Plasma-S1P-Konzentrationen beobachtet [200]. In einem murinen Myokardinfarkt-Modell war die kardiale S1P-Konzentration erhöht und durch den Einsatz eines SphK1- bzw. S1P-Lyase-Inhibitors verbesserte bzw. verschlechterte sich die kardiale Dysfunktion [201]. In anderen Studien lagen dagegen erniedrigte S1P-Konzentrationen im Plasma von Patienten mit akutem Myokardinfarkt vor, u. a. fielen diese fünf Tage post-Infarkt weiter ab [202] [203]. Weiterhin

waren erniedrigte HDL-S1P-Konzentrationen nach koronarer Stent-Implantation mit einem hohem Risiko für eine In-Stent-Restenose assoziiert [204]. Untersuchungen im Thrombozytenreichen Plasma von Patienten mit Myokardinfarkt zeigten niedrigere S1P-Konzentrationen im Vergleich zu Patienten mit stabiler KHK; das gleiche Verhältnis spiegelte sich in gewaschenen Thrombozyten und Thrombozyten-armem Plasma wider [205]. Die intravenöse Applikation von 500 mg Acetylsalicylsäure bei akutem Myokardinfarkt führte durch Inhibition der Thrombin-induzierten S1P-Freisetzung zur Steigerung der S1P-Konzentration in Thrombozyten und folglich zu einer Verminderung in Thrombozyten-armem Plasma [205].

### 1.2.5.3 Herzinsuffizienz

Trotz veränderten S1P-Konzentrationen bei KHK und akutem Myokardinfarkt ist die Bedeutung von S1P in der Pathogenese einer chronischen Herzinsuffizienz unklar [206]. Zwar konnten Tumornekrosefaktor- $\alpha$ -abhängige S1P-Signalwege im Mausmodell identifiziert werden, im Plasma von Patienten mit eingeschränkter Herzfunktion traten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden jedoch keine Veränderungen in der S1P-Konzentration auf [207] [208].

### 1.2.5.4 Pulmonale Arterielle Hypertonie

Die in Kap. 1.2.4 beschriebene Konstriktion intrapulmonaler Arterien und von Pulmonalarterien sowie die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen durch S1P können die Pathogenese der PAH beeinflussen. In isolierten Mauslungen steigerte S1P den pulmonalvaskulären Widerstand, den Haupttriggerfaktor dieser Erkrankung [209]. S1P wirkte auch in isolierten Rattenlungen vasokonstriktorisch, dieser Effekt verstärkte sich im Hypoxie-induzierten PAH-Ratten-Modell [210]. Durch Reduktion der induzierbaren NO-Synthase (iNOS)-Expression und NO-Produktion in glatten Gefäßmuskelzellen von Ratten verstärkt S1P die eigenen vasokonstriktorischen Eigenschaften [211]. Außerdem triggert S1P das *Remodeling* pulmonaler Gefäße: Aktivierung der S1P-Rezeptoren S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3</sub> fördert, während Aktivierung von S1P<sub>2</sub> die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen inhibiert [212]. In einem Hypoxie-Zellmodell zeigten glatte Gefäßmuskelzellen eine erhöhte S1P-Konzentration und Proliferationsrate als unter normoxischer Kultivierung, durch Zugabe eines SphK1-Inhibitors konnte die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen gehemmt, durch zusätzliche Behandlung mit exogenem S1P weiter verstärkt werden [213]. Ein anderes Hypoxie-Zellmodell mit humanen pulmonalen glatten Muskelzellen zeigte eine erhöhte SphK1-Aktivität [214]. Lungen von Mäusen unter hypoxischen Haltungsbedingungen und Lungen sowie glatte Gefäßmuskelzellen der Pulmonalarterie von Patienten mit PAH waren neben erhöhter SphK1-Aktivität durch ebenfalls erhöhte S1P-Konzentrationen gekennzeichnet [215]. Außerdem wies

das metabolische Profil in Lungengewebe von Patienten mit PAH einen verstärkten Sphingolipid-Metabolismus auf [216]. Obwohl bisher keine weiteren klinischen Studien zur SphK1-Aktivität und S1P-Konzentration in Patienten mit PAH verfügbar sind, steht mit SphK1-Inhibitoren ein neuer potentieller Therapieansatz zur Behandlung der PAH zur Verfügung [215] [217].

Zusammengefasst ist S1P ein diagnostischer Marker, sowohl für die arteriosklerotischen Krankheitsbilder als auch für die PAH. Gleichzeitig besitzt S1P selbst biologische Aktivität, durch die S1P in verschiedene pathophysiologische Prozesse kardiovaskulärer Erkrankungen involviert ist.

## 1.3 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und S1P

### 1.3.1 Gemeinsamkeiten

Das in Kap. 1.1 beschriebene Isoprostan 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und das in Kap. 1.2 beschriebene Sphingolipid S1P weisen Gemeinsamkeiten in ihren Eigenschaften und Funktionen auf. Auch in ihrer Bedeutung für kardiovaskuläre Erkrankungen treten Analogien auf: So sind beide nicht nur Marker für verschiedene Krankheitsbilder, sondern auch Mediatoren in der Pathogenese. So liegen sowohl die Ausgangssubstanz zur Biosynthese von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> als auch die von S1P in der Zellmembran vor (Kap. 1.1.1.1 + Kap. 1.2.1.1). Die durch 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und S1P aktivierten Rezeptoren TP und S1PR<sub>1-5</sub> zählen zu den GPCRs (Kap. 1.1.2 + Kap. 1.2.2). 8-iso-PGF<sub>2α</sub> stellt lediglich einen Liganden für TP-Rezeptoren dar, S1P hingegen vermittelt seine biologische Aktivität einerseits auto- und parakrin über S1P-Rezeptoren, andererseits aber auch als intrazellulärer *second messenger* (Kap. 1.1.2 + Kap. 1.2.2). Außerdem besitzen beide Lipide vasoaktive Eigenschaften (Kap. 1.1.4 + Kap. 1.2.4). Die bereits aufgeführten sowie weitere Gemeinsamkeiten und Parallelen sind in Tab. 1 zusammengefasst dargestellt.

### 1.3.2 Zusammenhang

Reaktive Sauerstoffspezies katalysieren die Bildung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (Kap. 1.1.1.1). Auch die S1P-Biosynthese wird durch reaktive Sauerstoffspezies gefördert, indem jene die Aktivität der Sphingomyelinase und SphK1 steigern [218]. Die Biosynthese von S1P findet u. a. in Thrombozyten statt (Kap. 1.2.1.1). Die Freisetzung aus Thrombozyten über ABC-Transporter erfolgt über einen TP-abhängigen Signalweg [100]. Dabei stimuliert Thrombin die Bildung von TxA<sub>2</sub> durch Aktivierung der Cyclooxygenase-1 (COX-1). Als kanonischer Agonist aktiviert TxA<sub>2</sub> anschließend den TP, die nachgeschaltete Signalkaskade führt zur, für die

Thrombozytenaktivierung sowie -aggregation notwendigen, Degranulation und löst zudem PKC-vermittelt die Freisetzung von S1P aus (Abb. 11). Acetylsalicylsäure und andere COX-Hemmstoffe, z. B. Diclofenac oder Ibuprofen, verursachen aufgrund verminderter TxA<sub>2</sub>-Synthese eine Reduktion der S1P-Freisetzung, wohingegen U46619, ein synthetischer TP-Agonist, unabhängig von der TxA<sub>2</sub>-Synthese eine S1P-Freisetzung bewirkt [100]. Demnach könnte 8-iso-PGF<sub>2α</sub> als endogener TP-Agonist die S1P-Freisetzung aus Thrombozyten bewirken [23]. Auch die über S1PR<sub>1</sub>- und S1PR<sub>3</sub>-mediierte Migration von Monozyten wird bei Anwesenheit von Acetylsalicylsäure vermindert, ein Indiz für die Relevanz der S1P-Freisetzung [100].

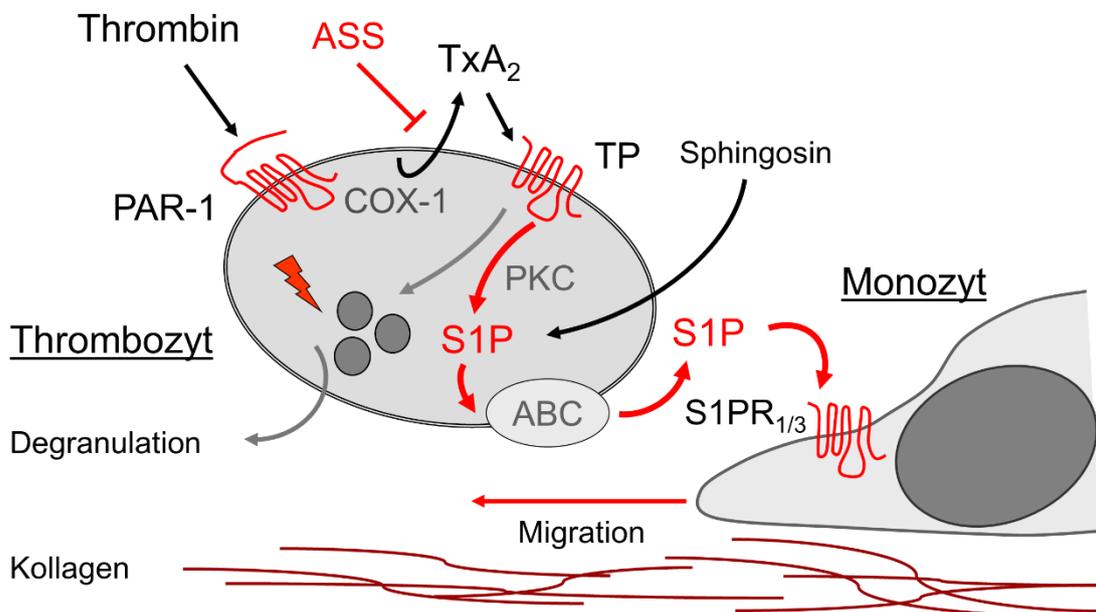


Abb. 11: Mechanismus der S1P-induzierten Monozyten-Migration nach S1P-Freisetzung aus Thrombozyten. Die Thrombin-induzierte COX-1-Aktivität und TxA<sub>2</sub>-Synthese bewirkt eine TP-vermittelte Degranulation und PKC-abhängige S1P-Freisetzung über ABC-Transporter. Eine Blockade der S1P-Freisetzung erfolgt durch Hemmung der TxA<sub>2</sub>-Synthese mit COX-Inhibitoren, z. B. ASS. Die Monozyten-Migration wird als parakriner S1P-Effekt über S1PR<sub>1/3</sub> vermittelt. PAR-1 Protease-aktivierter Rezeptor 1; COX-1 Cyclooxygenase-1; ASS Acetylsalicylsäure; TxA<sub>2</sub> Thromboxan A<sub>2</sub>; TP *thromboxane prostanoid receptor*; PKC Proteinkinase C; S1P Sphingosin-1-phosphat; ABC ABC-Transporter (*ATP-binding cassette transporter*); S1PR<sub>1/3</sub> S1P-Rezeptoren 1 und 3.<sup>11</sup>

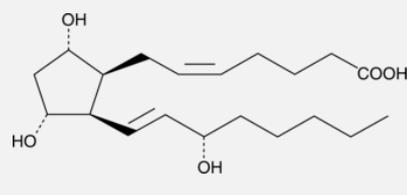
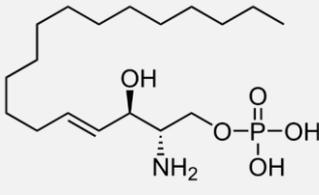
Tab. 1: Gemeinsamkeiten von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und S1P. Allgemeine Eigenschaften, biologische Aktivität und Bedeutung als Marker und/oder Mediator für kardiovaskuläre Erkrankungen jeweils von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (linke Spalte) und S1P (rechte Spalte). Erläuterungen und Literaturangaben siehe Kap. 1.1 für 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und Kap. 1.2 für S1P. ‚X‘ bestätigt die biologische Aktivität bzw. Bedeutung als Marker und/oder

<sup>11</sup> modifiziert nach [100]

Mediator der entsprechenden Zeile pro Spalte. 8-iso-PGF<sub>2α</sub> 8-iso-Prostaglandin F<sub>2α</sub>; S1P Sphingosin-1-phosphat; 2,3-Dinor-8-iso-PGF<sub>2α</sub> 2,3-Dinor-8-iso-Prostaglandin F<sub>2α</sub>; 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-Prostaglandin F<sub>2α</sub>; Plasma-HWZ Plasma-Halbwertszeit; min. Minuten; GPCR G-Protein-gekoppelter Rezeptor; TP *thromboxane prostanoid receptor*; S1PR<sub>1</sub> - S1PR<sub>5</sub> S1P-Rezeptoren 1-5; G-Proteine Guanosintriphosphat (GTP)-bindende Proteine; Gα<sub>q</sub>, Gα<sub>s</sub>, Gα<sub>i</sub>, Gα<sub>12/13</sub> α-Untereinheiten der 4 G-Protein-Subfamilien.

### Gemeinsamkeiten 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und S1P

#### Allgemeine Eigenschaften

	8-iso-PGF <sub>2α</sub>	S1P
Struktur		
Substanzklasse	Isoprostan	Sphingolipid
Biosynthese	nicht-enzymatische Peroxidation durch reaktive Sauerstoffspezies	enzymatisch durch Sphingomyelinase, Ceramidase und Sphingosinkinase
Ausgangssubstanz	Arachidonsäure	Sphingomyeline
Metabolismus	renale Elimination von 8-iso-PGF <sub>2α</sub> , 2,3-Dinor-8-iso-PGF <sub>2α</sub> und 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF <sub>2α</sub>	enzymatischer Abbau durch S1P-Phosphatasen und -Lyase
Plasma-HWZ	4 min.	15 min.
GPCR	TP	S1PR <sub>1</sub> - S1PR <sub>5</sub>
G-Proteine	Gα <sub>q</sub> , Gα <sub>s</sub> , Gα <sub>i</sub> , Gα <sub>12/13</sub>	Gα <sub>q</sub> , Gα <sub>i</sub> , Gα <sub>12/13</sub>
second messenger	nein	ja
<b>Biologische Aktivität</b>		
Angiogenese	X	X
Gefäßtonus	vasokonstriktorisch	vasokonstriktorisch und vasodilatatorisch
Endothelintegrität		X
Thrombozytenaggregation	X	
Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen	X	X
Monozytenadhäsion	X	X
Lymphozytenmigration		X
<b>Bedeutung als Marker und/oder Mediator für kardiovaskuläre Erkrankungen</b>		
Arteriosklerose	X	X
KHK	X	X
Myokardinfarkt	X	X
Herzinsuffizienz	X	
PAH	X	X

## **1.4 Zielsetzung**

### **1.4.1 8-iso-PGF<sub>2α</sub>**

Im ersten Teil sollte die biologische Aktivität von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und die Rolle des TP für (patho-)physiologische Isoprostanwirkungen untersucht werden. Dabei galt es folgende Fragestellungen zu beantworten:

*Welchen Phänotyp weisen TP-KO-Mäuse auf?*

*Welche Rolle spielt 8-iso-PGF<sub>2α</sub> für den Gefäßtonus ex vivo und in vivo?*

*Welche Auswirkungen hat eine 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Supplementation?*

*Wie kann eine Überexpression des TP im Mausmodell erreicht werden?*

### **1.4.2 S1P**

Im zweiten Teil sollte die Bedeutung von S1P als Biomarker untersucht werden. Dabei galt es folgende Fragestellungen zu beantworten:

*Welche S1P-Konzentrationen liegen in Gesunden und in Patienten vor?*

*Welche Methode eignet sich zur Bestimmung der S1P-Konzentration in biologischen Proben?*

*Welche Faktoren (Matrix, Lagerung) beeinflussen die S1P-Konzentration in biologischen Proben? Wie kann eine zuverlässige Probenqualität zur Bestimmung der S1P-Konzentration gewährleistet werden?*

### **1.4.3 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und S1P**

Anhand des TP-Tiermodelles und einer Netzwerkanalyse sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und S1P geprüft werden. Außerdem sollten Gemeinsamkeiten von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und S1P als Biomarker in Patienten mit Akutem Koronarsyndrom und Pulmonaler Arterieller Hypertonie untersucht werden.

## 2 Methoden

### 2.1 Instrumentelle Analytik

#### 2.1.1 Bestimmung der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration in murinen und humanen Urinproben

##### 2.1.1.1 Immunoaffinitätschromatographie

Die 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Extraktion aus murinem 24-Stunden-Sammelurin und humanen Urinproben erfolgte mittels Immunoaffinitätschromatographie mit dem *8-Isoprostane Affinity Purification Kit* (Cayman Chemical). Zuerst wurden 20 µL interner Standard [3,4-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-8-iso-PGF<sub>2α</sub> (8-iso-PGF<sub>2α</sub>-d<sub>4</sub>; 0,25 ng/µL) zu 1-2 mL murinem bzw. 5 mL humanem Urin pipettiert. Nach gründlichem Vortexen und 5-minütiger Zentrifugation bei Raumtemperatur und 2.000 rpm wurden die Proben direkt auf die Immunoaffinitätsäulen *8-Isoprostane Affinity Columns* (Cayman Chemical) gegeben. Die Säulen wurden mit 2 mL Säulenpuffer *1x Eicosanoid Affinity Column Buffer* (Cayman Chemical) und 2 mL Millipore-Wasser gewaschen. Anschließend wurde 8-iso-PGF<sub>2α</sub> mit 2 x 2 mL Elutionslösung *Eicosanoid Affinity Elution Solution* (Cayman Chemical) eluiert.

##### 2.1.1.2 Probenderivatisierung

Die Eluate wurden mittels Vakuumzentrifugation bei 60 °C eingengt und das Pellet in 300 µL Ethanol resuspendiert. Die Proben wurden in silanisierte Spitzvial-Autosamplerfläschchen überführt und im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt. Für die erste Derivatisierung wurden zu jeder Probe 10 µL Methanol, 100 µL Acetonitril, 10 µL Hünigbase (N,N-Diisopropylethylamin) und 10 µL 2,3,4,5,6-Pentafluorobenzyl (PFB)-Bromid (33% (v/v) in Acetonitril) gegeben und für 1 h bei 30 °C inkubiert. Danach wurden die Proben erneut im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt. Die zweite Derivatisierung erfolgte mit 100 µL N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) für 1 h bei 60 °C. Nach dem Abkühlen wurden die Proben in Flachboden-Autosamplerfläschchen mit Mikroinsert transferiert und bis zur GC-MS/MS-Messung bei 4 °C gelagert.

### **2.1.1.3 Gaschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie**

Die Quantifizierung erfolgte mittels Gaschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (GC-MS/MS) nach einer durch Schwedhelm et al. etablierten Methode [219] [220]. Die ermittelte Konzentration wird in pg/mg Kreatinin angegeben. Kreatinin dient hier als Bezugsgröße, um den Konzentrierungsgrad des Harns zu berücksichtigen.

### **2.1.2 Bestimmung der S1P-Konzentration in biologischen Proben**

Die Quantifizierung erfolgte mittels Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) und wurde im Rahmen dieser Arbeit basierend auf einer von Reidy<sup>12</sup>, Daum<sup>12</sup> und Kalhorn<sup>13</sup> in Seattle entwickelten Methode am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE), etabliert [185].

#### **2.1.2.1 Versuchsvorbereitung**

Alle Eppendorf-Tubes und Mikrotiterplatten wurden vor Verwendung silikonisiert. Hierfür wurden diese mithilfe einer Pasteur-Pipette mit Sigmacote® befüllt und im gleichen Schritt wieder entleert. Nach Entfernung des Rückstandes wurden die Eppendorf-Tubes und Mikrotiterplatten mit Reinstwasser gewaschen und anschließend über Nacht bei 60 °C im Trockenschrank getrocknet.

#### **2.1.2.2 Probenaufbereitung**

Zur Deproteinisierung der biologischen Proben (humanes Serum oder Plasma, murines Serum) wurden 180 µL Acetonitril (AcN; 80% in H<sub>2</sub>O) in einem 1,5 mL-Eppendorf-Tube vorgelegt, bevor 10 µL des internen Standards (C17-S1P bzw. [16,17,18-<sup>2</sup>H<sub>7</sub>]-S1P (S1P-*d*<sub>7</sub>)) und 20 µL der biologischen Probe hinzu pipettiert wurden. Anschließend wurden die Eppendorf-Tubes für 1 min. gründlich gevortext und 15 min. bei 10.000 x g und 4 °C zentrifugiert. 50 µL des Überstandes wurden in ein *well* einer 96-*well*-Mikrotiterplatte (U-Boden) transferiert, in das für eine 1:2-Verdünnung zuvor 50 µL AcN vorgelegt wurde. Für eine Doppelbestimmung wurde jede Probe zweifach aufgearbeitet. Drei 96-*well*-Mikrotiterplatten stellten ein Batch dar.

---

<sup>12</sup> Department of Pathology, University of Washington, Seattle

<sup>13</sup> Mass Spectrometry Center in the Department of Medicinal Chemistry at the University of Washington, Seattle

### 2.1.2.3 Kalibrierung

Die Herstellung der Kalibratoren 0  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 3  $\mu\text{M}$  erfolgte jeweils durch entsprechende Verdünnung der S1P-Stammlösung (10  $\mu\text{M}$  S1P-Standardsubstanz) mit fetalem Kälberserum (FCS). Die Kalibratoren wurden anschließend wie unter Kap. 2.1.2.2 beschrieben deproteinisiert und auf einer Mikrotiterplatte aufgetragen. Für eine Dreifachbestimmung wurde jeder Kalibrator dreifach aufgearbeitet und in aufsteigender Konzentration in *well* 1-15 (A1-B3) pipettiert (Abb. 12). Pro Batch wurde eine Kalibrierung durchgeführt, d.h. dass jeweils zwei unmittelbar im Anschluss gemessene Mikrotiterplatten auf die vorhergehende Kalibrierung bezogen wurden. Um ein sog. *Carry-over* des höchsten Kalibrators zu verhindern, wurden *well* 16-18 (B4-B6) ausschließlich mit 100  $\mu\text{L}$  AcN befüllt. Die Proben wurden dann ab *well* 19 (B7) aufgetragen (Abb. 12).

### 2.1.2.4 Qualitätskontrollen

Um die Vergleichbarkeit verschiedener Mikrotiterplatten zu überprüfen, wurden für *well* 91-93 (H7-H9) bzw. 94-96 (H10-H12) jeweils 20  $\mu\text{L}$  einer mit 0,5  $\mu\text{M}$  S1P-gespikten Kontrollserumprobe, *quality control high* (*qcH*), bzw. 20  $\mu\text{L}$  einer Kontrollserumprobe, *quality control low* (*qcL*), wie unter Kap. 2.1.2.2 beschrieben aufgearbeitet (Abb. 12). Für alle gemessenen Mikrotiterplatten einer Studie wurde eine Abweichung vom Mittelwert aller *qcL*- und *qcH*-Konzentrationen von  $\pm 15\%$  akzeptiert, bei höheren Abweichungen erfolgte einer Wiederholungsmessung der jeweiligen Mikrotiterplatte.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0 $\mu\text{M}$	0 $\mu\text{M}$	0 $\mu\text{M}$	0,1 $\mu\text{M}$	0,1 $\mu\text{M}$	0,1 $\mu\text{M}$	0,3 $\mu\text{M}$	0,3 $\mu\text{M}$	0,3 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$
B	3 $\mu\text{M}$	3 $\mu\text{M}$	3 $\mu\text{M}$	AcN	AcN	AcN	P1	P1	P2	P2	P3	P3
C	P4	P4	P5	P5	P6	P6	P7	P7	P8	P8	P9	P9
D	P10	P10	P11	P11	P12	P12	P13	P13	P14	P14	P15	P15
E	P16	P16	P17	P17	P18	P18	P19	P19	P20	P20	P21	P21
F	P22	P22	P23	P23	P24	P24	P25	P25	P26	P26	P27	P27
G	P28	P28	P29	P29	P30	P30	P31	P31	P32	P32	P33	P33
H	P34	P34	P35	P35	P36	P36	<i>qcH</i>	<i>qcH</i>	<i>qcH</i>	<i>qcL</i>	<i>qcL</i>	<i>qcL</i>

Abb. 12: Beispielhafte Belegung einer 96-*well*-Mikrotiterplatte. A1-B3 Standardreihe mit Kalibratoren; B4-B6 AcN; B7-H6 36 biologische Proben P1-P36 in Doppelbestimmung; H7-H9 *qcH*; H10-H12 *qcL*.

Bei Mikrotiterplatten ohne Standardreihe: A1-H6 45 biologische Proben in Doppelbestimmung. *qCH* *quality control high*; *qCL* *quality control low*.

### 2.1.2.5 Flüssigkeitschromatographie (LC)

Die mit AcN 1:2-verdünnten Überstände wurden auf einer Zorbax SB-C8-Säule fraktioniert. Dabei wurden die Analyten mit einem binären Gradienten (Acetonitril/Methanol, Ameisensäure) eluiert. Die chromatographischen Parameter der Methode sind in Tab. 2 zusammengefasst.

Tab. 2: Chromatographische Parameter zur Bestimmung von S1P.

Chromatographische Parameter	
Autosampler	Varian, Palo Alto, CA, USA
HPLC-System	Varian ProStar model 210
Trennsäule	Zorbax SB-C8 (Agilent; 2,1 mm x 50 mm, 1,8 µm)
Säulenofen	40 °C
Mobile Phase	A: 0,1% Ameisensäure in Wasser B: Acetonitril/Methanol (50/50, v/v) mit 0,1% Ameisensäure
Fließmittel-Gradient	0:00 min 60/40, A/B 2:10 min 5/95 3:30 min 60/40
Fließmittel-Geschwindigkeit	0,35 mL/min
Messzeit	6 min.
Injektionsvolumen	12 µL

### 2.1.2.6 Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)

Die Analyten wurden in den Fraktionen mit einem Tandem-Massenspektrometer detektiert. Die massenspektrometrischen Parameter der Methode sind in Tab. 3 zusammengefasst.

Tab. 3: Massenspektrometrische Parameter zur Bestimmung von S1P.

Massenspektrometrische Parameter	
System	Varian L1200 MS/MS
Software	Varian MS Workstation Software 6.9
Ionisierung	ESI, positiver Modus (ESI+)
Kollisionsgas	Argon (2 mTorr)
Trägergas	Stickstoff (48 psi)
Kollisionsenergie	15 eV

### 2.1.2.7 Auswertung

Die Peakflächen (AUC; *area under the curve*) der Analyten wurden mit der Software MS Data Review<sup>®</sup> berechnet. Anhand der Peakflächenverhältnisse von S1P und internem Standard der Kalibratoren wurde eine Kalibriergerade erstellt, deren Steigung zur Ermittlung der S1P-Konzentration der untersuchten Proben diene (Abb. 13):

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

S1P-Konzentration: S1P-Konzentration in der untersuchten Probe [ $\mu\text{M}$ ]

AUC S1P: Peakfläche S1P

AUC IS: Peakfläche des internen Standards (C17-S1P oder S1P-*d*<sub>7</sub>)

Steigung: Steigung der Kalibriergeraden [ $1/\mu\text{M}$ ]

Der Mittelwert der doppelbestimmten S1P-Konzentration stellte die ermittelte S1P-Konzentration in der untersuchten Probe dar, sofern der Variationskoeffizient  $\leq 20\%$  betrug. Andernfalls wurde die entsprechende Probe bei der nächsten Messung wiederholt.

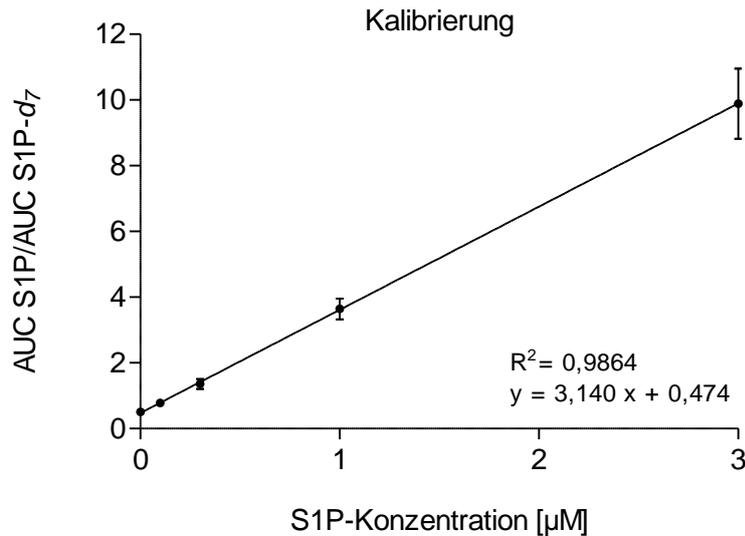


Abb. 13: Beispielhafte Kalibriergerade zur Bestimmung der S1P-Konzentration. Peakflächenverhältnisse von S1P und S1P- $d_7$  der Kalibratoren 0 µM, 0,1 µM, 0,3 µM, 1 µM und 3 µM auf Ordinate (AUC S1P/AUC S1P- $d_7$ ), jeweils dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD der Dreifachbestimmung. S1P-Konzentration, angegeben in µM, auf Abszisse. Angabe von Bestimmtheitsmaß  $R^2$  und Gleichung der linearen Regressionsgeraden.

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 DNA-Analysen

#### 2.2.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien

Die zur Genotypisierung der TP-Mäuse benötigte genomische DNA wurde aus Mausschwanzspitzen isoliert. Die Schwanzbiopsien wurden über Nacht in 200 µL *Digestion Buffer* unter Zusatz von 2 µL Proteinase K bei 55 °C und 650 rpm geschüttelt. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm wurden 175 µL des Überstandes in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 175 µL Isopropanol wurde der Ansatz 3 min. durch Invertieren gemischt. Nach 25-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 14.000 rpm wurde der Überstand dekantiert und das DNA-Pellet in 100 µL 70%igen Ethanol gewaschen. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 14.000 rpm wurde der Überstand erneut dekantiert und das Reaktionsgefäß 30 min. über Kopf luftgetrocknet. Die restliche Flüssigkeit wurde vorsichtig mit einem Wattestäbchen entfernt und das DNA-Pellet in 100 µL *Low TE Buffer* resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C und 500 rpm wurde die gelöste DNA bei 4 °C gelagert.

### 2.2.1.2 Klassische PCR

Die Genotypisierung der TP-Mäuse beruht auf dem Prinzip einer klassischen Polymerase-Kettenreaktion (PCR; *polymerase chain reaction*). Die PCR ist eine Standardmethode der Molekularbiologie zur Vervielfältigung bestimmter DNA-Bereiche *in vitro* [221]. Dazu werden die zu vervielfältigende DNA (sog. Matrize oder *Template*), eine thermostabile DNA-Polymerase, sequenzspezifische Oligonukleotid-Primer und Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) benötigt. Ein PCR-Programm besteht aus drei Reaktionsritten: Spaltung des DNA-Doppelstranges (Denaturierung), Hybridisierung der Oligonukleotidprimer an die komplementären Bereiche der einzelsträngigen *Template*-DNA (*Annealing*) und Verlängerung der Primer zum Doppelstrang durch die Polymerase (Elongation). Pro Zyklus wird die Zahl der *Template*-DNA verdoppelt, mit 25-35 Zyklen wird eine exponentielle Amplifikation der Zielsequenz erreicht.

Zuerst wurde ein *Master Mix* hergestellt (Tab. 4). Die eingesetzten Primer sind in Tab. 5 aufgeführt [63]. Anschließend wurden pro Ansatz 2  $\mu\text{L}$  DNA zugegeben. Die dafür notwendige Isolierung der genomischen DNA aus Mausschwanzbiopsien wird in Kap. 2.2.1.1 beschrieben. Das verwendete PCR-Temperaturprogramm ist in Tab. 7 dargestellt. Die Auftrennung der während der PCR amplifizierten DNA-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese wird in Kap. 2.2.1.3 beschrieben.

Tab. 4: *Master Mix* für Genotypisierungs-PCR der TP-Mäuse. Volumina für einen Ansatz.  $\text{MgSO}_4$  Magnesiumsulfat; dNTPs Desoxyribonukleosidtriphosphate;  $\text{H}_2\text{O}$  Wasser.

Komponente	pro Ansatz
<i>10x Buffer for KOD Hot Start DNA Polymerase</i>	2,5 $\mu\text{L}$
$\text{MgSO}_4$ (25 mM)	1,5 $\mu\text{L}$
dNTPs (je 2 mM)	2,5 $\mu\text{L}$
Primer (Tab. 5)	je 0,075 $\mu\text{L}$
<i>KOD Hot Start DNA Polymerase</i>	0,5 $\mu\text{L}$
$\text{H}_2\text{O}$ , Nuklease-frei	15,775 $\mu\text{L}$
gesamt	23 $\mu\text{L}$

Tab. 5: Primer für klassische PCR zur Genotypisierung von TP-KO- und -WT-Mäusen [63].

Primer	5' → 3'-Sequenz (Anzahl der Basenpaare)
Forward ML136	aagcctgggttcagggacctg (22)
Reverse ML139	actttgttcagacaccacctgtc (24)
Reverse Neo2	tgatattgctgaagagcttggcggcgaa (28)

Die zur Genotypisierung der transgenen Mäuse eingesetzten Primer sind in Tab. 6 aufgeführt.

Tab. 6: Primer für klassische PCR zur Genotypisierung der hTP-WT- bzw. hTP-MUT-transgenen Mäuse. hTP-WT Wildtyp-Variante des humanen TP; hTP-MUT mutierte Variante des humanen TP.

Primer	5' → 3'-Sequenz (Anzahl der Basenpaare)
Forward TBXA2R F	gtgttgctgcccttctg (19)
Reverse TBXA2R Var1R/β	tggccacagagtgagactc (20)

Tab. 7: Temperaturprogramm für Genotypisierungs-PCR der TP-Mäuse.

	Temperatur	Dauer	
Aktivierung der Polymerase	95 °C	2 min.	
Denaturierung	95 °C	20 sec.	
<i>Annealing</i>	62,1 °C	10 sec.	35 Zyklen
Elongation	70 °C	20 sec.	
<i>Cooling down</i>	4 °C	∞	

### 2.2.1.3 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung der während der PCR amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte mittels horizontaler Agarosegelelektrophorese. Nukleinsäuren bewegen sich aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen in ihrem Zucker-Phosphat-Rückgrat zur Anode. Die Geschwindigkeit, mit der die DNA-Fragmente durch das Gel wandern, hängt von der Molekülgröße, der Konzentration des Agarosegels und der Höhe der angelegten Spannung ab. Kleinere DNA-Fragmente wandern schneller durch die Gelmatrix als größere. Es wurden 1%ige Agarosegele in 0,5x TBE-Puffer verwendet. Durch Zugabe von 0,05% Roti®-GelStain wurden die DNA-Banden sichtbar gemacht: Das enthaltene Benzimidazol bindet an die kleinen Furchen der DNA-Doppelhelix und wird durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt. Die Höhe der angelegten Spannung betrug 10 V/cm Gellänge. Als DNA-Größenstandard wurde die Leiter GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific Fisher) und zur Visualisierung der DNA während der Elektrophorese 6x DNA Loading Dye (Thermo Scientific Fisher) verwendet. Die Gele wurden mit dem ChemiGenius<sup>2</sup> Bio Imaging System (Syngene) abfotografiert.

## 2.2.2 RNA-Analysen

### 2.2.2.1 Isolierung von RNA aus Gewebe

50 mg Gewebe wurde mit 1 mL RNAzol bei 30 Hz im TissueLyzer homogenisiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 µL Chloroform. Nach gründlichem Vortexen wurden die Reaktionsgefäße 15 min. auf Eis gelagert und anschließend 15 min. bei 4 °C und 12.000 x g zentrifugiert. Die obere, farblose wässrige Phase wurde abpipettiert und in einem neuen Reaktionsgefäß mit 1 mL Isopropanol vereinigt. Die Mischung wurde gevortext und zur Ausfällung der RNA mindestens 1 h bei -20 °C gelagert. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 12.000 x g wurde der Überstand dekantiert und das RNA-Pellet mit 1 mL 70%igen Ethanol gewaschen. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 7.500 x g wurde der Überstand erneut verworfen und das Reaktionsgefäß 2 min. über Kopf luftgetrocknet. Die restliche Flüssigkeit wurde vorsichtig mit einem Wattestäbchen entfernt und das RNA-Pellet in 20 µl RNase-freiem DEPC-Wasser resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) bestimmt.

### 2.2.2.2 Reverse Transkription

Die, wie in Kap. 2.2.2.1 beschrieben, isolierte RNA wurde, gemäß Herstellerangaben des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems), mittels Reverser Transkriptase unter Verwendung von *Random*-Primern in cDNA, umgeschrieben und bei -20 °C gelagert [222].

Zuerst wurde ein *Master Mix* hergestellt (Tab. 8). 2 µg RNA wurden mit RNase-freiem DEPC-Wasser auf 10 µL verdünnt. Anschließend wurden pro Ansatz 10 µL *Master Mix* zugegeben. Das verwendete Temperaturprogramm zur Reversen Transkription ist in Tab. 9 dargestellt.

Tab. 8: *Master Mix* zur Reversen Transkription unter Verwendung des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems). Volumina für einen Ansatz. *RT reverse transcription*; dNTP Desoxyribonukleosidtriphosphat; H<sub>2</sub>O Wasser.

Komponente	pro Ansatz
<i>10x RT Buffer</i>	2 µL
25x dNTP Mix (100 mM)	0,8 µL
<i>10x RT Random Primers</i>	2 µL
<i>MultiScribe™ Reverse Transcriptase</i>	1 µL
RNase Inhibitor	1 µL
H <sub>2</sub> O, Nuklease-frei	3,2 µL
gesamt	10 µL

Tab. 9: Temperaturprogramm zur Reversen Transkription.

Temperatur	Dauer
25 °C	10 min.
37 °C	120 min.
85 °C	5 min.
4 °C	∞

### 2.2.2.3 Quantitative *real-time*-PCR

Der Nachweis der TP-Expression auf Transkriptionsebene erfolgte mittels quantitativer *real-time*-PCR (qPCR) mit der aus RNA umgeschriebenen cDNA. Die dafür notwendige Isolierung der RNA aus dem entsprechenden Gewebe und anschließende Reverse Transkription zu cDNA wird in Kap. 2.2.2.1 und Kap. 2.2.2.2 dargestellt. Die Quantifizierung des Amplifikationsproduktes in Echtzeit (*real-time*) beruht auf der Verwendung spezifischer TaqMan<sup>®</sup>-Sonden, die am 5'-Ende mit einem *Reporter*-Fluoreszenzfarbstoff (6-Carboxyfluorescein) und am 3'-Ende mit einem nicht-fluoreszierenden *Quencher*-Farbstoff (6-Carboxytetramethylrhodamin), der die Fluoreszenz des *Reporters* unterdrückt, markiert sind. Während der PCR bindet die TaqMan-Sonde<sup>®</sup> zwischen dem *forward*- und *reverse*-Primer. Die Taq-Polymerase (*Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase*), welche neben der Polymeraseaktivität eine 5' → 3'-Exonukleaseaktivität besitzt, baut während der Synthese des Gegenstranges die Sonde am 5'-Ende ab, sodass der Abstand zwischen *Reporter* und *Quencher* zunimmt und eine steigende *Reporter*-Fluoreszenz gemessen werden kann. Diese steigt entsprechend der Akkumulation des PCR-Produktes mit jedem PCR-Zyklus an und wird jeweils am Ende der Elongation gemessen.

Die benötigten Bestandteile (spezifische TaqMan-Sonde<sup>®</sup>, *forward*- und *reverse*-Primer) werden von der Fa. Applied Biosystems in validierten sog. *pre-designed TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays* angeboten: Hs00169054\_m1 für den humanen TP, Mm00436917\_m1 für den murinen TP und Mm99999915\_g1 für die murine Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Housekeeping-Gen. Zuerst wurde ein *Master Mix pro TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assay* hergestellt (Tab. 10). Die cDNA wurde 1:10 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Pro *well* der 384-*well* Multiply<sup>®</sup> PCR-Platte wurden 8 µL des jeweiligen *Master Mixes* vorgelegt und 2 µL der verdünnten cDNA in Doppelbestimmung zugegeben. Das

verwendete qPCR-Temperaturprogramm ist in Tab. 11 dargestellt. Die Messungen wurden mit der ABI Prism<sup>®</sup> 7900 HT Sequence Detection System Software analysiert. Die relative Genexpression wurde anhand der von Livak und Schmittgen entwickelten Delta-delta-Ct-Methode errechnet [223].

Tab. 10: *Master Mix* für qPCR unter Verwendung des *Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific) und *TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays* (Applied Biosystems). Volumina für einen Ansatz in Doppelbestimmung.

Komponente	pro Ansatz in Doppelbestimmung
<i>Maxima Probe qPCR Master Mix</i>	10 $\mu$ L
<i>TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assay</i> (s.o.)	1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O, Nuklease-frei	6 $\mu$ L
gesamt	17 $\mu$ L

Tab. 11: Temperaturprogramm für qPCR.

	Temperatur	Dauer	
Aktivierung der Uracil-DNA-Glykosylase	50 °C	2 min.	
Aktivierung der Polymerase	95 °C	10 min.	
Denaturierung	95 °C	15 sec.	40 Zyklen
<i>Annealing</i> /Elongation	60 °C	1 min.	

## 2.2.3 Protein-Analysen

### 2.2.3.1 Proteinisolierung aus Gewebe

100 mg Gewebe wurde mit 400  $\mu$ L 0,2%-SDS-Puffer versetzt und 30 sec. im TissueLyzer homogenisiert. Das Homogenat wurde 10 min. auf Eis gelagert, um die Schaumbildung zu reduzieren. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 13.000 rpm wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert.

### 2.2.3.2 Konzentrationsbestimmung der Proteine

Die Proteinkonzentration der Überstände nach Proteinisolierung aus Gewebe (Kap. 2.2.3.1) wurde nach der Methode von Bradford bestimmt [224]. Das Prinzip beruht auf der Komplexbildung des Triphenylmethanfarbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau G-250 (CBBG) mit basischen (z. B. Arginin, Histidin) und aromatischen Aminosäuren (z. B. Tyrosin, Tryptophan) der Proteine [225]. Dies führt zu einer bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums von 470 nm (rote protonierte Form des Bradford-Reagenzes) nach 595 nm (blaue unprotonierte Form des komplexierten Farbstoffes). Durch Messung der Absorption bei 595 nm kann die Proteinkonzentration berechnet werden.

Als Proteinstandard wurde bovines Serumalbumin (*Bio-Rad Protein Assay Standard II*) verwendet (0 µg, 0,5 µg, 1 µg, 2 µg, 3 µg, 4 µg, 5 µg). Das Bradford-Reagenz (*Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate*) wurde 1:4 mit *Phosphate Buffered Saline* (PBS) verdünnt. Pro well der 96-well-Mikrotiterplatte (F-Boden) wurden 100 µL verdünntes Bradford-Reagenz und 10 µL Standard bzw. verdünnte Probe pipettiert und gut vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min. erfolgte die Absorptionsmessung mit dem Photometer Tecan Safire II bei 595 nm. Die Proteinkonzentration der Probe wurde anhand der Standardkurve ermittelt.

### 2.2.3.3 Untersuchung der Proteinexpression

Der Nachweis der TP-Expression auf Proteinebene erfolgte mittels Western Blot. Die dafür notwendige Isolierung und Konzentrationsbestimmung der Proteine aus dem entsprechenden Gewebe wird in Kap. 2.2.3.1 und Kap. 2.2.3.2 dargestellt. Die Auftrennung der Proteine durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, anschließender Protein-Transfer (Western Blot) und Immunodetektion werden jeweils in Kap. 2.2.3.3.1, Kap. 2.2.3.3.2 und Kap. 2.2.3.3.3 erläutert.

#### 2.2.3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe wandern während der vertikalen Elektrophorese zur Anode und werden durch den Molekularsiebeffekt der porösen Polyacrylamid-Matrix nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dazu wurde ein 10%iges SDS-Trenngel gegossen und zum Schutz vor Austrocknung mit destilliertem Wasser überschichtet. Nach Auspolymerisierung wurde das 4%ige Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Die Verwendung eines Sammelgels dient der Proteinkonzentrierung und Schärfung der Proteinbanden. Nach sofortigem Einsetzen

des 10-Taschen-Kammes und Auspolymerisierung des Sammelgels wurden die Gele in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt, welche anschließend mit kaltem SDS-PAGE-Laufpuffer befüllt wurde.

Während der Gelvorbereitung wurden die Proben auf Eis aufgetaut. Jeweils 50 µg Protein wurden mit destilliertem Wasser auf 8 µL ergänzt. Nach Zugabe von 10 µL *Sample Buffer* und 2 µL *Load Mix* wurden die Ansätze gevortext und zum Denaturieren 10 min. bei 95 °C erhitzt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 13.000 x g wurden pro Geltasche 20 µL Probenansatz bzw. 10 µL Protein-Molekulargewichts-Standard aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 50 V begonnen und nach 60 min. für ca. 2 h auf 150 V erhöht.

### **2.2.3.3.2 Western Blot**

Beim Western Blot werden die Proteine eines SDS-Gels elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen, welche die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen bindet. Zur Aktivierung der Bindungsstellen der Nitrocellulose-Membran enthielt der Transferpuffer 20% Methanol. Zuerst wurde das SDS-Trenngel zur Fixierung der Proteine 15 min. in Transferpuffer äquilibriert. Die benötigten Schwämme, Filterpapiere und die Nitrocellulose-Membran wurden ebenfalls 15 min. in Transferpuffer getränkt. Der Transfer-Sandwich wurde wie folgt geschichtet: Schwamm – 3 Lagen Filterpapier – Nitrocellulose-Membran – SDS-Gel – 3 Lagen Filterpapier – Schwamm. Der Transfer-Sandwich und ein Kühlakku wurden in die dafür vorgesehene Western Blot-Kammer eingesetzt und die Kammer mit kaltem Transferpuffer gefüllt. Der Transfer erfolgte 2 h bei 300 mA, wobei der Kühlakku nach 1 h ausgetauscht wurde. Zur Kontrolle des Proteintransfers wurden die Proteine anschließend mit Ponceau S-Lösung angefärbt. Für das weitere Vorgehen wurde die Ponceau-gefärbte Nitrocellulose-Membran in TBS-T Puffer wieder vollständig entfärbt. Zur Blockade der verbliebenen freien Proteinbindungsstellen mit für die Antikörper nicht erkennbaren Proteinen wurde die Nitrocellulose-Membran für 1 h bei Raumtemperatur mit der Blockierlösung (5% Milchpulver) inkubiert.

### **2.2.3.3.3 Immunodetektion**

Die mit Milchpulver geblockte Nitrocellulose-Membran wurde über Nacht bei 4 °C auf dem Taumelmischer mit dem antigenspezifischen Primärantikörper inkubiert. Die eingesetzten Primärantikörper wurden 1:1000 verdünnt (mit 4% *Dry Milk Powder* und 2% bovinem Serumalbumin in TBS-T Puffer) und sind in Tab. 12 aufgeführt. Zur Entfernung des ungebundenen Primärantikörpers wurde die Nitrocellulose-Membran dreimal für jeweils 15 min. mit TBS-T Puffer gewaschen. Danach wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur

mit dem *horseradish peroxidase* (HRP)-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Die eingesetzten Sekundärantikörper wurden 1:2000 verdünnt (mit 2% *Dry Milk Powder* und 1% bovinem Serumalbumin in TBS-T Puffer) und sind in Tab. 13 aufgeführt. Zur Entfernung des ungebundenen Sekundärantikörpers wurde die Membran zweimal für jeweils 15 min. mit TBS-T Puffer und einmal für 15 min. mit TBS Puffer gewaschen. Zur Anfärbung der Proteinbanden wurde das *enhanced chemiluminescence* (ECL)-HRP-Substrat *SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate* (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Kurz vor Gebrauch wurden je 250 µL *SuperSignal West Dura Luminol/Enhancer Solution* und *SuperSignal West Dura Stable Peroxide Solution* gemischt und die Membran 3 min. damit bedeckt. Der HRP-konjugierte Sekundärantikörper katalysiert die Oxidation des zugegebenen Luminols zu 3-Aminophthalat und löst damit eine Chemilumineszenz aus, die mit dem ChemiGenius<sup>2</sup> Bioimaging System detektiert wurde.

Tab. 12: Primärantikörper zur TP- und GAPDH-Detektion mittels Western Blot.

Primärantikörper	Hersteller	Spezies
TXA2R, T-20	Santa Cruz Biotechnology sc-18377	Goat, <i>polyclonal</i>
Anti-Thromboxane A2 receptor antibody	abcam ab92883	Rabbit, <i>polyclonal</i>
GAPDH, FL-335	Santa Cruz Biotechnology sc-25778	Rabbit, <i>polyclonal</i>

Tab. 13 Sekundärantikörper zur TP- und GAPDH-Detektion mittels Western Blot. IgG Immunglobulin G; HRP *horseradish peroxidase*.

Sekundärantikörper	Hersteller	Spezies
Anti-Goat IgG (HRP-konjugiert)	abcam ab6885	Donkey, <i>polyclonal</i>
Anti-Rabbit IgG (HRP-konjugiert)	Jackson ImmunoResearch 111- 035-45	Goat, <i>polyclonal</i>

### 2.2.3.4 Immunhistochemie

Der Nachweis der TP-Expression in histologischen Querschnitten von explantierten Aorten aus TP-WT- und TP-KO-Mäusen erfolgte mittels Immunhistochemie. Nach Entnahme und Freipräparation der Aorten wurden diese in kaltem PBS gewaschen, in 4% Formaldehyd fixiert und in Einbettkassetten mit steigender Isopropanol-Konzentration vollautomatisiert entwässert. Nach Einbettung der Aorten in Paraffinblöcke und Anfertigung der Schnitte wurden die Objektträger zur Demaskierung der Epitope 30 min. mit Citratpuffer (Roche, Ventana Medical Systems) behandelt. Die anschließende immunhistochemische Färbung erfolgte vollautomatisch mit dem Färbeautomaten Ventana Benchmark XT (Roche, Ventana Medical Systems). Die eingesetzten Antikörper sind in Tab. 14 und Tab. 15 aufgeführt. Der Primärantikörper wurde 1:50 verdünnt (mit 1% bovinem Serumalbumin und 0,5% Triton X-100 in TBS Puffer) und der Sekundärantikörper unverdünnt eingesetzt. Als Substrat des Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpers diente *Peroxidase Chromogen/Substrate Solution* (Nichirei Biosciences). Die Präparate wurden unter einem Lichtmikroskop betrachtet und fotografiert.

Tab. 14: Primärantikörper zur TP-Detektion mittels Immunhistochemie.

Primärantikörper	Hersteller	Spezies
TXA2R, T-20	Santa Cruz Biotechnology sc-18377	<i>Goat, polyclonal</i>

Tab. 15: Sekundärantikörper zur TP-Detektion mittels Immunhistochemie. PO Peroxidase; G Goat.

Sekundärantikörper	Hersteller	Spezies
Histofine® Simple Stain Mouse MAX PO (G)	Nichirei Biosciences 414351F	<i>Rabbit, polyclonal</i>

Die immunhistochemischen Färbungen wurden in Zusammenarbeit mit PD Dr. Susanne Krasemann und Kristin Hartmann, UKE Core-Facility Mauspathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE), durchgeführt.

## 2.3 Tierexperimentelle Methoden

Die durchgeführten Arbeiten an Mäusen wurden vom Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt und erfolgten gemäß den geltenden tierschutzrechtlichen Bestimmungen (Genehmigungs-Nr.: G30/11 und G10/13).

### 2.3.1 Generierung von transgenen Mäusen

Für die Charakterisierung der kausalen Zusammenhänge zwischen Isoprostanen, vor allem 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, und Pathomechanismen kardiovaskulärer Erkrankungen sollten transgene Mausmodelle generiert werden. Um zwischen den Effekten zu differenzieren, die durch 8-iso-PGF<sub>2α</sub> oder durch andere TP-Agonisten, z. B. TxA<sub>2</sub> oder U46619, mediiert werden, sollte ein Responder-Mausmodell generiert werden, das die genetische Information einer mutierten Variante des humanen TP (zielgerichtete Punktmutation F196A) trägt (TP-MUT), wodurch es zum Verlust der Bindung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> an den TP kommt, wohingegen die Bindung klassischer TP-Agonisten, z. B. TxA<sub>2</sub> oder U46619, nicht beeinflusst wird [27]. Zum Vergleich sollte der physiologische Zustand des TP mit einem Responder-Mausmodell, das die genetische Information für die Wildtyp-Variante des humanen TP integriert hat (TP-WT), nachgeahmt werden. In beiden Responder-Mausmodellen wird die Expression der Transgene durch ein *tetracyclin responsive element* (TRE) Doxycyclin-regulierbar gesteuert. Nach Rückkreuzung der beiden Responder-Mausmodelle mit einer endothelspezifischen Aktivatormauslinie, die für eine Tie2-Promoter/Enhancer-gesteuerte *tetracycline transactivator* (tTA)-Expression sorgt, wird in Anwesenheit der endothelzellspezifischen Rezeptor-Tyrosinkinase Tie2 tTA exprimiert [226]. tTA bindet spezifisch an das TRE und aktiviert in Abwesenheit von Doxycyclin, einem Tetracyclin-Analogon, die Transkription des entsprechenden Transgens in vaskulären Endothelzellen (*Tet-off*-System) [227]. Damit es nicht zu einer Überlagerung mit dem Signalweg des murinen TP kommt, sollten die transgenen Mausmodelle auf den Hintergrund der TP-defizienten Maus (TP-KO) rückgekreuzt werden.

Die Generierung der transgenen Mäuse mittels Pronukleusinjektion wurde in Zusammenarbeit mit der ZMNH Core-Facility Transgene Mäuse unter der Leitung von PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer, Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH), durchgeführt.

### 2.3.2 Vasokonstriktorische Messungen am Myographen

Die vasoaktiven Eigenschaften von Isoprostanen und Prostaglandinen in murinen Aorten und Pulmonalarterien wurden *ex vivo* am Myographen untersucht. Nach Entnahme und Freipräparation der Gefäße wurden diese in Ringe geschnitten und auf Häkchen in die

Apparatur mit Spannungsmesser eingespannt. Um eine möglichst physiologische Umgebung nachzuahmen, befanden sich die GefäÙe in einem Bad mit 37 °C warmem, Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>)-begastem Krebs-Henseleit-Puffer. Nach sukzessivem Spannungsaufbau (im Abstand von je 7 min. bei Aorten: 0,2 gram - 0,4 gram - 0,6 gram - 0,8 gram - 1,1 gram bzw. bei Pulmonalarterien: 0,2 gram - 0,3 gram - 0,4 gram - 0,6 gram - 0,8 gram) bis 1,1 gram (Aorta) bzw. 0,8 gram (Pulmonalarterie) wurde zudem eine annähernd physiologische Spannung der GefäÙswand erreicht. Zur Testung der Viabilität und Konstriktionsfähigkeit der Aorten- bzw. Pulmonalarterien-Ringe erfolgte die dreimalige Zugabe von 1 mL 2 M Kaliumchlorid (KCl) in 25 mL Badvolumen. Eine adäquate Vorkonstriktion war Voraussetzung zur Fortsetzung des Versuches, wobei die maximale KCl-Konstriktion als Bezugswert (100%) für beobachtete Konstriktion bei Zugabe von Testsubstanzen angenommen wurde. Anschließend wurden additive Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt (Abb. 14). Die zugegebenen Konzentrationen sind jeweils in Tab. 16 dargestellt.

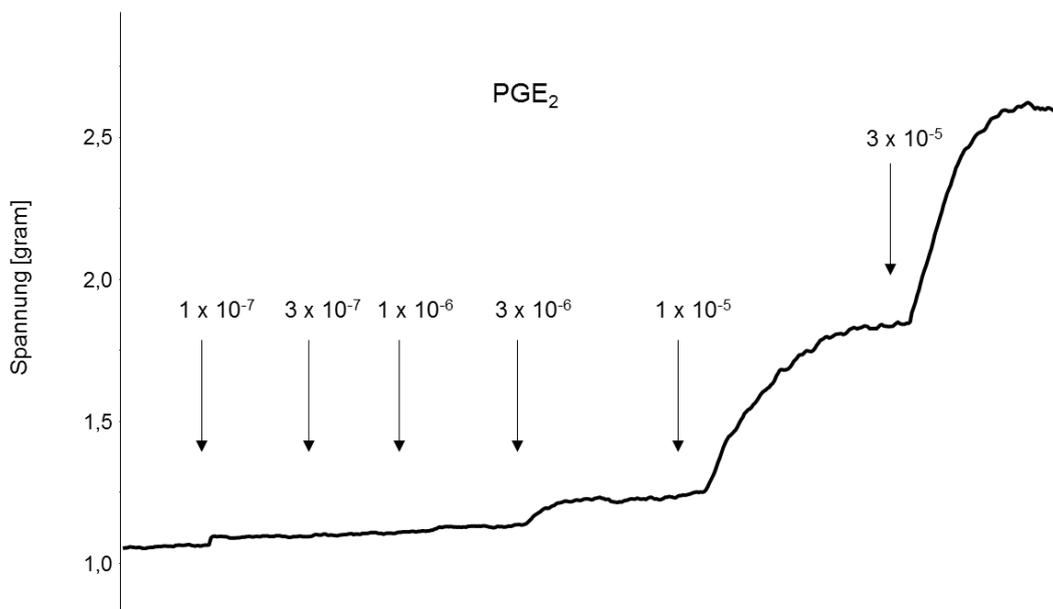


Abb. 14: Beispielhafte Aufnahme einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve für PGE<sub>2</sub>. Spannung, angegeben in gram, auf Ordinate, zeitlicher Verlauf auf Abszisse. Pfeile deuten additive Zugabe der entsprechenden Konzentrationen an PGE<sub>2</sub> an.<sup>14</sup>

<sup>14</sup> modifiziert nach [228]

Tab. 16: Bereich der zugegebenen Konzentrationen zur Erstellung von Konzentrations-Wirkungs-Kurven für 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, 8-iso-PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGE<sub>2</sub> und U-46619 am Myographen mit murinen Aorten (mittlere Spalte) und Pulmonalarterien (rechte Spalte). N/D *no data*.

Substanz	Konzentrationsbereich Aorta	Konzentrationsbereich Pulmonalarterie
8-iso-PGF <sub>2α</sub>	$1 \times 10^{-7} - 3 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-8} - 3 \times 10^{-5}$
8-iso-PGE <sub>2</sub>	$1 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-6}$	N/D
PGF <sub>2α</sub>	$1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-8} - 3 \times 10^{-5}$
PGE <sub>2</sub>	$1 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-5}$	N/D
U-46619	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-7}$

Die Myographen-Versuche wurden in Kooperation mit Mintje Bohné, Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE), durchgeführt sowie durch Bereitstellung der Apparatur von Prof. Dr. Tanja Zeller, Klinik und Poliklinik für Allgemeine und Interventionelle Kardiologie, Universitäres Herzzentrum Hamburg (UHZ), und Unterstützung von Hartwig Wieboldt, Klinik und Poliklinik für Allgemeine und Interventionelle Kardiologie, Universitäres Herzzentrum Hamburg (UHZ) ermöglicht.

### 2.3.3 Intravitalmikroskopie

Die vasoaktiven Eigenschaften von Isoprostanen und Prostaglandinen wurden *in vivo* in murinen Arteriolen des *Musculus cremaster* (*M. cremaster*) mittels Intravitalmikroskopie untersucht.

#### 2.3.3.1 Versuchsvorbereitung

Zur Narkose und Analgesie der Mäuse wurde eine Kombination der Substanzen Midazolam (0,377 mg/mL), Fentanyl (0,377 µg/mL) und Dexmedetomidin (0,189 mg/mL) verwendet. Diese Mischung wurde initial intraperitoneal verabreicht (400 µL Bolus). Nach Erreichen des Toleranzstadiums wurde der Hals in Rückenlagerung ventral in der Medianlinie über einen etwa 5 mm langen Hautschnitt eröffnet, um einen Katheter in der Trachea und der *Vena*

*jugularis* zu platzieren. Der Trachealkatheter wurde mit einem Kleintierbeatmungsgerät verbunden und die Maus mit einem Beatmungsvolumen von 230  $\mu\text{L}$ , bei einer Frequenz von 170/min, beatmet. Der Venenkatheter wurde zur kontinuierlichen Verabreichung des Narkotikagemisches mit einer Spritzenpumpe verbunden (Flussrate 90  $\mu\text{L/h}$ ).

### **2.3.3.2 Präparation des Musculus cremaster**

Die Präparation des *M. cremaster* erfolgte nach der Methode von Baez [229]. Der Präparationsbereich wurde mit 37 °C warmer Salzlösung superfundiert. Der rechte Hoden wurde in der Leiste palpirt und zunächst nach ventral geschoben. Die Leistenhaut wurde mit einer stumpfen Pinzette angehoben und rechts lateral des Schwanzansatzes eingeschnitten. Der Schnitt wurde nach lateral in Richtung des rechten Hinterlaufs um etwa 10 mm erweitert. Durch Druck auf die Bauchdecke wurde der Hoden wieder ins Skrotum zurückverlagert und so der Muskel in seiner ganzen Größe dargestellt. Am kaudalen Pol des *M. cremaster* wurde eine Einzelknopfnah mit einem atraumatischen, monofilen Polypropylen-Faden gesetzt und der Muskel dann mit leichtem Zug vertikal aufgespannt. Das Bindegewebe wurde vorsichtig mit einer Schere entfernt. Dann wurde der mobilisierte Skrotalsack über der Untersuchungsplatte ausgelagert und mittels des Fadens der initialen Einzelknopfnah im Silikonring des Mikroskopier-Tisches fixiert. Ventralseitig wurde der *M. cremaster* mit der Schere in kaudal-kranieller Richtung eröffnet. Der Hoden wurde vom Muskel getrennt, indem das ihn haltende Band scharf durchtrennt wurde, und zurück in die Bauchhöhle verlagert. Die Schnittländer des *M. cremaster* wurden an beiden Seiten mit je zwei Einzelknopfnähten gegriffen und die Fäden seitlich im Silikonring fixiert, sodass sich das *Cremaster*-Präparat flächig auf der Untersuchungsplatte ausbreitete. Die auf 37 °C erwärmte Salzlösung wurde über eine Schlauchverbindung zugeleitet, so bildete das Superperfusat einen konstanten Flüssigkeitsfilm auf dem Präparat. Die Testsubstanzen wurden dem Superperfusat über eine Rollerpumpe beigemischt, so konnte eine gleichmäßige Verteilung auf dem *M. cremaster* erreicht werden. Der Gesamtfluss des Superperfusats betrug 8 mL/min. Der Abfluss erfolgte an drei Seiten des Präparats zwischen Untersuchungsplatte und Silikonring.

### **2.3.3.3 Intravitalmikroskopie**

Die intravitalmikroskopischen Untersuchungen der Arteriolen im Skelettmuskel erfolgten an der maschinell beatmeten und mittels Infusion narkotisierten und analgesiieren Maus. Zur Erholung des Präparates wurde die Untersuchung erst 30 min. nach der Präparation begonnen. Zunächst wurden im Präparat acht bis zwölf geeignete Arteriolen mit unterschiedlichen Innendurchmessern zwischen 15 und 40  $\mu\text{m}$ , ausreichendem Ruhetonus und guter Sichtbarkeit ausgewählt und in fester Reihenfolge im mikroskopischen Bild

dargestellt und fokussiert. Für jede Substanz und Konzentration wurden die Arteriolen zuerst im unstimulierten Ruhezustand aufgezeichnet. Anschließend erfolgte die Substanzugabe per Rollerpumpe in aufsteigender Konzentration (Substanzen und Konzentrationsbereiche in Tab. 17). Nach 1 min. wurden Bilder der Arteriolen in Anwesenheit der Substanz aufgezeichnet (in Echtzeit auf VHS-Kassette), dabei wurden alle Arteriolen zweimal dargestellt. Vor der nächsten Substanzzugabe erfolgten ein Waschschrift und die Einhaltung einer fünfminütigen Pause, um die Rückkehr des arteriolen Durchmessers zum Ausgangszustand zu gewährleisten. Vor Versuchsbeendigung wurde dem Superperfusat zur Bestimmung des maximalen Durchmessers eine Kombination der Vasodilatoren Acetylcholin, Adenosin und Natrium-Nitroprussid (Konzentration auf dem Präparat jeweils  $3 \times 10^{-5}$  mol/L) zugefügt. Anschließend wurde das Tier durch intravenöse Injektion einer letalen Pentobarbital-Dosis getötet.

Tab. 17: Bereich der zugegebenen Konzentrationen für 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, 8-iso-PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGE<sub>2</sub> und U-46619 für intravitalmikroskopische Untersuchungen der Arteriolen im *M. cremaster*.

Substanz	Konzentrationsbereich
8-iso-PGF <sub>2α</sub>	$1 \times 10^{-7} - 3 \times 10^{-5}$
8-iso-PGE <sub>2</sub>	$1 \times 10^{-7} - 3 \times 10^{-5}$
PGF <sub>2α</sub>	$1 \times 10^{-7} - 3 \times 10^{-5}$
PGE <sub>2</sub>	$1 \times 10^{-7} - 3 \times 10^{-5}$
U-46619	$1 \times 10^{-7} - 3 \times 10^{-5}$

#### 2.3.3.4 Auswertung

Zur Bestimmung des jeweiligen Gefäßdurchmessers wurden auf das stehende Videobild zwei parallele Linien an die Innenwände der zuvor ausgewählten Abschnitte der Arteriolen angelegt. Der Abstand der Parallelen entsprach dem Gefäßdurchmesser in  $\mu\text{m}$ . Zur Kalibrierung und Kontrolle wurden Videoaufnahmen eines Objektmikrometers vermessen. Die Änderung des Gefäßdurchmessers einer Arteriole wurde als Dilatationskapazität in Prozent ( $D_{\text{Kap}}$ ) angegeben. Trat nach Substanzgabe eine Vasodilatation auf, wurde die Dilatationskapazität mit folgender Formel berechnet:

$$D_{\text{Kap}} [\%] = \frac{D_{\text{Substanz}} [\mu\text{m}] - D_{\text{Ruhe}} [\mu\text{m}]}{D_{\text{max}} [\mu\text{m}] - D_{\text{Ruhe}} [\mu\text{m}]} \cdot 100\%$$

$D_{\text{Substanz}}$ : Durchmesser nach Substanzzugabe [ $\mu\text{m}$ ] (größter Wert der Doppelbestimmung)

$D_{\text{Ruhe}}$ : Durchmesser im Ruhezustand vor Substanzzugabe [ $\mu\text{m}$ ]

$D_{\text{max}}$ : Durchmesser bei maximaler Dilatation [ $\mu\text{m}$ ]

Trat nach Substanzgabe eine Vasokonstriktion auf, wurde die Dilatationskapazität mit folgender Formel berechnet:

$$D_{\text{Kap}} [\%] = \frac{D_{\text{Substanz}} [\mu\text{m}]}{D_{\text{Ruhe}} [\mu\text{m}]} \cdot 100\% - 100\%$$

Bei Dilatation der Arteriole nimmt  $D_{\text{Kap}}$  einen positiven, bei Konstriktion einen negativen Wert an. Aus den berechneten Dilatationskapazitäten einzelner Arteriolen wurde pro Genotyp für jede zugegebene Konzentration das arithmetische Mittel ermittelt.

Die Intravitalmikroskopie-Versuche fanden in Zusammenarbeit mit der AG Prof. Dr. Cor de Wit, Institut für Physiologie, Universität zu Lübeck, statt und wurden von Jakob Speiser durchgeführt.

### 2.3.4 Implantation osmotischer Minipumpen

Zur kontinuierlichen Verabreichung von 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  bzw. Vehikel wurden den Mäusen osmotische Minipumpen implantiert. Dies stellt die schonendste Methode zur langfristigen, dauerhaften Applikation von 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  dar, da außer bei der initialen Implantation keine weiteren Manipulationen an den Tieren notwendig waren und wiederholte subkutane oder intraperitoneale Injektionen entfielen. Die Pumpen wurden den Tieren unter Isofluran-Kurznarkose subkutan im Nackenfett platziert. Dazu wurde dorsal über einen etwa 1 cm langen Hautschnitt eine subkutane Tasche freipräpariert, in die die Pumpe implantiert wurde. Anschließend wurde der Schnitt mit Wundklipps verschlossen und desinfiziert. Zur Analgesie erhielten die Tiere unmittelbar vor dem Eingriff einmalig Buprenorphin (0,05 mg/kg Körpergewicht (KG); subkutan) sowie Carprofen (5 mg/kg KG; subkutan) als lang wirksames Analgetikum (24 h). Von einer weiteren Analgesie konnte abgesehen werden, da es sich bei diesem Eingriff lediglich um einen kleinen Hautschnitt handelte. Postoperativ wurde den Tieren Weichfutter und Trinkwasser im Käfig bereitgestellt. Um unerwartete Veränderungen des Gesundheitszustandes rechtzeitig zu bemerken, erfolgte eine regelmäßige Kontrolle der Wundheilung und des Tierverhaltens. 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  bzw. das Vehikel wurde im freilaufenden Tier über einen Zeitraum von vier Wochen verabreicht. Danach wurden die Pumpen nach Tötung der Tiere explantiert. Verwendet wurden Alzet<sup>®</sup>-Pumpen vom Modell 1004 mit einem Reservoirvolumen von 100  $\mu\text{L}$  (Länge: 1,5 cm; Gewicht: 0,4 g). Die Freisetzungs-

geschwindigkeit betrug  $0,11 \mu\text{L/h}$ . Die Pumpen wurden vor der Implantation mit einer 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Lösung ( $c = 0,227$  bzw.  $1,135 \text{ mg/mL}$ , ausgehend von einem Maus-Körpergewicht von  $25 \text{ g}$ ) beladen. Daraus resultiert eine kontinuierliche Abgabe von  $1$  bzw.  $5 \mu\text{g}$  8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> /kg KG/h. Als Kontrolltiere dienten Mäuse, denen die gleichen Minipumpen implantiert wurden. Diese enthielten nur das Vehikel:  $10\%$  Ethanol in isotonischer Kochsalzlösung.

### 2.3.5 Tail-cuff-Blutdruckmessung

Die Ermittlung des systolischen Blutdruckes der Mäuse erfolgte mittels nicht-invasiver Plethysmographie an der Schwanzarterie [230]. Die Methode wird auch als *Tail-cuff*-Blutdruckmessung bezeichnet. Während der Messung saßen die wachen Tiere in einer abgedunkelten Box. Die arterielle Pulswelle wurde mit einem auf dem Schwanz aufgesetzten Piezoelement gemessen und optisch auf einem Bildschirm sichtbar gemacht (Abb. 15). Genau wie beim Menschen wurde mit einer kleinen Blutdruckmanschette die Schwanzarterie über den erwarteten Blutdruck hinaus komprimiert und der Druck wurde langsam abgelassen. Das Wiederauftreten der Pulswelle zeigte den systolischen Blutdruck an. Insgesamt setzte sich eine Messung aus 13 konsekutiven Einzelmessungen pro Maus zusammen, wovon die ersten drei jeweils verworfen wurden. Die mit dem Messgerät Hatteras Instruments SC1000 gekoppelte Software SC1000 Comm for Windows<sup>®</sup> ermittelte Mittelwert und Standardabweichung aus den nachfolgenden 10 Einzelmessungen. Vor den ausgewerteten Messungen im zeitlichen Verlauf des Versuchsvorhabens wurden im Vorhinein drei unabhängige Adaptionmessungen pro Maus durchgeführt.

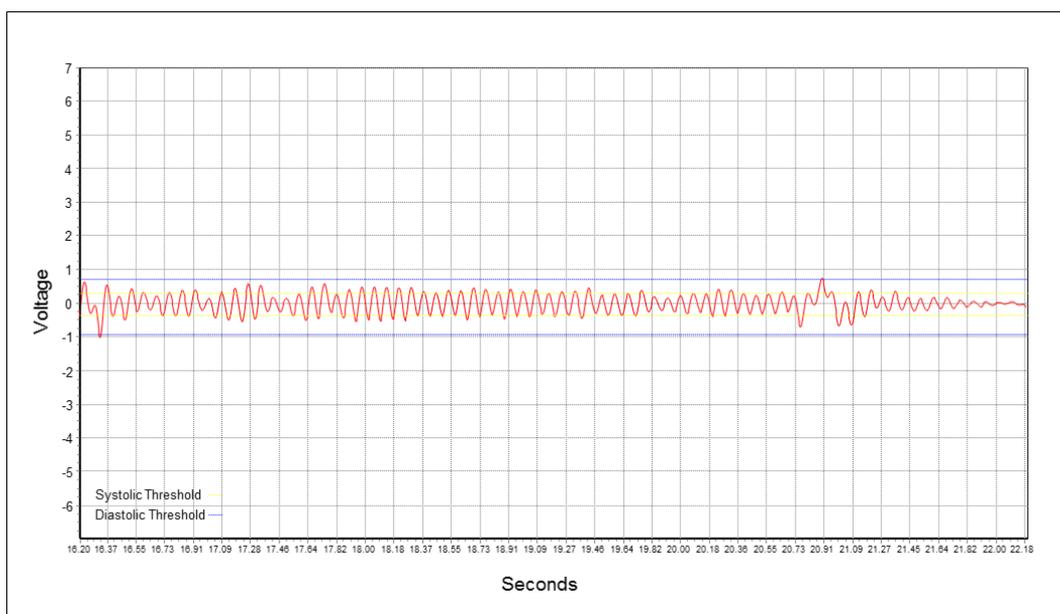


Abb. 15: Originalaufnahme einer beispielhaften *Tail-cuff*-Messung.

### 2.3.6 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

Die Produktion von Superoxid wurde mittels Elektronenspinresonanz (EPR; *electron paramagnetic resonance*)-Spektroskopie gemessen. Die Quantifizierung der freien Superoxid-Anionen erfolgte dabei wie bereits von Diebold/Petry et al. und Rzymiski/Petry et al. beschrieben [231] [232].

Zunächst wurde ein 1-Hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin (CMH)-haltiger *Spin Trap*-Puffer frisch hergestellt. Der *Spin Trap* CMH bindet die kurzlebigen Superoxid-Anionen und ermöglicht so die Quantifizierung eines langlebigeren Spin-Adduktes. Die verwendeten Lungen, Herzen und Leukozyten wurden aus Tieren, die zuvor vier Wochen unter hypoxischen (10% O<sub>2</sub>) oder normoxischen Bedingungen gehalten wurden, explantiert, homogenisiert und zweimal in Krebs-HEPES-Puffer gewaschen. Nach 20-minütiger Inkubation der Gewebeproben mit dem *Spin Trap*-Puffer (100 µM CMH) auf Eis wurde dieser in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Messung wurde an einem *E-scan* Spektrometer durchgeführt. Die Aufnahme der Spektren erfolgte über 10 Minuten mit folgenden Parametern:

Temperatur: 37 °C

Mikrowellenenergie: 23,89 mW

Modulationsamplitude: 2,93 G

Modulationsfrequenz: 86 kHz

Die Elektronenspinresonanz-Spektroskopie wurde im Rahmen des Deutschen Zentrums für Herz-Kreislauf-Forschung e.V. (DZHK) durch eine Kooperation mit Dr. Zuwen Zhang, Dr. Andreas Petry und Prof. Dr. Agnes Görlach, Experimentelle und Molekulare Kinderkardiologie, Deutsches Herzzentrum München (DHM) an der TU München, durchgeführt (*Shared Expertise (SE) 040: Redox Plattform DHM*).

### 2.3.7 Metabolom-Messung

180 Metabolite wurden mit dem AbsoluteIDQ<sup>®</sup> p180 Kit (Biocrates, Innsbruck) mittels Flüssigkeitschromatographie (LC)- und Fließinjektionsanalyse (FIA)-Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) im Mausplasma gemessen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem sog. *metaP-Server* [233].

Die Probenaufbereitung erfolgte anhand des AbsoluteIDQ<sup>®</sup> p180 Kit-*User Manual*: Im ersten Schritt wurden pro *well* 10 µL des internen Standards auf eine 96-*well*-Filterplatte pipettiert. Nachfolgend wurden jeweils 10 µL der zu untersuchenden Mausplasmen hinzugegeben. Nach

30-minütiger Trocknung im Stickstoffstrom erfolgte die Derivatisierung der Aminosäuren und biogenen Amine mittels 20-minütiger Inkubation mit 5% Phenylisothiocyanat (PITC). Nach erneuter 45-minütiger Trocknung im Stickstoffstrom wurden die Metabolite mit 300 µL der organischen Extraktionslösung für 30 Minuten bei 450 rpm extrahiert und anschließend durch zweiminütige Zentrifugation bei 100 x g filtriert. 150 µL des Filtrats wurden zur LC-MS/MS-Messung in eine zweite 96-well-Platte transferiert und mit 150 µL H<sub>2</sub>O verdünnt. Zum restlichen Filtrat wurden vor der FIA-MS/MS-Messung 400 µL des MS-Fließmittels pipettiert.

Die Metabolom-Messung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Dorothee Atzler, Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE), durchgeführt und durch Bereitstellung der Geräte von Prof. Dr. Jerzy Adamski, Institut für Experimentelle Genetik, Genome Analysis Center (GAC), Helmholtz Zentrum München, ermöglicht.

### 2.3.8 AAV-Injektion

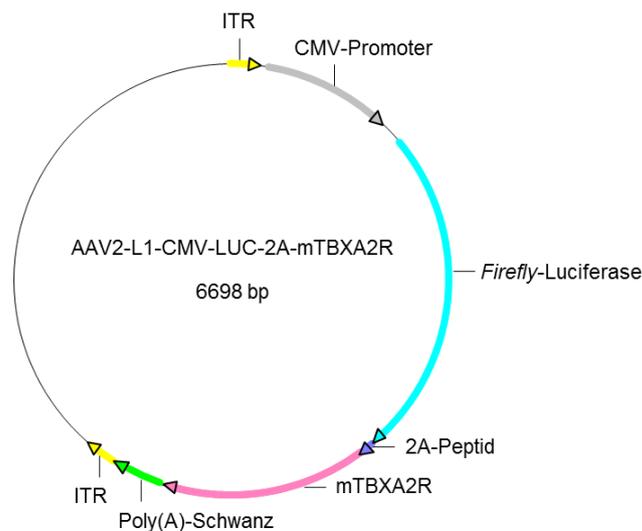


Abb. 16: Schematische Darstellung des AAV2-L1-CMV-LUC-2A-mTBXA2R-Vektors. Die Expressionskassette setzt sich zusammen aus: ITR, CMV-Promoter, Firefly-Luciferase-Gen, 2A-Peptid, mTBXA2R-Gen, Poly(A)-Schwanz und ITR. ITR inverted terminal repeats; CMV-Promoter Cytomegalievirus-Promoter; mTBXA2R muriner Thromboxan-Rezeptor; bp Basenpaare.

Um in TP-KO-Mäusen eine zielgerichtete Überexpression des murinen TP in pulmonalen Endothelzellen zu erreichen, erfolgte die intravenöse Injektion des Adeno-assoziierten-Virus (AAV)-Vektors AAV2-L1-CMV-LUC-2A-mTBXA2R. Hierbei handelt es sich um einen Tropismus-modifizierten Vektor auf Basis von AAV-Serotyp 2 (AAV2), der durch Einführung eines Lungen-gerichteten Heptapeptids (L1) auf der Kapsidoberfläche Cytomegalievirus-Promoter-gesteuert (CMV) für eine pulmonal-endothelspezifische Expression der *Firefly*-

Luciferase (LUC) und des murinen Thromboxan-Rezeptor (mTBXA2R) sorgt [234]. LUC- und mTBXA2R-Gen sind über ein 2A-Peptid (2A) verbunden (Abb. 16).

Die intravenöse Injektion des AAV-Vektors in die Schwanzvene erfolgte entweder unter Isofluran-Kurzarkose, oder die Versuchstiere wurden kurzzeitig in dafür vorgesehene Fixationsröhren gesetzt. Dafür wurden  $5 \times 10^{10}$ ,  $1,25 \times 10^{11}$  oder  $2,5 \times 10^{11}$  AAV-Partikel pro Maus in einem Volumen von 150  $\mu\text{L}$  *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) oder PBS gelöst. Den Placebo-Tieren wurde stattdessen 150  $\mu\text{L}$  HBSS bzw. PBS injiziert.

Der AAV-Vektor AAV2-L1-CMV-LUC-2A-mTBXA2R wurde von Dr. Jakob Körbelin, AG Rezeptortargeting, II. Medizinische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE), generiert [234].

### 2.3.9 Biolumineszenz-Imaging

Die Aktivität der Luciferase wurde mittels Biolumineszenz-Imaging (BLI) untersucht. Dazu wurden den Tieren 10 Tage nach Injektion des AAV-Vektors 150 mg/kg KG *Firefly-D-Luciferin* intraperitoneal injiziert. Nach 10 min. wurde von einer ausreichenden Distribution ausgegangen, sodass die Aufnahmen der Tiere mit dem *In Vivo Imaging System (IVIS) 200* (Xenogen) unter Isofluran-Kurzarkose durchgeführt werden konnten. Die Tötung der Tiere erfolgte mittels zervikaler Dislokation. Anschließend wurden auf Petrischalen zusätzliche Aufnahmen explantierter Organe (Lunge, Herz, Aorta und Pulmonalarterie) durchgeführt.

Das Biolumineszenz-Imaging wurde in Zusammenarbeit mit Agnes Hunger und Dr. Jakob Körbelin, AG Rezeptortargeting, II. Medizinische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE), durchgeführt.

### 2.3.10 Ligation der Arteria carotis

Das angewandte Intima-Hyperplasie-Modell wurde durchgeführt wie bereits von Kumar et al. und Shimizu et al. beschrieben [183] [222]. Nach Freilegung der linken *Arteria carotis communis* wurde diese unmittelbar proximal der Bifurkation permanent ligiert. Die Halswunde wurde vernäht. Nach 28 Tagen wurden beide Karotiden (links verletzt und rechts unverletzt) explantiert, anschließend für histologische Untersuchungen in 4% Formaldehyd fixiert und in Paraffinblöcke eingebettet. Die angefertigten Schnitte wurden einer HE-Färbung unterzogen und danach mittels ImageJ morphometrisch vermessen. Die Differenz aus der Fläche unter der *Lamina elastica externa* und der Fläche unter der *Lamina elastica interna* ergibt die Fläche der Media, die Differenz aus der Fläche unter der *Lamina elastica interna* und der Fläche des

Lumens ergibt die Fläche der Intima. Zur S1P-Bestimmung im Serum erfolgte vor Ligation eine Blutentnahme mittels submandibulärer Punktion und nach Ligation eine finale Blutentnahme.

Diese Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Astrid Becker, Dr. Markus Geißen und Dr. Günter Daum, Klinik für Gefäßmedizin, Universitäres Herzzentrum Hamburg (UHZ), durchgeführt.

## 2.4 Klinische Studien

### 2.4.1 ACS-Studie

Herr Prof. Dr. Rainer H. Böger, Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf (UKE), übernahm die Leitung der Studie. Stellvertretend verantwortlich für die Durchführung der Studie waren Prof. Dr. Karsten Sydow, Universitäres Herzzentrum Hamburg (UHZ), sowie als Leiter der Analytik PD Dr. Edzard Schwedhelm, Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf (UKE). Die Probandenrekrutierung im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) und in der Asklepios Klinik Hamburg Nord (AK Nord) fand in den Jahren 2004 - 2009 statt. Pro Proband wurden vor der durchgeführten Koronarangiographie 20 mL Spontanurin, 10 mL Blutplasma und 10 mL Blutserum gewonnen.

Einschlusskriterien:

- Alter > 18 Jahre
- Stabile Angina pectoris-Symptomatik nach geltenden Richtlinien
- Akutes Koronarsyndrom nach geltenden Richtlinien
- Angiographischer Nachweis einer Koronaren Herzerkrankung
- Vorliegen der schriftlichen Einverständniserklärung des Probanden

Ausschlusskriterien:

- Alter < 18 Jahre
- Terminale Niereninsuffizienz
- Unmittelbar vorausgehende Reanimation

### 2.4.2 iP4-Studie

Die iP4-Studie wurde in Frankreich unter der Leitung von Prof. Dr. Jean-Luc Crakowski durchgeführt [77]. Die Probandenrekrutierung in 6 Zentren des *French Network for Pulmonary Hypertension* (Clamart, Marseille, Grenoble, Strasbourg, Nancy und Toulouse) fand in den

Jahren 2003 - 2006 statt. Pro Proband wurden während der initialen Rechtsherzkatheterisierung 80 mL Blutplasma und 80 mL Blutserum gewonnen.

Einschlusskriterien:

- Pulmonale Arterielle Hypertonie nach geltenden Richtlinien, bis zum Einschluss behandlungsnaiv
- Vorliegen der schriftlichen Einverständniserklärung des Probanden

Die iP4-Studie setzt sich aus Patienten mit idiopathischer PAH (iPAH), hereditärer PAH, durch Medikamente oder Toxine verursachter PAH, mit Bindegewebserkrankungen oder angeborenen Herzfehlern assoziierter PAH und PVOD zusammen.

## 2.5 Statistik

Die statistischen Analysen dieser Arbeit wurden mit der *GraphPad Prism Software Version 5* durchgeführt. Sofern nicht anders vermerkt, werden die Daten als arithmetischer Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD) dargestellt. Der Vergleich der Mittelwerte zweier Gruppen erfolgte mittels zweiseitigem t-Test, für Variablen mit mehr als zwei Gruppen mittels einfaktorieller Varianzanalyse (*one-way ANOVA; analysis of variance*), wenn nicht gesondert vermerkt. Für alle Analysen wurde ein p-Wert  $< 0,05$  als Kriterium für statistische Signifikanz gewählt. Die statistischen Analysen der klinischen Studien wurden mit *IBM® SPSS® Statistics Version 22* durchgeführt. Die Daten werden als Median sowie unteres (25. Perzentil) und oberes Quartil (75. Perzentil) dargestellt. Als Kriterium für statistische Signifikanz wurde auch hier ein p-Wert  $< 0,05$  gewählt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 8-iso-PGF<sub>2α</sub>

#### 3.1.1 Nachweis des TP

Die in dieser Arbeit verwendeten TP-KO-Mäuse wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Shuh Narumiya, Department of Pharmacology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Japan, zur Verfügung gestellt [50]. Der Nachweis der TP-Defizienz erfolgte mittels klassischer PCR (Kap. 0), quantitativer *real-time*-PCR (Kap. 3.1.1.2), Western-Blot (Kap. 3.1.1.3) sowie Immunhistochemie (Kap. 3.1.1.4).

##### 3.1.1.1 Genotypisierung: Qualitativer Nachweis des TP mittels klassischer PCR

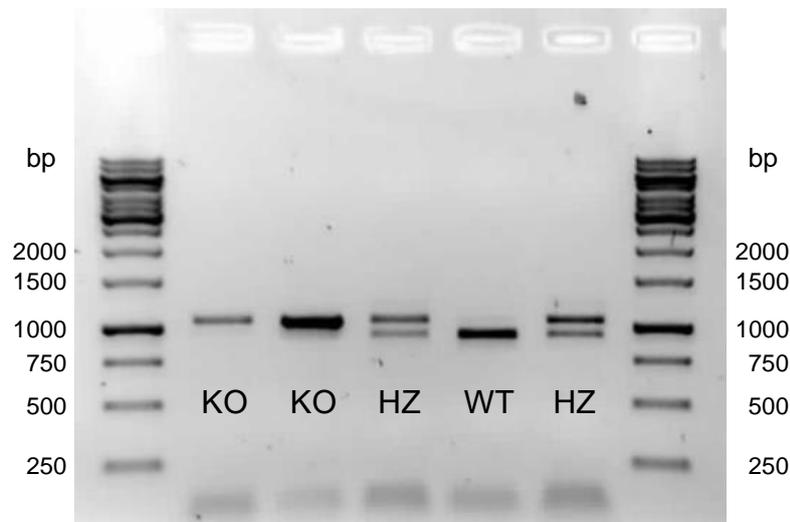


Abb. 17: 1%iges Agarosegel der PCR-Amplifikate zur Genotypisierung von TP-KO-, TP-WT- und heterozygoten Mäusen. Fragmentlängen: TP-KO 1100 bp, TP-WT 900 bp, heterozygote Mäuse 1100 und 900 bp. 1100 bp oberhalb bzw. 900 bp unterhalb der Bande von 1000 bp der DNA-Leiter *GeneRuler 1kb DNA Ladder* (Thermo Scientific). bp Basenpaare; WT TP-WT-Mäuse; KO TP-KO-Mäuse, HZ heterozygote Mäuse.

Zur Genotypisierung der TP-KO-, TP-WT- und heterozygoten Mäuse wurde eine klassische PCR durchgeführt (Kap. 2.2.1.2). Pro Ansatz wurden drei Primer verwendet: der Forward-Primer für beide Genotypen und je ein spezifischer Reverse-Primer pro Genotyp, sodass bei den homozygoten Mäusen jeweils eine Bande zu erwarten war, bei den heterozygoten hingegen zwei Banden. Die Amplifikate der TP-WT-Mäuse hatten eine Größe von 900 bp und

wanderten schneller durch das 1%ige Agarosegel als die Amplifikate der TP-KO-Mäuse, die mit integrierter Neo-Kassette aus 1100 bp bestanden.

### 3.1.1.2 Nachweis des TP auf Transkriptionsebene

Die TP-Defizienz sollte neben dem qualitativen Nachweis zur Genotypisierung (Kap. 3.1.1.1) auch quantitativ auf Transkriptionsebene nachgewiesen werden. Dafür wurde die TP-Expression in explantierten Herzen und Nieren von TP-WT- und TP-KO-Mäusen mittels quantitativer *real-time*-PCR bestimmt.

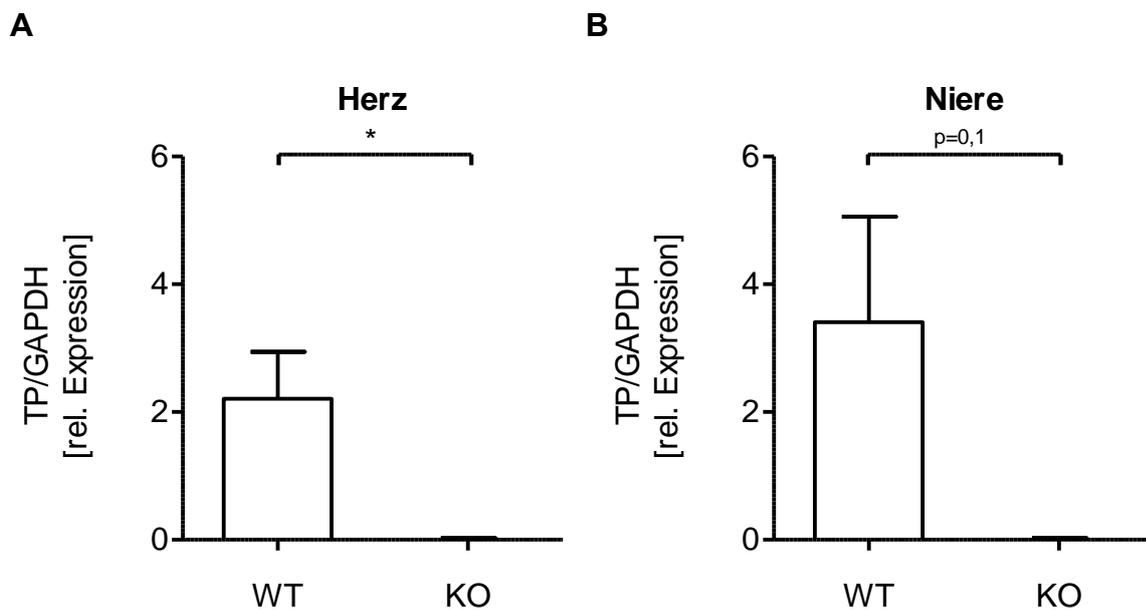


Abb. 18: Relative Expression des murinen TP in **A** explantierten Herzen und **B** explantierten Nieren von TP-WT- (**A** n=7; **B** n=6) und -KO-Mäusen (**A** n=4; **B** n=4). Als House-Keeping-Gen wurde GAPDH verwendet. Dargestellt sind MW  $\pm$  SEM. GAPDH Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; \*  $p < 0,05$  (ungepaarter t-Test).<sup>15</sup>

Die TP-Expression konnte nur in TP-WT-Mäusen nachgewiesen werden, sowohl in explantierten Herzen als auch Nieren (Abb. 18). In Herzen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen TP-WT- und TP-KO-Mäusen (Abb. 18 A). In den TP-KO-Mäusen konnte, wie bei einer TP-Defizienz erwartet, keine TP-mRNA detektiert werden.

<sup>15</sup> modifiziert nach Dissertation Matthias Werner, Hamburg 2014

### 3.1.1.3 Nachweis des TP auf Proteinebene

Im nächsten Schritt sollte die TP-Expression auf Proteinebene mittels Western Blot nachgewiesen werden. Hierzu wurden die Proteine, die zuvor aus TP-WT- und TP-KO-Mäusen explantierten Herzen und Nieren isoliert wurden, durch eine 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend TP-Antikörper unterschiedlicher Hersteller verwendet.

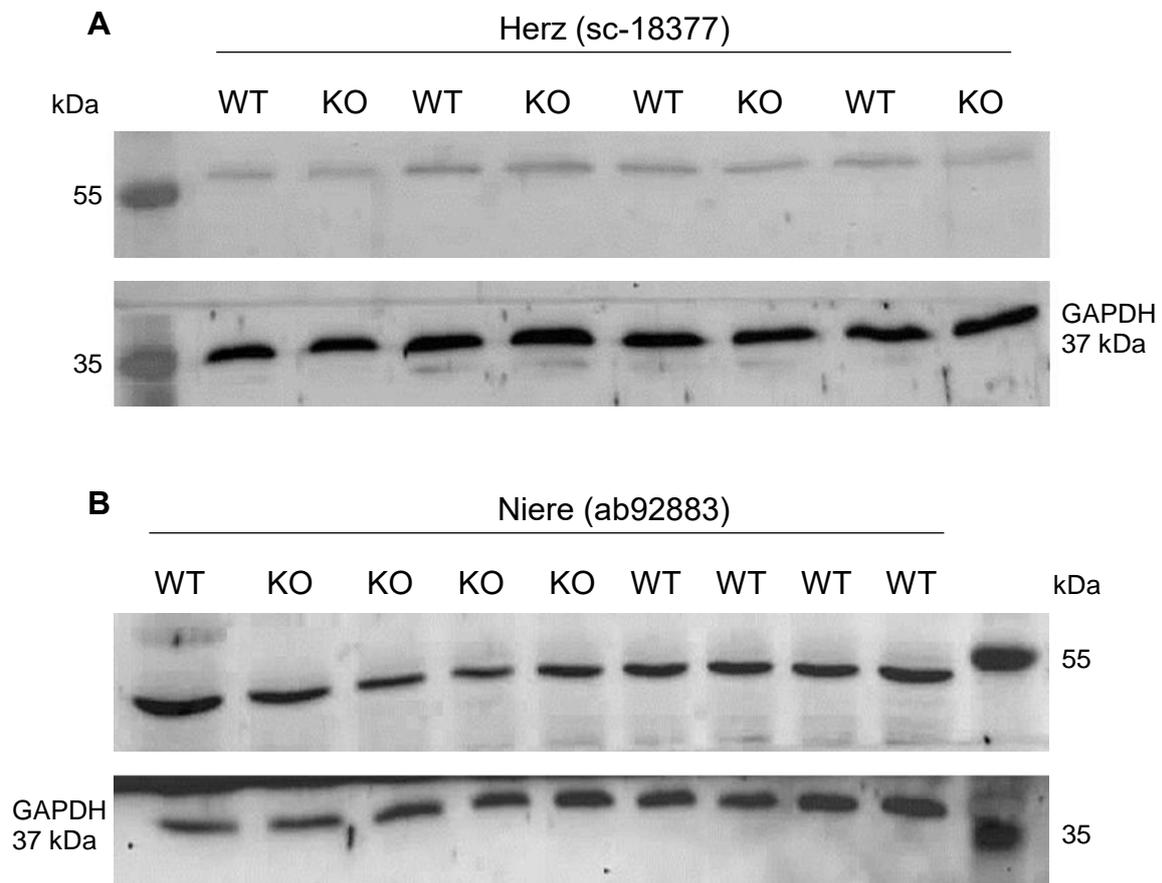


Abb. 19: Detektion des TP auf Proteinebene mittels Western Blot in A explantierten Herzen und B explantierten Nieren von TP-WT- und TP-KO-Mäusen. Aufgetragen jeweils 50 µg Protein, GAPDH als Ladungskontrolle. Antikörper: A sc-18377 mit erwarteter Bande bei 58 kDa (TXA2R, T-20; Santa Cruz Biotechnology), B ab92883 mit erwarteter Bande bei 55 kDa (Anti-Thromboxane A2 receptor antibody; abcam), A + B sc-25778 mit erwarteter Bande bei 37 kDa (GAPDH, FL-335; Santa Cruz). kDa Kilodalton; GAPDH Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase.<sup>16</sup>

Für alle getesteten Antikörper zeigte sich in den Western Blots bei beiden Organen kein Unterschied zwischen TP-WT- und TP-KO-Mäusen. Zwei repräsentative Western Blots mit Proteinen aus Herz und Niere, jeweils mit unterschiedlichen Antikörpern behandelt, wurden

<sup>16</sup> modifiziert nach Dissertation Matthias Werner, Hamburg 2014

abgebildet (Abb. 19). Somit konnte mittels Western-Blot nicht zwischen TP-WT- und TP-KO-Mäusen differenziert werden.

#### **3.1.1.4 Nachweis des TP mittels Immunhistochemie**

Nach den molekularbiologischen Nachweisen sollte der TP in histologischen Schnitten detektiert werden. Außerdem sollte die Lokalisation des TP im Endothel überprüft werden. Dafür wurden histologische Querschnitte von explantierten Aorten aus TP-WT- und TP-KO-Mäusen mit dem Primärantikörper sc-18377 (TXA2R, T-20; Santa Cruz Biotechnology), laut Hersteller für Immunhistochemie geeignet, und anschließend Anti-Goat-Sekundärantikörper Histofine® Simple Stain (Mouse MAX PO (G); Nichirei Biosciences) behandelt, der nach Zugabe der Substratlösung eine Braunfärbung bedingt.

Für den hier getesteten Primärantikörper zeigte sich jedoch, wie zuvor in Western Blots, in den histologischen Querschnitten der Aorta thoracalis kein Unterschied zwischen TP-WT- und TP-KO-Mäusen. Zwei repräsentative histologische Querschnitte wurden abgebildet (Abb. 20). Demnach war keine Differenzierung nach Genotyp möglich. Des Weiteren konnte die vorwiegende Lokalisation des TP im Endothel der WT-Aorta anhand dieser Färbungen nicht bestätigt werden, denn in der Endothelzellschicht trat keine stärkere Braunfärbung als im umliegenden Gewebe auf.

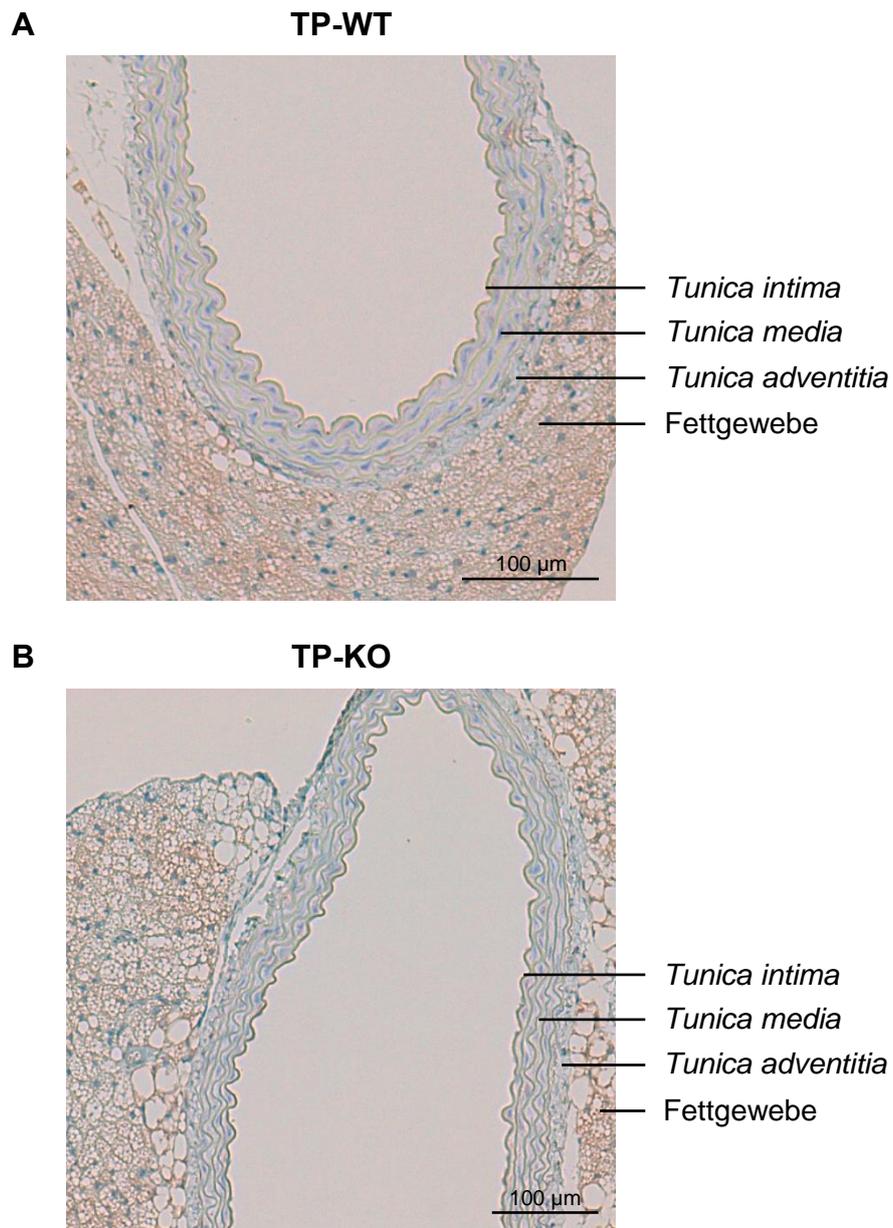


Abb. 20: Histologische Querschnitte der Aorta thoracalis **A** einer TP-WT-Maus und **B** einer TP-KO-Maus, behandelt mit Primärantikörper sc-18377 (TXA2R, T-20; Santa Cruz Biotechnology) und Anti-Goat-Sekundärantikörper Histofine® Simple Stain (Mouse MAX PO (G); Nichirei Biosciences). Maßstab jeweils unten rechts.<sup>17</sup>

<sup>17</sup> modifiziert nach Dissertation Matthias Werner, Hamburg 2014

### 3.1.2 Phänotypisierung von TP-KO und WT-Geschwistern

#### 3.1.2.1 Einfluss des Genotypes auf die Produktion von Superoxid in Normoxie und Hypoxie

Um den Einfluss des TP-Genotypes auf die Produktion von Superoxid zu untersuchen, wurde die Produktion von Superoxid mittels Elektronenspinresonanz-Messung (EPR) bestimmt. Die EPR-Messung erfolgte in mazeriertem Lungen- sowie Herzgewebe und isolierten Leukozyten von TP-WT- und TP-KO-Mäusen, die unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen gehalten wurden.

In mazeriertem Lungengewebe zeigte sich sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie kein Unterschied hinsichtlich des Genotypes (jeweils WT vs. KO; Normoxie:  $0,0031 \pm 0,0005$  vs.  $0,0029 \pm 0,0007$  nM/min/ $\mu$ g Protein; Hypoxie:  $0,0013 \pm 0,0003$  vs.  $0,0015 \pm 0,0002$  nM/min/ $\mu$ g Protein; Abb. 21). Unabhängig vom Genotyp war die Superoxid-Produktion unter Hypoxie geringer (jeweils Normoxie vs. Hypoxie; WT:  $0,0031 \pm 0,0005$  vs.  $0,0013 \pm 0,0003$  nM/min/ $\mu$ g Protein; KO:  $0,0029 \pm 0,0007$  vs.  $0,0015 \pm 0,0002$  nM/min/ $\mu$ g Protein).

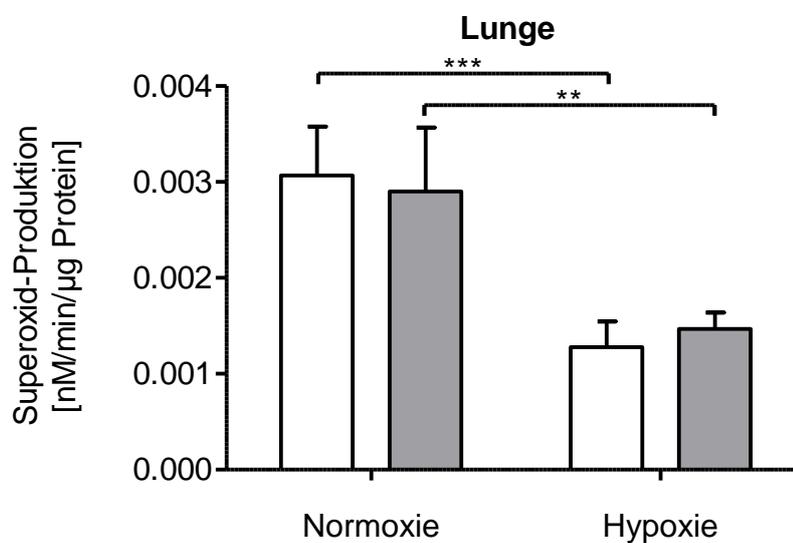


Abb. 21: Superoxid-Produktion, mittels EPR gemessen in nM/min/ $\mu$ g Protein, in mazeriertem Lungengewebe von TP-WT- (□; Normoxie n=3; Hypoxie n=4) und TP-KO-Mäusen (■; Normoxie n=4; Hypoxie n=3), die unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen gehalten wurden. Dargestellt sind MW  $\pm$  SD. \*\*\* p<0,001; \*\* p <0,01 (two-way ANOVA, Bonferroni-Post-hoc-Test).

In mazeriertem Gewebe des linken Ventrikels zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Superoxid-Produktion sowohl hinsichtlich des Genotypes als auch hinsichtlich der Hypoxie. Im rechten Ventrikel zeigte sich ebenfalls kein Unterschied (Abb. 22).

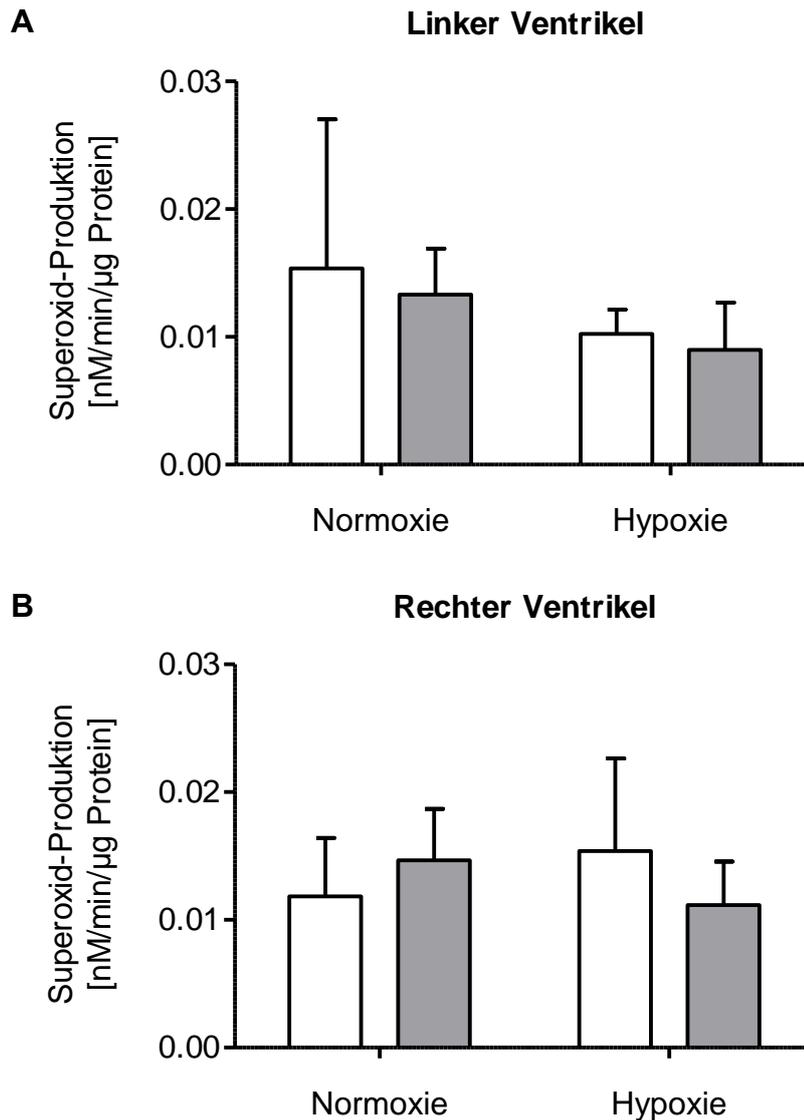


Abb. 22: Superoxid-Produktion, mittels EPR gemessen in nM/min/µg Protein, in mazeriertem Gewebe des **A** linken und **B** rechten Ventrikels von TP-WT- (□; Normoxie n=4; Hypoxie n=4) und TP-KO-Mäusen (■; Normoxie n=4; Hypoxie n=4), die unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen gehalten wurden. Dargestellt sind MW ± SD. Keine signifikanten Unterschiede (*two-way ANOVA*, Bonferroni-Post-hoc-Test).

Neben Lungen- und Herzgewebe wurde die Superoxid-Produktion außerdem in isolierten Leukozyten betrachtet. Dort zeigte sich ein Trend einer höheren Superoxid-Produktion in TP-KO-Mäusen, sowohl unter normoxischen als auch hypoxischen Haltungsbedingungen (jeweils WT vs. KO; Normoxie:  $0,0027 \pm 0,0012$  vs.  $0,0039 \pm 0,0024$  nM/min/µg Protein; Hypoxie:  $0,0020 \pm 0,0002$  vs.  $0,0067 \pm 0,0050$  nM/min/µg Protein; Abb. 23).

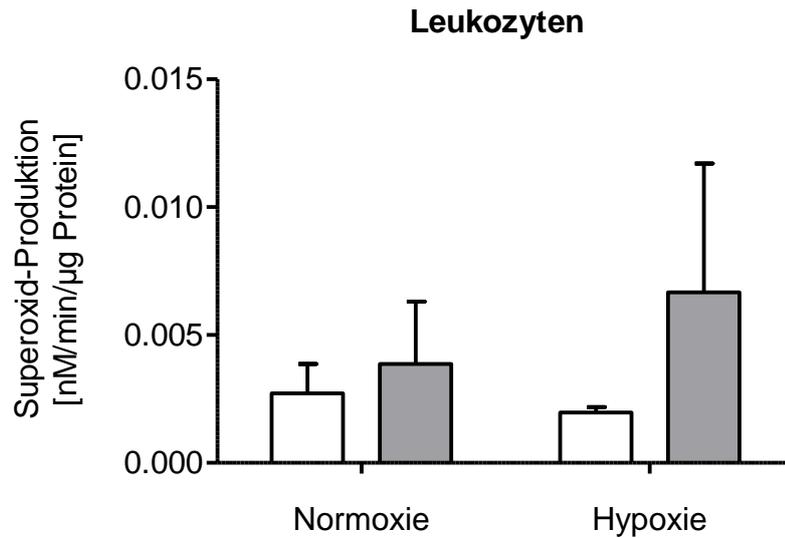


Abb. 23: Superoxid-Produktion, mittels EPR gemessen in nM/min/µg Protein, in isolierten Leukozyten von TP-WT- (□; Normoxie n=3; Hypoxie n=3) und TP-KO-Mäusen (■; Normoxie n=3; Hypoxie n=5), die unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen gehalten wurden. Dargestellt sind MW ± SD. Keine signifikanten Unterschiede (two-way ANOVA, Bonferroni-Post-hoc-Test).

### 3.1.2.2 Einfluss des Genotypes auf das metabolische Profil von TP-KO und WT-Geschwistern

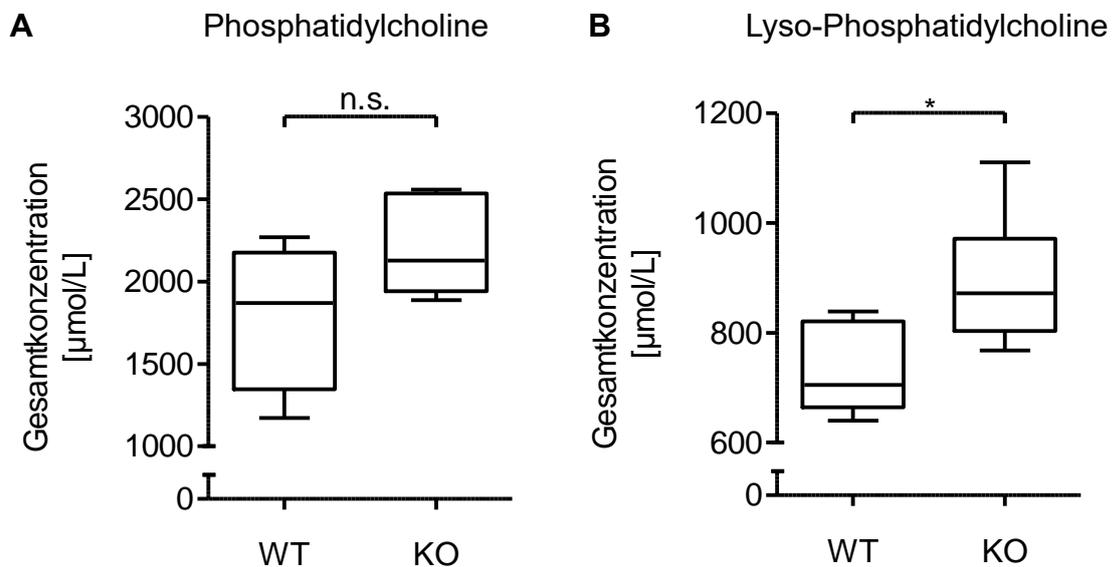


Abb. 24: Gesamtkonzentration, angegeben in µmol/L, von **A** Phosphatidylcholinen und **B** Lyso-Phosphatidylcholinen, jeweils in TP-WT- (n=6) und TP-KO-Mäusen (n=6). Dargestellt sind Median und *interquartile range* (IQR). n.s. nicht signifikant (p=0,08); \* p<0,05 (ungepaarter t-Test).

Tab. 18: Diacyl-Phosphatidylcholine mit entsprechenden p-Werten aus Varianzanalysen hinsichtlich absoluter Konzentration und relativem Anteil an der Diacyl-Phosphatidylcholin-Gesamtkonzentration im Plasma zwischen TP-WT- und TP-KO-Mäusen. Diacyl-Phosphatidylcholine, die in beiden Fällen p-Werte > 0,2 aufwiesen, wurden nicht aufgelistet. PC aa Diacyl-Phosphatidylcholin; Cxx:y Gesamtanzahl der Kohlenstoffatome beider Diacylreste xx : Gesamtanzahl der ungesättigten Doppelbindungen beider Diacylreste y; n.s. nicht signifikant,  $p > 0,2$  (ungepaarter t-Test); ↑ erhöhte Werte in TP-KO-Mäusen; ↓ erniedrigte Werte in TP-KO-Mäusen.

Diacyl-Phosphatidylcholin	absolute Konzentration	rel. Anteil an Gesamtkonzentration
PC aa C24:0	n.s.	0,01 ↓
PC aa C26:0	n.s.	0,046 ↓
PC aa C28:1	n.s.	0,134 ↓
PC aa C32:3	0,093 ↑	n.s.
PC aa C34:2	n.s.	0,095 ↓
PC aa C36:2	0,041 ↑	n.s.
PC aa C36:3	0,132 ↑	n.s.
PC aa C36:4	0,025 ↑	n.s.
PC aa C36:6	n.s.	0,167 ↓
PC aa C38:4	0,026 ↑	n.s.
PC aa C38:5	0,030 ↑	n.s.
PC aa C38:6	0,092 ↑	n.s.
PC aa C40:1	n.s.	0,065 ↓
PC aa C40:2	0,132 ↑	n.s.
PC aa C40:3	0,095 ↑	n.s.
PC aa C40:6	0,052 ↑	n.s.
PC aa C42:5	0,041 ↑	n.s.

Um das metabolische Profil der Tiere zu untersuchen, wurden mit dem Absolute *IDQ*<sup>®</sup> p180 Kit (Biocrates, Innsbruck) 180 Metabolite aus 5 Substanzklassen im Plasma von TP-KO-Mäusen und WT-Geschwistern gemessen: darunter Acylcarnitine, Aminosäuren, Monosaccharide, Sphingolipide und Glycerophospholipide.

In der Gruppe der Glycerophospholipide zeigte die Gesamtkonzentration von Diacyl-Phosphatidylcholinen in den TP-KO-Mäusen einen Trend zu höheren Werten (Abb. 24 A). Die Gesamtkonzentration von Lyso-Phosphatidylcholinen war in den TP-KO-Mäusen erhöht (WT vs. KO:  $729 \pm 80 \mu\text{mol/L}$  vs.  $894 \pm 121 \mu\text{mol/L}$ ; Abb. 24 B).

Für eine genauere Analyse wurden anschließend die absoluten Konzentrationen und relativen Anteile an der Diacyl- bzw. Lyso- Phosphatidylcholin-Gesamtkonzentration der einzelnen Diacyl- bzw. Lyso- Phosphatidylcholine im Plasma von TP-WT- und TP-KO-Mäusen verglichen. Metabolite, die in den absoluten Konzentrationen oder den relativen Anteilen Unterschiede mit einem p-Wert  $< 0,2$  aufwiesen, wurden in Tab. 18 und Tab. 19 aufgelistet. Dabei fiel auf, dass die absoluten Konzentrationen vieler Diacyl- und Lyso-Phosphatidylcholine in TP-KO-Mäusen erhöht waren, die relativen Anteile einiger anderer Diacyl- und Lyso-Phosphatidylcholine erniedrigt. Zur Veranschaulichung sind die relativen Anteile an der Gesamtkonzentration, je von einem Diacyl- und Lyso-Phosphatidylcholin, in Boxplots dargestellt (Abb. 25).

Tab. 19: Lyso-Phosphatidylcholine mit entsprechenden p-Werten aus Varianzanalysen hinsichtlich absoluter Konzentration und relativem Anteil an der Lyso-Phosphatidylcholin-Gesamtkonzentration im Plasma zwischen TP-WT- und TP-KO-Mäusen. Lyso-Phosphatidylcholine, die in beiden Fällen p-Werte  $> 0,2$  aufwiesen, wurden nicht aufgelistet. lysoPC a Lyso-Phosphatidylcholin mit einem Acylrest; Cxx:y Anzahl der Kohlenstoffatome des Acylrestes xx : Anzahl der ungesättigten Doppelbindungen des Acylrestes y; n.s. nicht signifikant,  $p > 0,2$  (ungepaarter t-Test);  $\uparrow$  erhöhte Werte in TP-KO-Mäusen;  $\downarrow$  erniedrigte Werte in TP-KO-Mäusen.

Lyso-Phosphatidylcholin	absolute Konzentration	rel. Anteil an Gesamtkonzentration
lysoPC a C16:0	0,093 $\uparrow$	n.s.
lysoPC a C18:0	0,015 $\uparrow$	0,114 $\uparrow$
lysoPC a C18:1	0,093 $\uparrow$	n.s.
lysoPC a C18:2	0,093 $\uparrow$	n.s.
lysoPC a C24:0	n.s.	0,013 $\downarrow$
lysoPC a C26:0	0,026 $\downarrow$	$< 0,001$ $\downarrow$
lysoPC a C28:1	n.s.	0,007 $\downarrow$

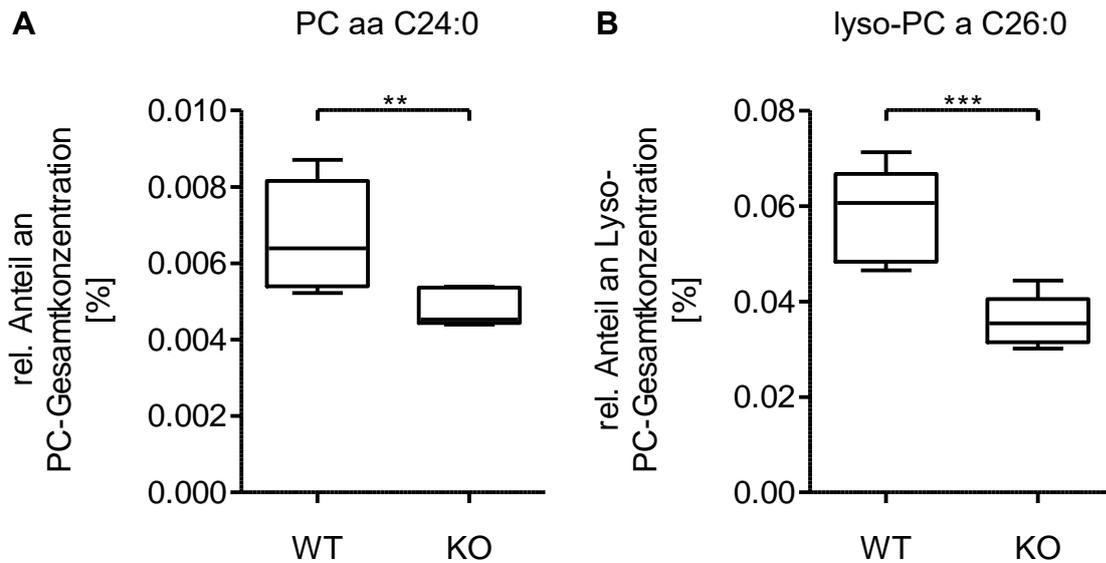


Abb. 25: Relativer Anteil in % von **A** Dilignoceryl-Phosphatidylcholin (C24:0 Lignocerinsäure) an der Diacyl-Phosphatidylcholin-Gesamtkonzentration und **B** Cerotyl-Lyso-Phosphatidylcholin (C26:0 Cerotinsäure) an der Lyso-Phosphatidylcholin-Gesamtkonzentration, jeweils in TP-WT- (n=6) und TP-KO-Mäusen (n=6). Dargestellt sind Median und IQR. PC Phosphatidylcholin; Lyso-PC Lyso-Phosphatidylcholin; \*\* p=0,01; \*\*\* p<0,001 (ungepaarter t-Test).

Der relative Anteil von Dilignoceryl-Phosphatidylcholin (PC aa C24:0) an der Diacyl-Phosphatidylcholin-Gesamtkonzentration fiel im Plasma von TP-KO-Mäusen signifikant niedriger aus als in WT-Geschwistern (Abb. 25 A; WT vs. KO:  $0,0067 \pm 0,0014\%$  vs.  $0,0048 \pm 0,0005\%$ ). Auch der relative Anteil von Cerotyl-Lyso-Phosphatidylcholin (lysoPC a C26:0) an der Lyso-Phosphatidylcholin-Gesamtkonzentration war in TP-KO-Mäusen signifikant niedriger (Abb. 25 B; WT vs. KO:  $0,0589 \pm 0,0098\%$  vs.  $0,0361 \pm 0,0052\%$ ).

Um die Unterschiede hinsichtlich Phosphatidylcholinen und Lyso-Phosphatidylcholinen im TP-KO-Plasma näher zu untersuchen, sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen den beiden Lipidklassen aufgeklärt werden. Lyso-Phosphatidylcholine entstehen durch Enzymkatalysierte Hydrolyse von Phosphatidylcholinen (Abb. 26). Phospholipase A<sub>2</sub> stellt dabei das katalysierende Enzym dar, welches für die Abspaltung einer Fettsäure aus dem Phosphatidylcholin-Molekül sorgt. Lyso-Phosphatidylcholine besitzen demnach nur einen Fettsäurerest am Glycerin.

Neben dem oben dargestellten Stoffwechselweg (Abb. 26) stehen Phosphatidylcholine und Lyso-Phosphatidylcholine außerdem in Verbindung mit anderen Phospholipasen. Des Weiteren spielen sie eine Rolle in der Hämostase und im Lipidstoffwechsel. Mit Hilfe einer Ingenuity® Pathway-Analyse (IPA) wurde zur Darstellung dieser Zusammenhänge ein Netzwerk erstellt (Abb. 27). Hier wurden auch Acylcarnitine miteinbezogen, da Vertreter dieser Substanzklasse auch signifikante Unterschiede in den TP-KO-Mäusen zeigten.

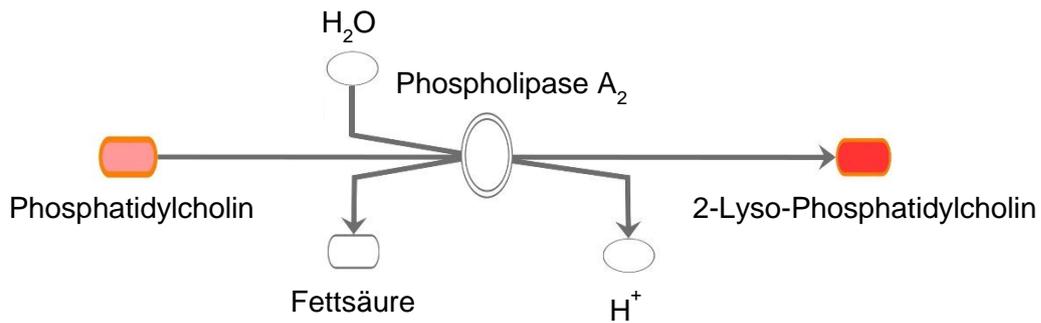


Abb. 26: Enzym-katalysierte Hydrolyse von Phosphatidylcholinen. Phospholipase A<sub>2</sub> sorgt für die Abspaltung einer Fettsäure aus dem Phosphatidylcholin-Molekül. Als Produkt entstehen Lyso-Phosphatidylcholine. H<sub>2</sub>O Wasser; H<sup>+</sup> Proton.

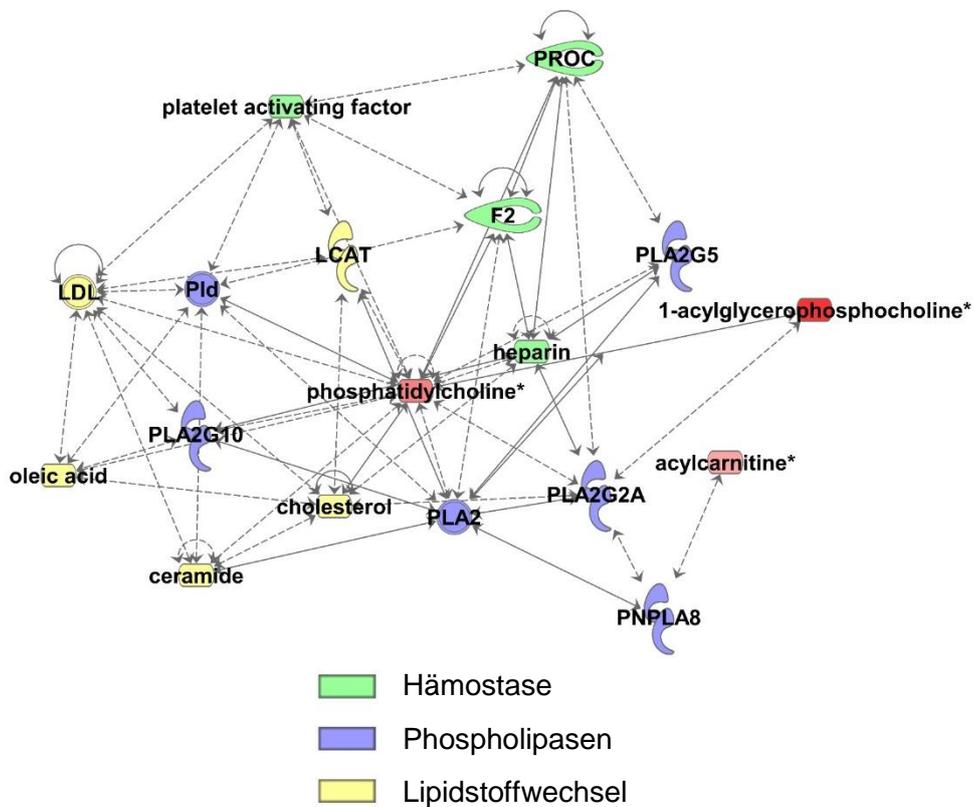


Abb. 27: Netzwerk der Metaboliten mit signifikanten Veränderungen im TP-KO-Plasma. Metaboliten in Substanzklassen zusammengefasst und in rot dargestellt, Komponenten der Hämostase hellgrün, Phospholipasen hellblau sowie Komponenten des Lipidstoffwechsels gelb. phosphatidylcholine Phosphatidylcholine; 1-acylglycerophosphocholine Lyso-Phosphatidylcholine; acylcarnitine Acylcarnitine; platelet activating factor Plättchenaktivierender Faktor; PROC Protein C; F2 Prothrombin; heparin Heparin; Pld Phospholipase D; PLA2G10 Phospholipase A<sub>2</sub> Gruppe X; PLA2 Phospholipase A<sub>2</sub>; PLA2G2A Phospholipase A<sub>2</sub> Gruppe IIA; PNPLA8 Calcium-unabhängige Phospholipase A<sub>2γ</sub>; PLA2G5 Phospholipase A<sub>2</sub> Gruppe V; LDL LDL-Cholesterin; oleic acid Ölsäure; ceramide Ceramide; cholesterol Cholesterin; LCAT Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase.

### 3.1.3 *Ex vivo*-Effekte von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in TP-KO und WT-Geschwistern

#### 3.1.3.1 Einfluss von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> auf die Konstriktion der murinen thorakalen Aorta

Um die Aktivität von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> als Ligand des TP zu untersuchen, wurde die durch 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-induzierte Vasokonstriktion sowohl in TP-WT- als auch in TP-KO-Mäusen untersucht, denen dazu thorakale Aorten entnommen wurden. Nach entsprechender Konditionierung der Aortenringe am Myographen (Kap. 2.3.2) wurden Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt. Um die vasoaktiven Eigenschaften von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> genauer charakterisieren und bewerten zu können, wurden außerdem, unter gleichen Bedingungen, Konzentrations-Wirkungs-Kurven zum Vergleich mit 8-iso-PGE<sub>2</sub>, einem anderen Isoprostan, PGF<sub>2α</sub> sowie PGE<sub>2</sub>, den jeweils korrespondierenden Prostaglandinen, und U-46619, einem synthetischen TP-Agonisten, erstellt.

Mit steigender Konzentration verursachte die Zugabe von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> eine Zunahme der Konstriktion der thorakalen Aorten aus TP-WT-Mäusen (Abb. 28). Dieser Effekt konnte in den Aorten aus TP-defizienten Mäusen jedoch nicht beobachtet werden (Abb. 28). Das korrespondierende Prostaglandin PGF<sub>2α</sub> zeigte ein sehr ähnliches Verhalten: Die Zugabe von PGF<sub>2α</sub> löste eine Konstriktion der Aorten aus TP-WT-Mäusen aus, jedoch nicht der Aorten aus TP-KO-Mäusen (Abb. 28).

Nachdem das Isoprostan 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und das korrespondierende Prostaglandin PGF<sub>2α</sub> vergleichbare Konzentrations-Wirkungs-Kurven ergaben, wurden anschließend die Konzentrations-Wirkungs-Kurven vom Isoprostan 8-iso-PGE<sub>2</sub> und korrespondierendem Prostaglandin PGE<sub>2</sub> verglichen (Abb. 28). Mit steigender Konzentration verursachte sowohl die Zugabe von 8-iso-PGE<sub>2</sub> als auch von PGE<sub>2</sub> eine Zunahme der Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur in Aorten aus TP-WT-Mäusen. Die Zugabe von 8-iso-PGE<sub>2</sub> löste die Kontraktion im Vergleich zu PGE<sub>2</sub> bereits in niedrigen Konzentrationsbereichen aus. In Aorten aus TP-defizienten Mäusen blieb der Effekt beider Substanzen aus.

Die Zugabe von U-46619 zu den Aorten aus TP-WT-Mäusen führte zu einer konzentrationsabhängigen Vasokonstriktion (Abb. 28). In den Aorten aus TP-KO-Geschwistertieren zeigte U-46619 keine Vasokonstriktion (Abb. 28). Der TP-Agonist U-46619 wies die höchste Potenz auf ( $EC_{50}$  [log M] = -8,6), gefolgt von den untersuchten Isoprostanen 8-iso-PGE<sub>2</sub> ( $EC_{50}$  = -7,1) und 8-iso-PGF<sub>2α</sub> ( $EC_{50}$  = -5,5). Die niedrigste Potenz zeigte sich bei den untersuchten Prostaglandinen PGF<sub>2α</sub> ( $EC_{50}$  = -5,0) und PGE<sub>2</sub> ( $EC_{50}$  = -4,6).

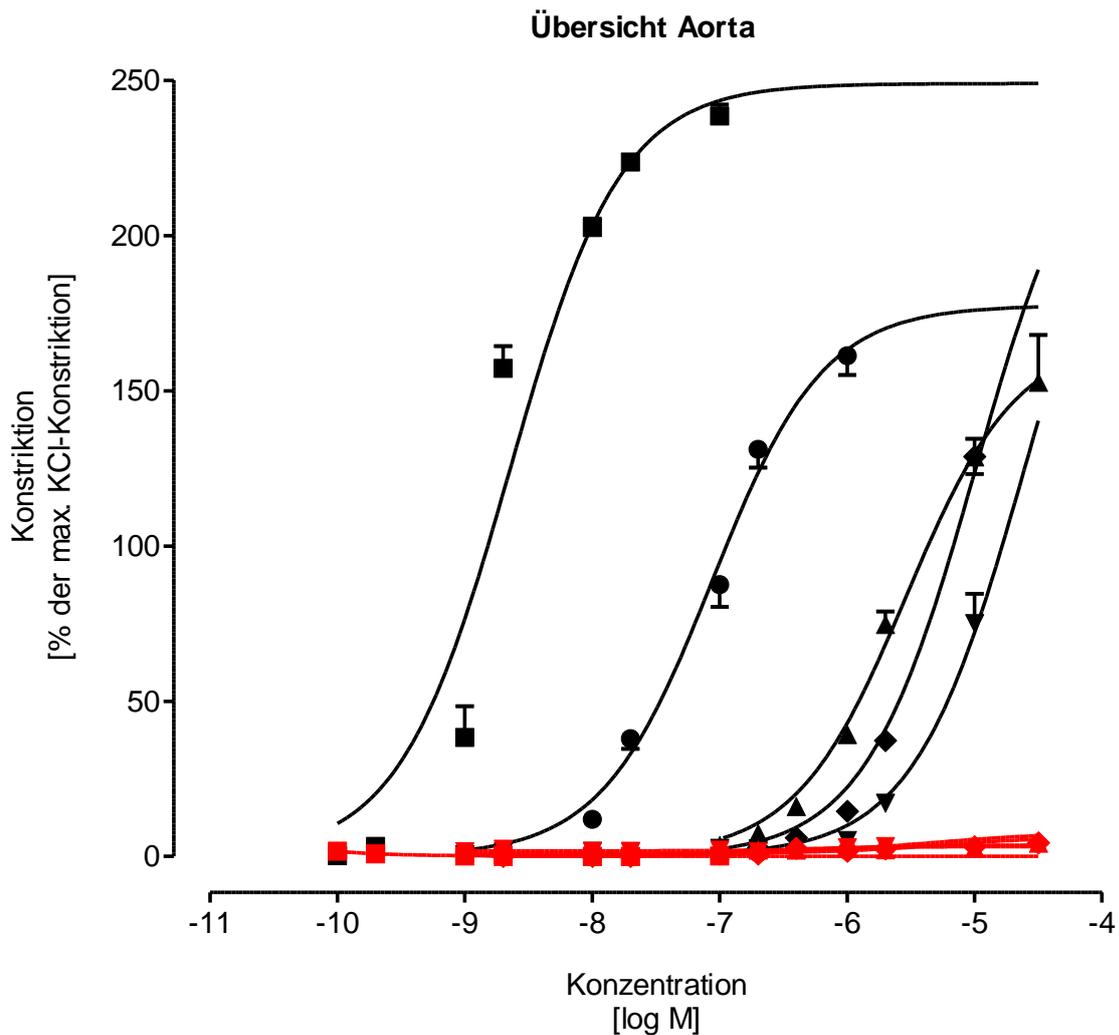


Abb. 28: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von U-46619 (■; EC<sub>50</sub> [log M] = -8,6), 8-iso-PGE<sub>2</sub> (●; EC<sub>50</sub> = -7,1), 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (▲; EC<sub>50</sub> = -5,5), PGF<sub>2α</sub> (◆; EC<sub>50</sub> = -5,0) und PGE<sub>2</sub> (▼; EC<sub>50</sub> = -4,6) am Myographen mit Aorten aus TP-WT-Mäusen, sowie von U-46619 (■), 8-iso-PGE<sub>2</sub> (●), 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (▲), PGF<sub>2α</sub> (◆) und PGE<sub>2</sub> (▼) mit Aorten aus TP-KO-Geschwistertieren. Angabe der vorliegenden Stoffmengenkonzentration in Badlösung als Exponent zur Basis 10. Konstriktion der thorakalen Aorta als untersuchte Wirkung, angegeben in % der max. KCl-Konstriktion. Dargestellt sind jeweils MW ± SEM von (■) 5, (●) 5, (▲) 6, (◆) 5 und (▼) 4 Aorten aus TP-WT-Mäusen bzw. (■) 3, (●) 5, (▲) 6, (◆) 5 und (▼) 3 Aorten aus TP-KO-Mäusen im Konzentrationsbereich 10<sup>-10</sup> bis 10<sup>-4,5</sup> M und die mittels nicht-linearer Regression resultierenden sigmoidalen Konzentrations-Wirkungs-Kurven. EC<sub>50</sub> mittlere effektive Konzentration als [log M].

Die untersuchten endogenen Isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> sowie 8-iso-PGE<sub>2</sub> und Prostaglandine PGF<sub>2α</sub> sowie PGE<sub>2</sub> verursachten, analog zum synthetisch hergestellten U-46619, eine Vasokonstriktion der murinen thorakalen Aorten aus TP-WT-Mäusen. Alle Substanzen hatten keinen Effekt auf Aorten aus TP-defizienten Mäusen. Demnach ist die beobachtete

Vasokonstriktion der Aorten aus Wildtyp-Geschwistern auf die Anwesenheit von TP-Rezeptoren zurückzuführen.

### **3.1.3.2 Einfluss von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> auf die Konstriktion der murinen Pulmonalarterie**

Die zuvor beschriebenen Untersuchungen bezüglich Konstriktion der murinen thorakalen Aorta (Kap. 3.1.3.1.1) wurden zusätzlich mit explantierten murinen Pulmonalarterien durchgeführt. Im Hinblick auf die Pathogenese einer pulmonalen arteriellen Hypertonie könnte die Konstriktion der Pulmonalarterie eine Rolle spielen und möglicherweise zum erhöhten Blutdruck in der Pulmonalarterie beitragen. Nach Entnahme, Präparation und entsprechender Konditionierung der Pulmonalarterienringe wurden Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, PGF<sub>2α</sub> und U-46619 erstellt.

Mit steigender Konzentration verursachte die Zugabe von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> eine Zunahme der Konstriktion der Pulmonalarterien aus TP-WT-Mäusen (Abb. 29). In den Pulmonalarterien aus TP-defizienten Mäusen zeigte sich keine Vasokonstriktion (Abb. 29). Das Prostaglandin PGF<sub>2α</sub> und der TP Agonist U-46619 zeigten ebenfalls eine konzentrationsabhängige Vasokonstriktion der Pulmonalarterien aus TP-WT-Mäusen, die in den Pulmonalarterien aus TP-KO-Geschwistertieren nicht auftrat (Abb. 29). Der TP-Agonist U-46619 wies die höchste Potenz auf (EC<sub>50</sub> [log M] = -9,0), gefolgt vom Isoprostan 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (EC<sub>50</sub> = -6,1) und dem Prostaglandin PGF<sub>2α</sub> (EC<sub>50</sub> = -5,5).

Das Isoprostan 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und das Prostaglandin PGF<sub>2α</sub> verursachten, analog zu U-46619, eine Vasokonstriktion der murinen Pulmonalarterien aus TP-WT-Mäusen. Alle Substanzen hatten keinen Effekt auf Pulmonalarterien aus TP-defizienten Mäusen. Demnach ist die beobachtete Vasokonstriktion der Pulmonalarterien aus Wildtyp-Geschwistern auf die Anwesenheit von TP-Rezeptoren zurückzuführen.

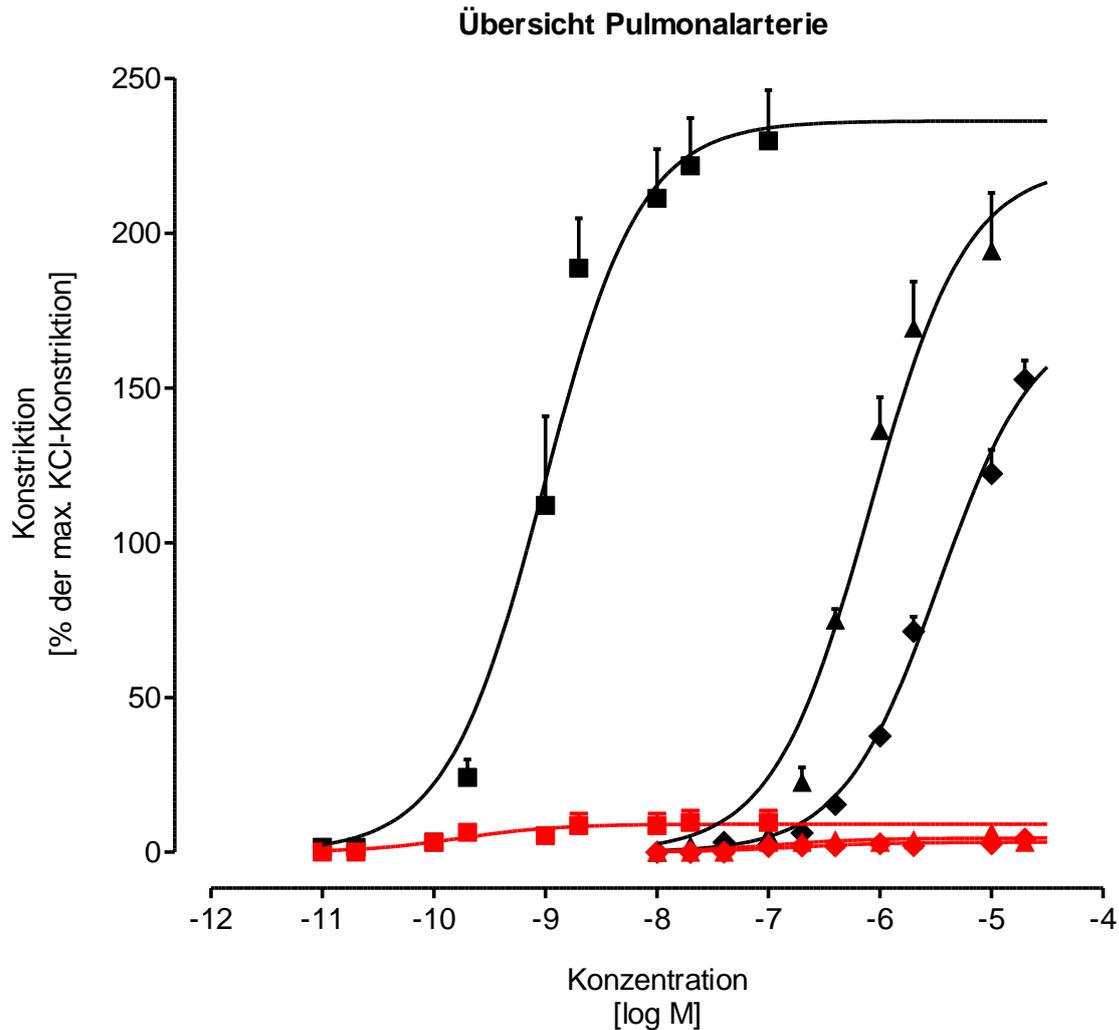


Abb. 29: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von U-46619 (■; EC<sub>50</sub> [log M] = -9,0), 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (▲; EC<sub>50</sub> = -6,1) und PGF<sub>2α</sub> (◆; EC<sub>50</sub> = -5,5) am Myographen mit Pulmonalarterien aus TP-WT-Mäusen, sowie von U-46619 (■), 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (▲) und PGF<sub>2α</sub> (◆) mit Pulmonalarterien aus TP-KO-Geschwistertieren. Angabe der vorliegenden Stoffmengenkonzentration in Badlösung als Exponent zur Basis 10. Konstriktion der Pulmonalarterie als untersuchte Wirkung, angegeben in % der max. KCl-Konstriktion. Dargestellt sind jeweils MW ± SEM von (■) 6, (▲) 4 und (◆) 4 Pulmonalarterien aus TP-WT-Mäusen bzw. (■) 3, (▲) 4 und (◆) 4 Pulmonalarterien aus TP-KO-Mäusen im Konzentrationsbereich 10<sup>-11</sup> bis 10<sup>-4.7</sup> M und die mittels nicht-linearer Regression resultierenden sigmoidalen Konzentrations-Wirkungs-Kurven. EC<sub>50</sub> mittlere effektive Konzentration als [log M].

### 3.1.4 *In vivo*-Effekte von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in TP-KO und WT-Geschwistern

#### 3.1.4.1 Einfluss von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> auf die Konstriktion von Arteriolen im Musculus cremaster

Nachdem die Vasoaktivität von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> *ex vivo* am Myographen nachgewiesen wurde (Kap. 3.1.3.1), sollte diese im nächsten Schritt auch *in vivo* untersucht werden. Dafür wurde die Veränderung des Gefäßdurchmessers von Arteriolen im *M. cremaster* gemessen. Dies erfolgte während der Zugabe von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> mittels simultaner Intravitalmikroskopie. Der Versuch wurde neben 8-iso-PGF<sub>2α</sub> außerdem mit PGF<sub>2α</sub>, 8-iso-PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> und U-46619 durchgeführt. Um eine Abhängigkeit von TP-Rezeptoren zu prüfen, wurden für jeden Ansatz jeweils TP-KO-Mäuse sowie entsprechende WT-Geschwister verwendet.

In TP-WT-Mäusen verursachte die Zugabe von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> bei niedrigen Konzentrationen (10<sup>-7</sup> - 10<sup>-6</sup> M) zuerst eine geringe Dilatation der jeweils untersuchten Arteriolen im *M. cremaster*. Bei höheren Konzentrationen (10<sup>-5,5</sup> - 10<sup>-4,5</sup> M) konnte dann eine zunehmende Vasokonstriktion beobachtet werden. In TP-KO-Mäusen konnte dieser Verlauf nicht beobachtet werden (Abb. 30 A). Das Prostaglandin PGF<sub>2α</sub> zeigte bei niedrigen Konzentrationen (10<sup>-7</sup> - 10<sup>-6</sup> M) eine Dilatation der Arteriolen in TP-WT-Mäusen. Bei höheren Konzentrationen (10<sup>-5,5</sup> - 10<sup>-4,5</sup> M) wurde keine Änderung mehr festgestellt (Abb. 30 B). In TP-WT-Mäusen zeigte sich für 8-iso-PGE<sub>2</sub> im Vergleich zu TP-KO-Mäusen eine Vasokonstriktion bei mittleren Konzentrationen (10<sup>-5,5</sup> - 10<sup>-5</sup> M; Abb. 30 C). Das Prostaglandin PGE<sub>2</sub> verursachte mit steigender Konzentration eine Vasodilatation, sowohl in Arteriolen von TP-WT- als auch TP-KO-Mäusen (Abb. 30 D). Der TP-Agonist U-46619 zeigte eine konzentrationsabhängige Vasokonstriktion der Arteriolen im *M. cremaster* von TP-WT-Mäusen. Dieser Effekt auf Arteriolen konnte in TP-defizienten Mäusen jedoch nicht beobachtet werden (Abb. 30 E).

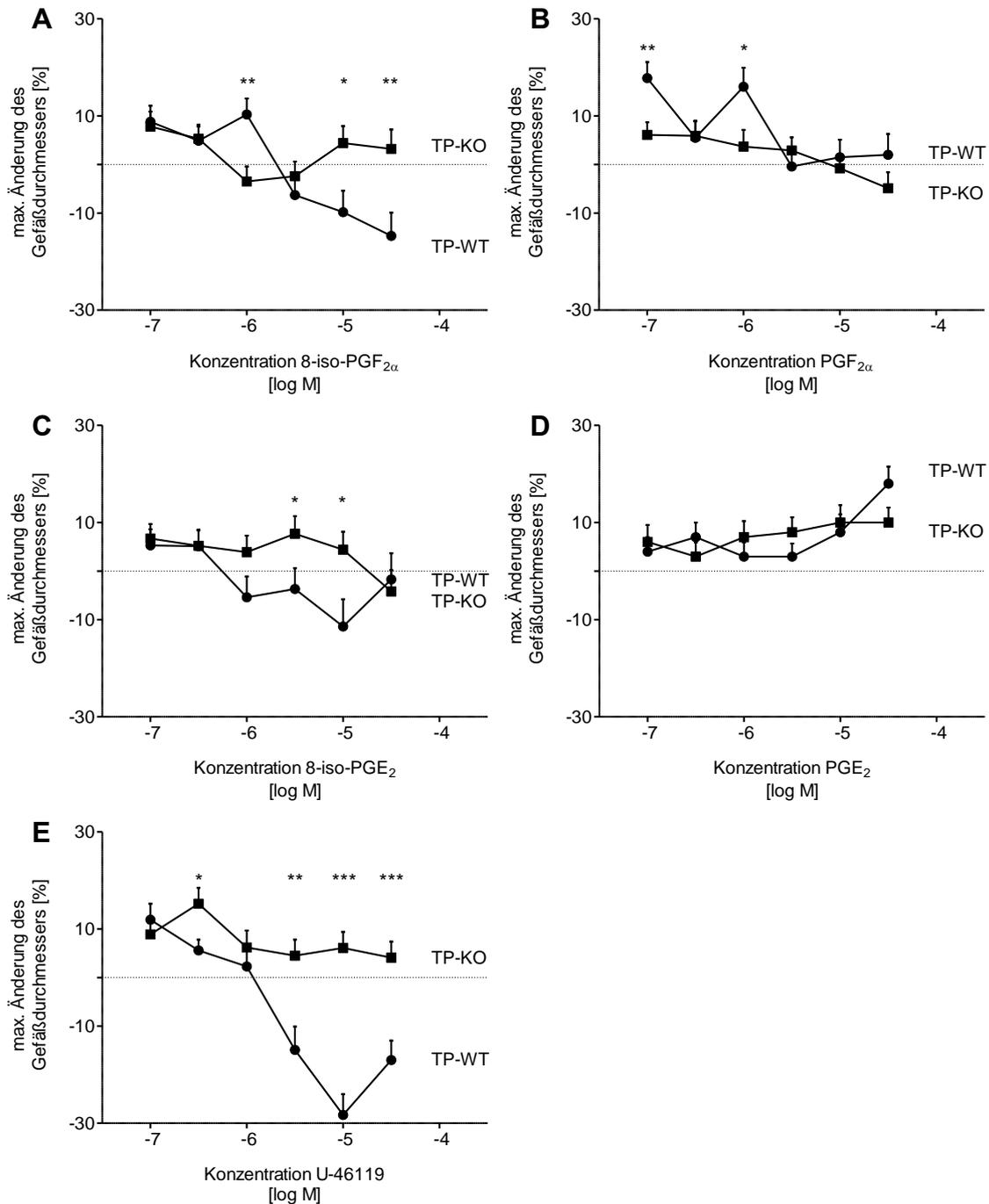


Abb. 30: Maximale Änderung des Gefäßdurchmessers von Arteriolen im *M. cremaster* in % unter Zugabe von **A** 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, **B** PGF<sub>2α</sub>, **C** 8-iso-PGE<sub>2</sub>, **D** PGE<sub>2</sub> und **E** U-46619, jeweils in TP-WT- (●; **A**, **B**, **E**: n=68 Arteriolen in 7 Tieren, **C**: n=51 Arteriolen in 6 Tieren und **D**: n=58 Arteriolen in 6 Tieren) und TP-KO-Mäusen (■; **A-E**: n=61 Arteriolen in 6 Tieren). 0% (gestrichelte Linie) entspricht keiner Änderung, Werte > 0% bzw. Werte < 0% spiegeln eine Vasodilatation (positive Dilatationskapazität  $D_{Kap}$ ) bzw. Vasokonstriktion (negative Dilatationskapazität  $D_{Kap}$ ) wider. Angabe der vorliegenden Konzentration in Gefäßumgebung als Exponent zur Basis 10. Dargestellt sind jeweils  $MW \pm SEM$ . \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  (*two-way ANOVA* TP-WT vs. TP-KO, Bonferroni-Post-hoc-Test).

### 3.1.4.2 Implantation von osmotischen Minipumpen mit 8-iso-PGF<sub>2α</sub>

#### 3.1.4.2.1 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentrationen in TP-KO und WT-Geschwistern

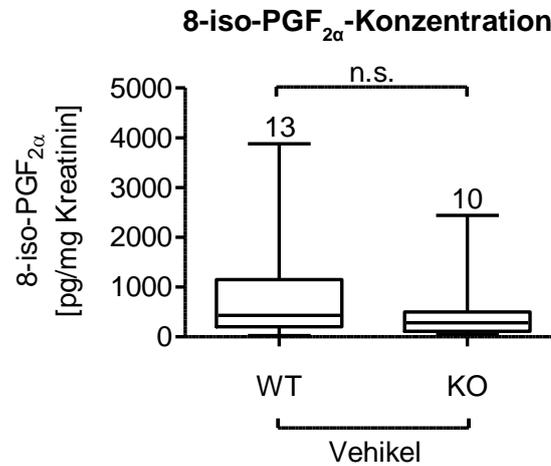


Abb. 31: 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration, angegeben in pg pro mg Kreatinin im 24-Stunden-Sammelurin von TP-KO-Mäusen und WT-Geschwistern, jeweils zwei und vier Wochen nach Implantation von osmotischen Minipumpen, gefüllt mit Vehikel-Lösung. n.s. nicht signifikant (ungepaarter t-Test).

Vor Supplementation von TP-KO-Mäusen und WT-Geschwistern mit 8-iso-PGF<sub>2α</sub> sollte die physiologische Ausscheidung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> untersucht und damit ein möglicher Phänotyp der TP-KO-Mäuse überprüft werden. Die basalen 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentrationen im 24-Stunden-Sammelurin von TP-KO-Mäusen unterschieden sich nicht von WT-Geschwistern (Abb. 31).

#### 3.1.4.2.2 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentrationen bei 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Supplementation

Zur Supplementation von TP-KO-Mäusen und WT-Geschwistern mit 8-iso-PGF<sub>2α</sub> wurden osmotische Minipumpen implantiert. Es wurden Pumpraten von 1 und 5 µg/kg KG/h getestet. Als Kontrollgruppe dienten ebenfalls TP-KO-Mäuse und WT-Geschwister, denen osmotische Minipumpen, gefüllt mit Vehikel-Lösung, implantiert wurden. Da 8-iso-PGF<sub>2α</sub> renal teilweise unmetabolisiert wieder ausgeschieden wird, wurde hier die Konzentration an unmetabolisiertem 8-iso-PGF<sub>2α</sub> im Urin gemessen. Bei einer Abgaberate der osmotischen Minipumpen von 1 µg/kg KG/h trat kein Unterschied in der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Ausscheidung zwischen TP-WT- und -KO-Mäusen auf (Abb. 32 A) Zwischen der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Gruppe mit einer Abgaberate von 1 µg/kg KG/h und der Kontrollgruppe zeigte sich kein Unterschied in der Ausscheidung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> im 24-Stunden-Sammelurin (274±57 vs. 255±63 pg/mg Kreatinin; Abb. 32 B). Außerdem wurde in der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Gruppe mit einer Abgaberate der

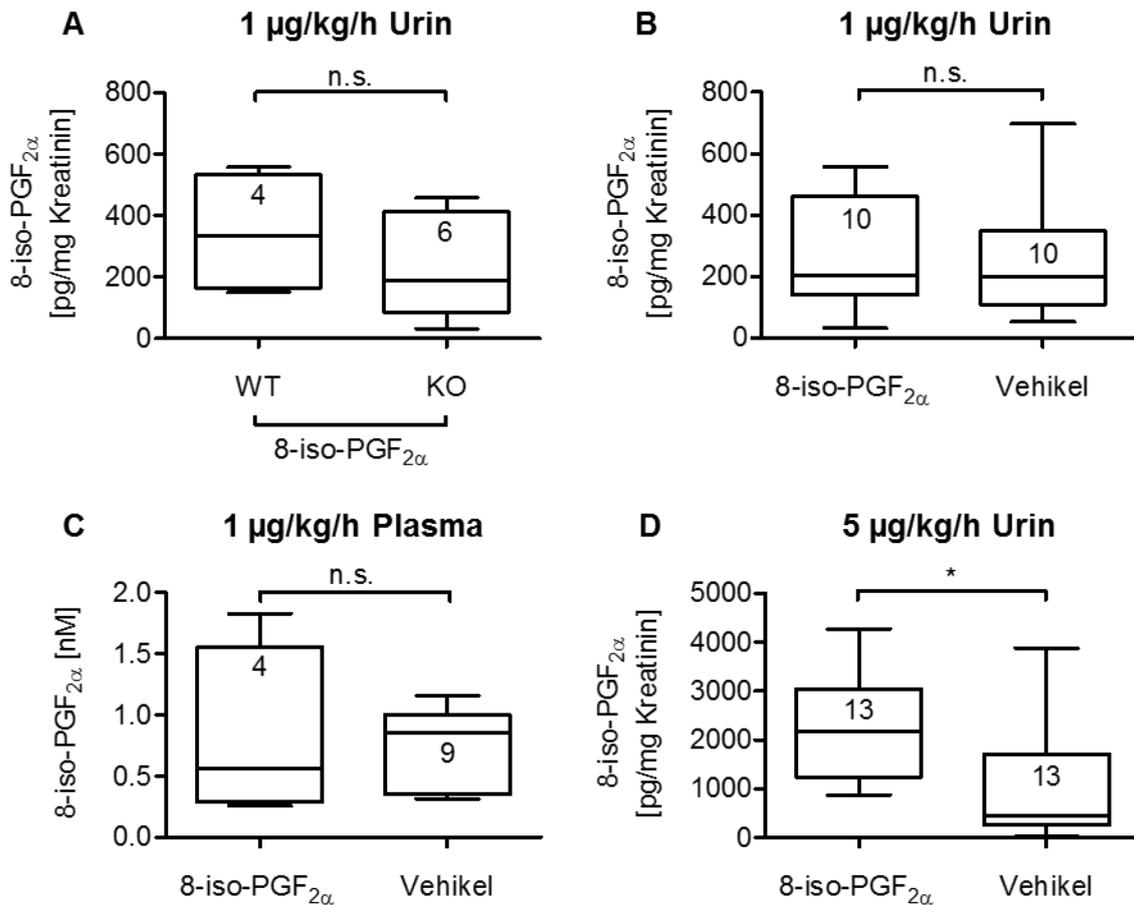


Abb. 32: 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration, angegeben in pg pro mg Kreatinin im 24-Stunden-Sammelurin von TP-KO-Mäusen und WT-Geschwistern, jeweils zwei und vier Wochen nach Implantation von osmotischen Minipumpen, **A** gefüllt mit 8-iso-PGF<sub>2α</sub> mit einer Abgaberate von 1 µg/kg KG/h bzw. gefüllt mit Vehikel-Lösung und 8-iso-PGF<sub>2α</sub> mit einer Abgaberate von **B** 1 µg/kg KG/h bzw. **D** 5 µg/kg KG/h, sowie **C** angegeben in nM im Plasma von TP-KO-Mäusen und WT-Geschwistern, jeweils vier Wochen nach Implantation von osmotischen Minipumpen, gefüllt mit Vehikel-Lösung und 8-iso-PGF<sub>2α</sub> mit einer Abgaberate von 1 µg/kg KG/h. n.s. nicht signifikant; \* p<0,05 (ungepaarter t-Test).

osmotischen Minipumpen von 1 µg/kg KG/h und der entsprechenden Kontrollgruppe die 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration im murinen Plasma gemessen. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (0,80±0,36 vs. 0,74±0,11 nM; Abb. 32 C). Durch die exogene Zufuhr von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> mit einer Abgaberate von 1 µg/kg KG/h konnten somit keine höheren Konzentrationen in der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Gruppe erzielt werden. Durch Verfünfachung der Konzentration und einer daraus resultierenden Abgaberate von 5 µg/kg KG/h konnte schließlich eine signifikant erhöhte Ausscheidung im Vergleich zur Kontrollgruppe erreicht werden (2200±295 vs. 1003±313 pg/mg Kreatinin, p<0,05; Abb. 32 D).

### 3.1.4.2.3 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Metabolismus in TP-WT

Um zu untersuchen, ob die zusätzliche exogene Applikation von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> einen verstärkten Metabolismus induziert, wurde die 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten in einem Zeitraum von vier Wochen im 24-Stunden-Sammelurin bestimmt. Dafür wurden diesen Mäusen osmotische Minipumpen implantiert, die über diesen Zeitraum für eine kontinuierliche Abgabe von 5 µg 8-iso-PGF<sub>2α</sub>/kg KG/h sorgten. Der erste Messzeitpunkt in Woche 0 stellt die endogene basale 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration vor Implantation der osmotischen Minipumpen dar. Der dritte Messzeitpunkt in Woche 4 wurde nach einer einmaligen i.p.-Injektion von Thioridazin unmittelbar vor der 24-Stunden-Urinsammlung gewählt. Thioridazin hemmt die peroxisomale β-Oxidation, den Hauptabbauweg im Metabolismus von 8-iso-PGF<sub>2α</sub>.

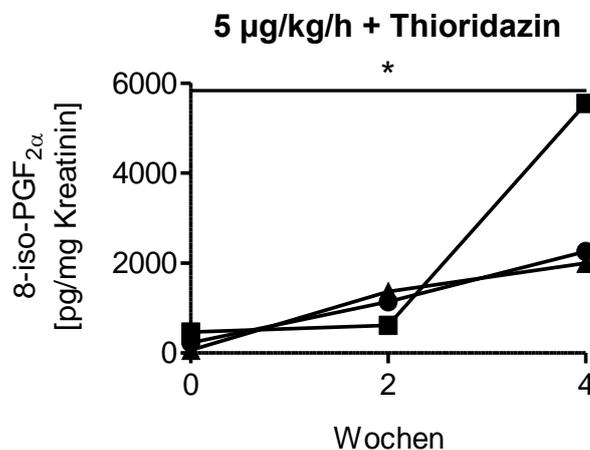


Abb. 33: 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration, angegeben in pg pro mg Kreatinin, im 24-Stunden-Sammelurin von 3 TP-WT-Mäusen im individuellen Verlauf für jedes Tier (●, ■, ▲), jeweils vor Implantation der Minipumpe (Woche 0), nach zweiwöchiger Applikation von 5 µg/kg KG/h 8-iso-PGF<sub>2α</sub> via Minipumpe (Woche 2) und nach vierwöchiger Applikation mit unmittelbar vorhergehender i.p.-Injektion von Thioridazin (Woche 4). \*  $p < 0,05$  (one-way ANOVA).

Die 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration im 24-Stunden-Sammelurin stieg im Verlauf des vierwöchigen Zeitraumes kontinuierlich an (Abb. 33). Bereits nach zweiwöchiger Applikation von 5 µg 8-iso-PGF<sub>2α</sub>/kg KG/h via Minipumpe (Woche 2) zeigte sich im Vergleich zur Ausgangskonzentration (Woche 0) ein Anstieg in der ausgeschiedenen 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Menge (Abb. 33). Nach zwei weiteren Wochen, einer damit insgesamt vierwöchigen Applikation von 5 µg/kg KG/h 8-iso-PGF<sub>2α</sub> via Minipumpe und einer unmittelbar vorgehenden i.p.-Injektion von Thioridazin (Woche 4) konnte ein erneuter Anstieg in der ausgeschiedenen 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Menge nachgewiesen werden (Abb. 33).

#### **3.1.4.2.4 Einfluss des Genotyps und von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> auf die Regulation des systolischen Blutdruckes in TP-KO und WT-Geschwistern**

Nach Implantation von Minipumpen mit einer Abgaberate von 5 µg 8-iso-PGF<sub>2α</sub>/kg KG/h bzw. Vehikel wurde untersucht, welchen Einfluss ein verstärkter Agonismus am TP-Rezeptor auf die Regulation des systolischen Blutdruckes hat. Dafür wurde über einen Zeitraum von vier Wochen wöchentlich der systolische Blutdruck der Mäuse gemessen (*Tail-cuff*-Methode; siehe Kap. 2.3.5). Außerdem wurden unmittelbar vor Implantation der entsprechenden osmotischen Minipumpen initiale Blutdruckmessungen durchgeführt.

Obwohl 5 µg 8-iso-PGF<sub>2α</sub>/kg KG/h zu einer Steigerung der Urinausscheidung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> nach 4 Wochen geführt hat (Abb. 32), zeigte sich über diesem Zeitraum kein Effekt auf den mit der *Tail-cuff*-Methode gemessenen Blutdruck. Werden die beiden Gruppen (8-iso-PGF<sub>2α</sub> und Vehikel) zusammengefasst, so zeigt sich interessanterweise ein erniedrigter Blutdruck der TP-KO Mäuse im Vergleich zu den WT-Geschwistertieren ab der zweiten Woche (Abb. 34 F).

#### **3.1.5 Generierung von TP-WT- und TP-MUT-transgenen Mäusen**

Nach Pronukleusinjektion konnte in den Responder-Mauslinien sowohl die Wildtyp-Variante als auch die mutierte Variante des humanen TP qualitativ mittels klassischer PCR nachgewiesen werden. Nach Rückkreuzung mit der Aktivatormauslinie (Tie2-transgene Mäuse) konnte jedoch weder die Wildtyp-Variante noch die mutierte Variante des humanen TP auf Transkriptions-Ebene mittels quantitativer *real-time*-PCR, noch auf Protein-Ebene mittels Western Blot nachgewiesen werden.

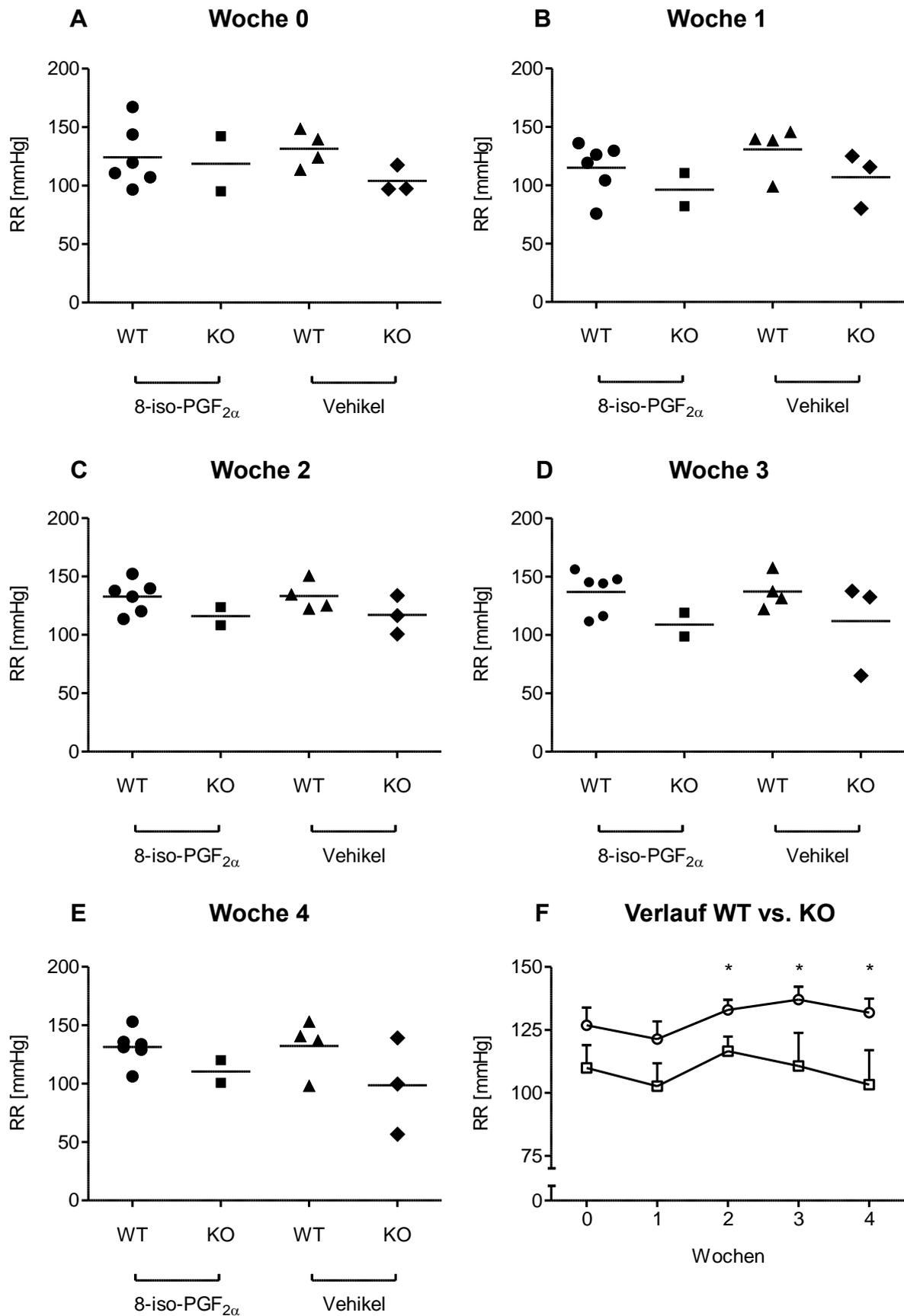


Abb. 34: Systolischer Blutdruck, gemessen in mmHg, vor (Woche 0, A) sowie eine (Woche 1, B), zwei (Woche 2, C), drei (Woche 3, D) und vier (Woche 4, E) Wochen nach der Implantation der osmotischen

Minipumpen. Dargestellt als *scatter dot plot* mit MW sind jeweils die Mittelwerte von zehn Einzelmessungen pro Zeitpunkt in TP-WT- (●; n=6) und TP-KO-Mäusen (■; n=2), denen mit 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-gefüllte Minipumpen implantiert wurden, sowie in TP-WT- (▲; n=4) und TP-KO-Mäusen (◆; n=3), denen mit Vehikel-gefüllte Minipumpen implantiert wurden (A-E). Außerdem die Mittelwerte ± SEM der beiden Genotypen TP-WT (○; n=10) und TP-KO (□; n=5) im zeitlichen Verlauf (F). (A-E) Keine signifikanten Unterschiede (*one-way ANOVA*); (F) \* p<0,05 (ungepaarter t-Test pro Zeitpunkt).

### 3.1.6 Zielgerichtete Überexpression des murinen TP in pulmonalen Endothelzellen

Nachdem im Hinblick auf die Blutdruckregulation unter den beschriebenen Versuchsbedingungen kein Effekt von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> festgestellt werden konnte (Kap. 3.1.4.2.4) und nachdem die geplanten transgenen Mausmodelle nicht erfolgreich generiert werden konnten (Kap. 3.1.5), wurde eine zielgerichtete Überexpression des murinen TP in pulmonalen Endothelzellen durchgeführt. Hierfür wurde von Herrn Dr. Jakob Körbelin (AG Rezeptor-targeting, II. Medizinische Klinik und Poliklinik, UKE) ein AAV-Vektor generiert (Kap. 2.3.8) [234]. Da der AAV-Vektor AAV2-L1-CMV-LUC-2A-mTBXA2R neben dem murinen TP außerdem Luciferase als Reportergen exprimiert, konnte somit die zielgerichtete Expression in pulmonalen Endothelzellen auf zwei unterschiedliche Weisen nachgewiesen werden: auf der einen Seite die Expression des murinen TP als quantitative *real-time*-PCR und auf der anderen Seite die Expression des Luciferase-Enzyms als Luciferase-Assay.

#### 3.1.6.1 Nachweis der Luciferase-Expression

Die Luciferase-Aktivität wurde mittels *in vivo*-BLI untersucht. Dazu wurde den behandelten Mäusen zehn Tage nach intravenöser AAV-Injektion Luciferin intraperitoneal injiziert. Nach 10 Minuten wurden dann Aufnahmen des Biolumineszenz-Signales gemacht. Zuerst wurde der Luciferase-Leervektor, d.h. der AAV-Vektor nur mit Luciferase-Gen, durch intravenöse Injektion dieses AAV-Vektors (n=3), sowie des Vehikels HBSS (n=1), in WT-Mäusen untersucht. Die *in vivo*-Biolumineszenz-Aufnahmen zeigten nur für die Injektion des Vektors ein deutlich zu erkennendes Licht-Signal (Abb. 35).

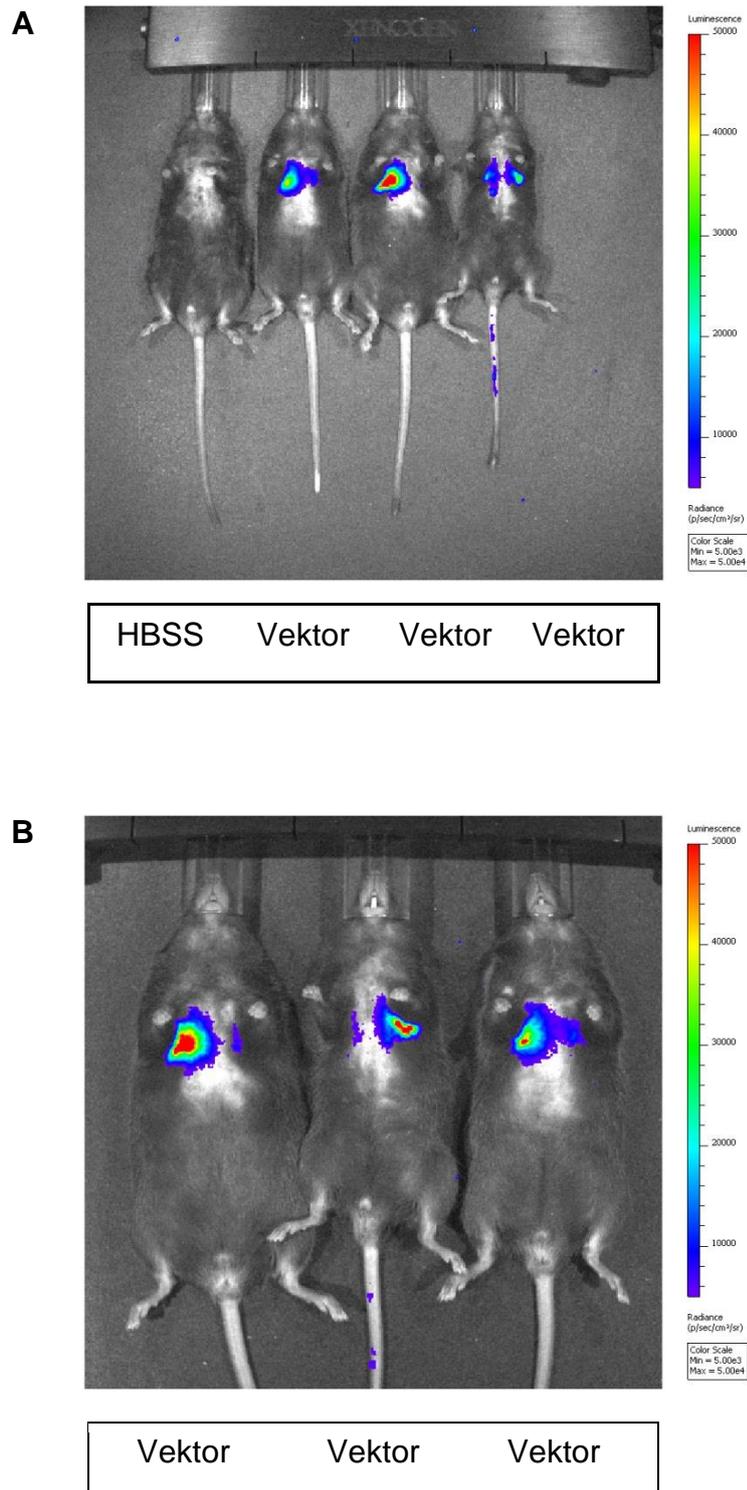


Abb. 35: *In vivo*-Biolumineszenz-Aufnahmen von TP-WT-Mäusen, denen zehn Tage zuvor entweder das Vehikel HBSS (links, HBSS; n=1) oder der AAV-Vektor mit Luciferase-Gen (Vektor; n=3), der eine zielgerichtete Expression in pulmonalen Endothelzellen bewirkt, intravenös injiziert wurde (A). Das Signal, in der Intensität von blau nach rot zunehmend, spiegelt die bei Luciferase-Aktivität umgesetzte Luciferin-Menge wider, die zu Lichtemission führt (A+B). Die mit AAV-Vektor behandelten Mäuse wurden außerdem vergrößert dargestellt (B). HBSS *Hank's Balanced Salt Solution*.

Des Weiteren wurde die Gewebespezifität des Biolumineszenz-Signales untersucht: Die Injektion des Vehikels ergab in allen Organen kein Signal. Die Injektion des Vektors verursachte ein Biolumineszenz-Signal in den explantierten Lungen, nicht jedoch in den Pulmonalarterien und Aorten (Abb. 36).

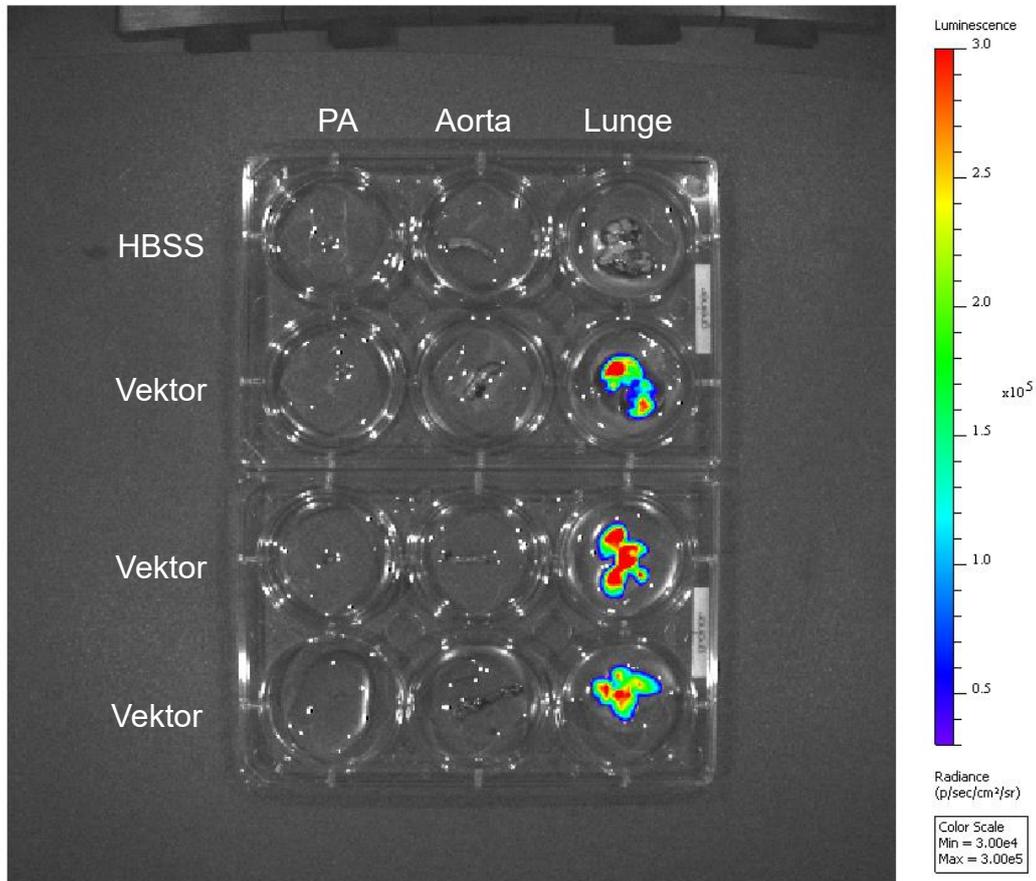
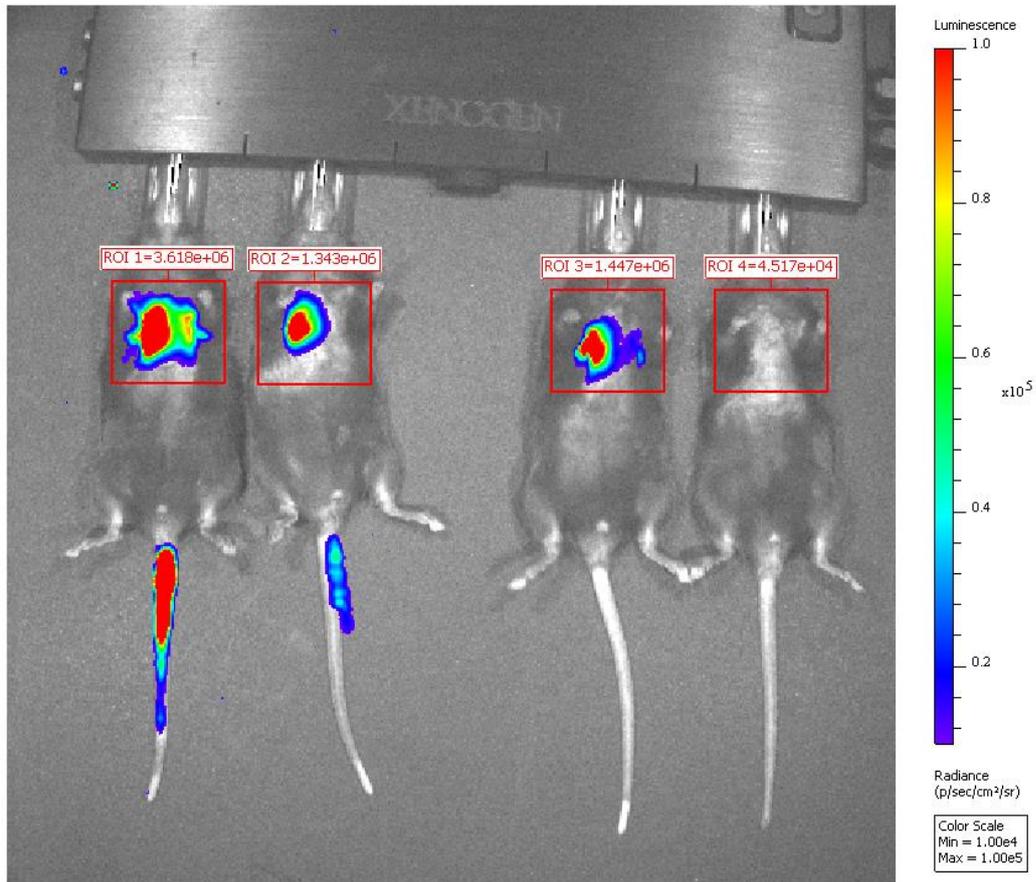


Abb. 36: Biolumineszenz-Aufnahmen von explantierten Pulmonalarterien (links: „PA“), Aorten (Mitte: „Aorta“) und Lungen (rechts: „Lunge“) von TP-WT-Mäusen, denen zehn Tage zuvor entweder das Vehikel HBSS (oberste Reihe; n = 1) oder der AAV-Vektor mit Luciferase-Gen (n = 3), der für eine zielgerichtete Expression in pulmonalen Endothelzellen sorgt, intravenös injiziert wurde. Das Signal, in der Intensität von blau nach rot zunehmend, spiegelt die bei Luciferase-Aktivität umgesetzte Luciferin-Menge wider, die mit Lichtemission einhergeht.

Im nächsten Schritt sollte nun die Expression von Luciferase über den AAV-Vektor AAV2-L1-CMV-LUC-2A-mTBXA2R geprüft werden. Dafür erfolgte die intravenöse Injektion dieses AAV-Vektors (n=3), sowie des Vehikels PBS (n=1), in TP-KO-Mäuse. Um eine optimale Dosis pro Maus zu finden, wurden drei verschiedene Virusmengen injiziert (Abb. 37). Die höchste injizierte Virusmenge von  $2,5 \times 10^{11}$  vg/Maus führte zum stärksten Signal. Die beiden niedrigeren Virusmengen von  $1,25 \times 10^{11}$  sowie  $5 \times 10^{10}$  vg/Maus lösten schwächere Signale aus (Abb. 37).

Auch bei diesen Tieren erfolgte nach der *in vivo*-Biolumineszenzmessung eine Organentnahme von Lunge, Aorta und Herz. Die Injektion der höchsten Virusmenge ( $2,5 \times 10^{11}$  vg/Maus) ergab ein starkes Signal in der Lunge (Abb. 38 A), die Injektion der niedrigsten Virusmenge ( $5 \times 10^{10}$  vg/Maus) ergab ein schwächeres Signal in der Lunge (Abb. 38 B). Für Aorta und Herz zeigte sich keine Biolumineszenz (Abb. 38).



$2,5 \times 10^{11}$	$1,25 \times 10^{11}$	$5 \times 10^{10}$	0	Virusmenge [vg/Maus]
$3,6 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	0	Lumineszenz

Abb. 37: *In vivo*-Biolumineszenz-Aufnahmen von TP-KO-Mäusen, denen zehn Tage zuvor entweder das Vehikel PBS (rechts, 0 vg/Maus; n = 1) oder der AAV-Vektor mit Luciferase- und TP-Gen (n = 3), der für eine zielgerichtete Expression in pulmonalen Endothelzellen sorgt, in unterschiedlichen Dosen (obere Tabellenreihe) intravenös injiziert wurde. Das Signal, in der Intensität von blau nach rot zunehmend, spiegelt die bei Luciferase-Aktivität umgesetzte Luciferin-Menge wider, die mit Lichtemission einhergeht. Angegeben sind jeweils die Intensitäten des entsprechenden markierten Bereiches (ROI; im oberen Bereich mit roter Schriftfarbe). Das Lumineszenz-Signal (untere Tabellenreihe) wurde jeweils durch Subtraktion der Intensität in der Kontrollmaus mit Vehikel-Injektion berechnet. ROI Region Of Interest; PBS Phosphate Buffered Saline.

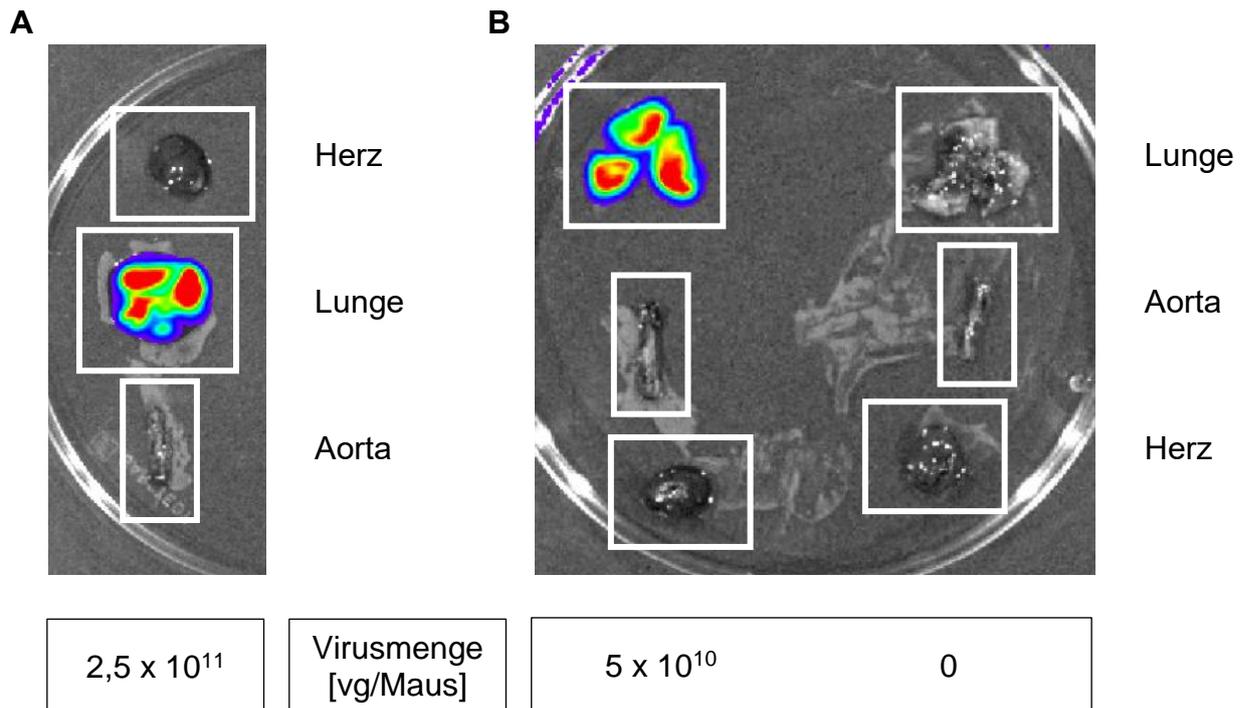


Abb. 38: Biolumineszenz-Aufnahmen von explantierten Lungen, Aorten und Herzen von TP-KO-Mäusen, denen zehn Tage zuvor entweder  $2,5 \times 10^{11}$  (A) oder  $5 \times 10^{10}$  (B links) vg/Maus des AAV-Vektors mit Luciferase- und TP-Gen bzw. das Vehikel PBS (B rechts) intravenös injiziert wurde. Das Signal, in der Intensität von blau nach rot zunehmend, spiegelt die bei Luciferase-Aktivität umgesetzte Luciferin-Menge wider, die mit Lichtemission einhergeht. PBS *Phosphate Buffered Saline*.

### 3.1.6.2 Nachweis der TP-Expression

Nachdem mittels Biolumineszenz die zielgerichtete Luciferase-Expression des AAV-Vektors AAV2-L1-CMV-LUC-2A-mTBXA2R in der Lunge nachgewiesen werden konnte (siehe Kap. 3.1.6.1), wurde die Expression des murinen TP mittels quantitativer *real-time*-PCR untersucht.

Die intravenöse Injektion unterschiedlicher Mengen des AAV-Vektors AAV2-L1-CMV-LUC-2A-mTBXA2R (n=3) erfolgte hier lediglich in TP-KO-Mäuse, um eine Überlagerung mit dem endogen exprimierten TP in WT-Mäusen zu verhindern.

In der quantitativen *real-time*-PCR mit isolierter cDNA aus den Mauslungen (Abb. 39) zeigte sich nach Injektion aller drei Viruskonzentration die mRNA-Expression des TP. Für die niedrigste Virusmenge, d.h.  $5 \times 10^{10}$  vg/Maus, zeigte sich die höchste mRNA-Expression des TP (Abb. 39).

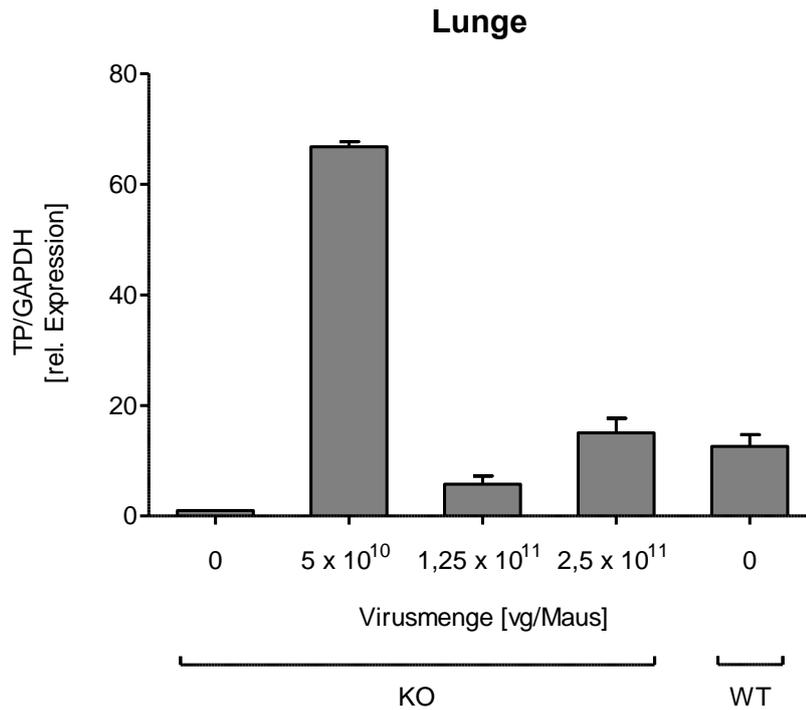


Abb. 39: Relative Expression des murinen TP in explantierten Lungen (■) von TP-KO und TP-WT-Mäusen, denen zehn Tage zuvor entweder  $5 \times 10^{10}$ ,  $1,25 \times 10^{11}$  oder  $2,5 \times 10^{11}$  vg/Maus des AAV-Vektors AAV2-L1-CMV-LUC-2A-mTBXA2R bzw. das Vehikel PBS (0 vg/Maus) intravenös injiziert wurde (pro Bedingung n=1). Dargestellt sind MW  $\pm$  SD von zwei unabhängigen PCR-Läufen. Als House-Keeping-Gen wurde GAPDH verwendet. GAPDH Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; PBS *Phosphate Buffered Saline*.

In einem weiteren Ansatz wurde die Gewebespezifität der TP-Expression nach Injektion des AAV-Vektors AAV2-L1-CMV-LUC-2A-mTBXA2R überprüft. Der Vergleich der mRNA-Expression des TP im Herz- und Lungengewebe zeigte in der TP-KO-Maus eine spezifische Expression des TP in der Lunge (Abb. 40).

Nachdem die zielgerichtete Expression der Luciferase und des murinen TP in pulmonalen Endothelzellen nachgewiesen werden konnte, soll der AAV-Vektor AAV2-L1-CMV-LUC-2A-mTBXA2R als Weiterführung der vorliegenden Arbeit in einem murinen Hypoxie-Modell zur Induktion einer PAH verwendet werden.

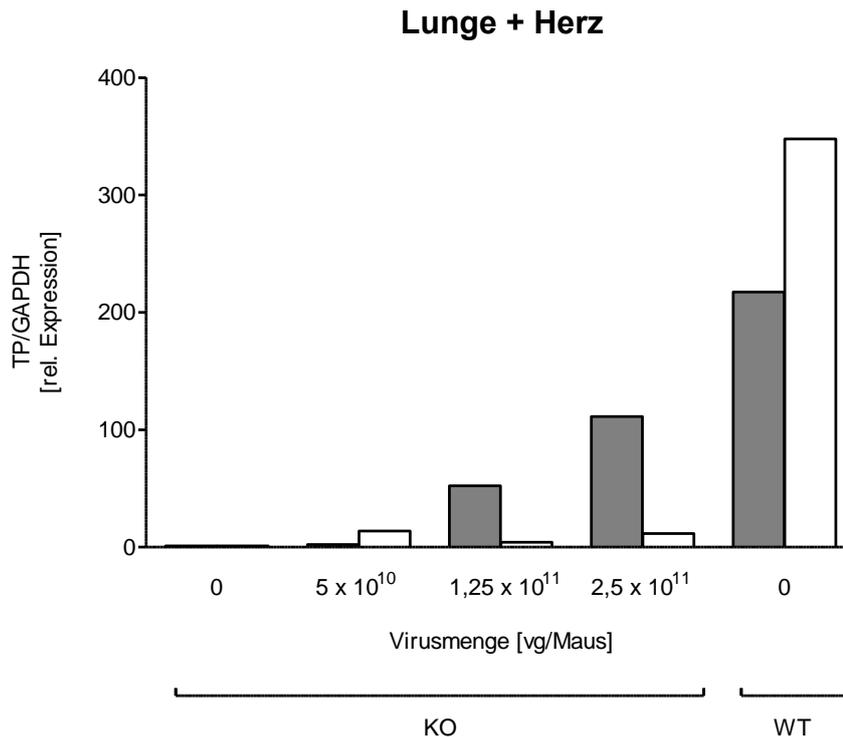


Abb. 40: Relative Expression des murinen TP in explantieren Lungen (■) und Herzen (□) von TP-KO- und TP-WT-Mäusen, denen zehn Tage zuvor entweder  $5 \times 10^{10}$ ,  $1,25 \times 10^{11}$  oder  $2,5 \times 10^{11}$  vg/Maus des AAV-Vektors AAV2-L1-CMV-LUC-2A-mTBXA2R bzw. das Vehikel PBS (0 vg/Maus) intravenös injiziert wurde (pro Bedingung n=1). Dargestellt ist jeweils das Ergebnis eines PCR-Laufes. Als House-Keeping-Gen wurde GAPDH verwendet. GAPDH Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; PBS *Phosphate Buffered Saline*.

### 3.1.7 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentrationen in Patienten mit Akutem Koronarsyndrom

Die ACS-Studie (engl. acute coronary syndrome) setzt sich aus Patienten mit Koronarer Herzkrankheit, instabiler Angina pectoris oder Myokardinfarkt zusammen (Kap. 2.4.1). Die Koronare Herzkrankheit wird durch Arteriosklerose in den Koronararterien verursacht, spiegelt demnach einen chronischen arteriosklerotischen Zustand wider. Instabile Angina pectoris und Myokardinfarkte mit (STEMI) oder ohne ST-Streckenhebung (NSTEMI) stellen als akute Ereignisse (ACS) die klinische Manifestation einer koronaren Herzkrankheit dar. Nach Aufnahme der Patienten in die Klinik wurde zur Diagnostik eine Koronarangiographie durchgeführt. Bei vorliegendem Myokardinfarkt erfolgte anschließend eine Dilatation des stenosierten Gefäßes mittels Ballonkatheter. Die Konzentration von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> im Urin wurde jeweils bei Aufnahme des Patienten (n=160) bestimmt. Die Baseline-Charakteristika sind in Tab. 20 aufgeführt.

Tab. 20: Baseline-Charakteristika der ACS-Studienteilnehmer. Alle Studienteilnehmer sind unter ACS-Studie (2. Spalte) zusammengefasst, die Studienteilnehmer ohne arteriosklerotischen Veränderungen unter Kontrollgruppe (3. Spalte) und die Studienteilnehmer mit Koronarer Herzkrankheit oder Akutem Koronarsyndrom unter Patienten mit KHK oder ACS (4. Spalte). Alter und BMI jeweils als Median [Q<sub>0,25</sub>; Q<sub>0,75</sub>]. BMI *Body-Mass-Index*.

	ACS-Studie	Kontrollgruppe	Patienten mit KHK oder ACS
Anzahl	172	22	150
Geschlecht	73,8% Männer, 26,2% Frauen	54,5% Männer, 45,5% Frauen	76,7% Männer, 23,3% Frauen
Alter	68 Jahre [58; 76]	55 Jahre [49; 62]	69 Jahre [61; 77]
BMI	26,6 kg/m <sup>2</sup> [24,2; 30,0]	26,7 kg/m <sup>2</sup> [24,2; 30,0]	26,6 kg/m <sup>2</sup> [24,2; 30,3]

Die Studienkohorte setzte sich zu 73,8% aus Männern zusammen, dieses Verhältnis spiegelt sich jedoch auch unverändert in den einzelnen Patientengruppen wider. Bestehende kardiovaskuläre Risikofaktoren, z. B. arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus Typ II, zeigen in den einzelnen Patientengruppen vergleichbare prozentuale Anteile. In den Patientengruppen mit den akuten Ereignissen instabile Angina pectoris und Myokardinfarkt mit (STEMI) oder ohne ST-Streckenhebung (NSTEMI) fällt im Vergleich zur Kontrollgruppe und Patienten mit Koronarer Herzkrankheit ein zunehmendes Alter auf, zudem erhöhte CRP-Werte (C-reaktives Protein, Entzündungsmarker) und die Tendenz zu eingeschränkter Nierenfunktion mit erhöhten Serum-Kreatinin-Konzentrationen und reduzierter GFR (Glomeruläre Filtrationsrate). BMI (*Body-Mass-Index*), Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin und Triglyceride hingegen unterscheiden sich nicht.<sup>18</sup>

### 3.1.7.1 Diagnostische Bedeutung

Die Konzentration von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> im Urin bei Aufnahme nimmt mit steigendem Schweregrad der arteriosklerotischen Erkrankung zu, d.h. Gesunde zeigen die niedrigsten Konzentrationen, während Patienten mit Myokardinfarkt durch die höchsten Konzentrationen gekennzeichnet sind (Abb. 41). Die Kontrollgruppe unterscheidet sich jedoch nicht von Patienten mit Koronarer Herzkrankheit (jeweils Median [Q<sub>0,25</sub>; Q<sub>0,75</sub>]: 126 pg/mg Kreatinin [95; 292] vs. 124 pg/mg Kreatinin [65; 224]; n.s. *one-way ANOVA*). Auch Patienten mit instabiler Angina pectoris (198 pg/mg Kreatinin [105; 321]) weisen noch keinen signifikanten Unterschied im Vergleich

<sup>18</sup> ausführliche Analysen in Dissertation Matthias Werner, Hamburg 2014

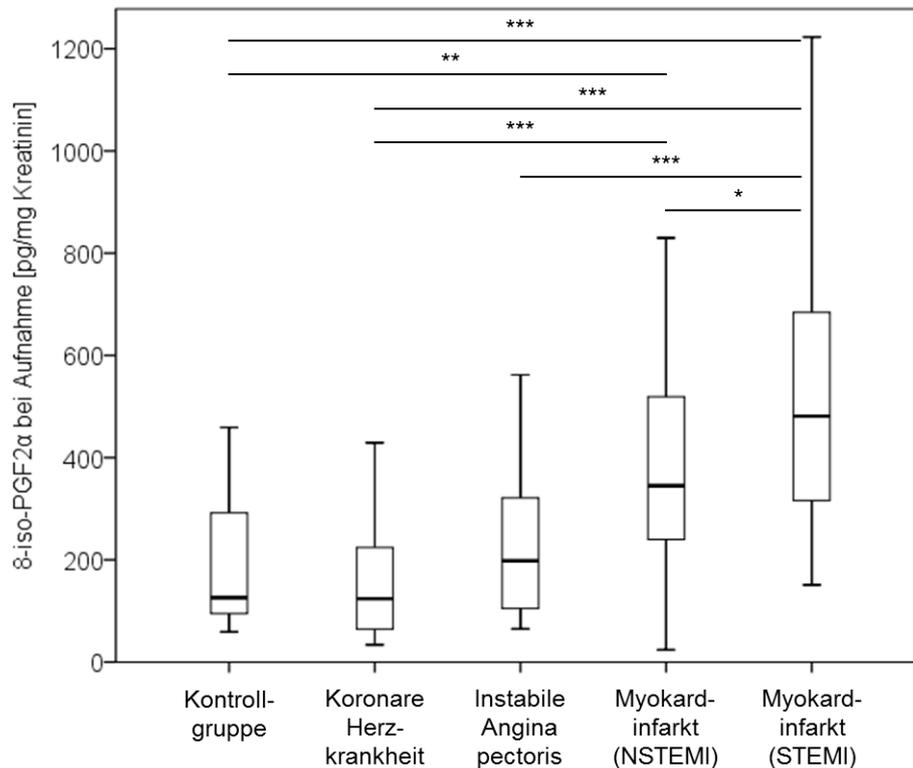


Abb. 41: Konzentration von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> im Urin bei Aufnahme, angegeben in pg/mg Kreatinin. Dargestellt jeweils Median, unteres (25%) sowie oberes (75%) Quartil und Minimum sowie Maximum von Gesunden (Kontrollgruppe; n=22), von Patienten mit Koronarer Herzkrankheit (Koronare Herzkrankheit; n=47), von Patienten mit instabiler Angina pectoris (Instabile Angina pectoris; n=28), von Patienten mit Myokardinfarkt ohne ST-Hebung (Myokardinfarkt (NSTEMI); n=49) und von Patienten mit Myokardinfarkt mit ST-Hebung (Myokardinfarkt (STEMI); n=14). NSTEMI non-ST-elevation myocardial infarction; STEMI ST-elevation myocardial infarction; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 (*one-way ANOVA*, Tukey-Post-hoc-Test).

zur Kontrollgruppe und zu Patienten mit koronarer Herzkrankheit auf, ein Trend zu höheren Konzentrationen ist jedoch ersichtlich. Innerhalb der Patientengruppen mit akuten Ereignissen nimmt die 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration mit steigendem Schweregrad zu (Instabile Angina pectoris: 198 pg/mg Kreatinin [105; 321] < Myokardinfarkt (NSTEMI): 345 pg/mg Kreatinin [240; 519] < Myokardinfarkt (STEMI): 481 pg/mg Kreatinin [316; 684]). 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentrationen im Urin von Patienten mit Myokardinfarkt ohne ST-Hebung fallen signifikant höher aus als die im Urin von Gesunden (345 pg/mg Kreatinin [240; 519] vs. 126 pg/mg Kreatinin [95; 292]; p<0,01 *one-way ANOVA*) und Patienten mit Koronarer Herzkrankheit (345 pg/mg Kreatinin [240; 519] vs. 124 pg/mg Kreatinin [65; 224]; p<0,001 *one-way ANOVA*), jedoch nicht von Patienten mit instabiler Angina pectoris (345 pg/mg Kreatinin [240; 519] vs. 198 pg/mg Kreatinin [105; 321]; n.s. *one-way ANOVA*). Die höchsten Konzentrationen im Urin von Patienten mit Myokardinfarkt mit ST-Streckenhebung heben sich signifikant von denen in der Kontrollgruppe (481 pg/mg Kreatinin [316; 684] vs. 126 pg/mg Kreatinin [95; 292]; p<0,001

*one-way ANOVA*), denen in Patienten mit Koronarer Herzkrankheit (481 pg/mg Kreatinin [316; 684] vs. 124 pg/mg Kreatinin [65; 224];  $p < 0,001$  *one-way ANOVA*), mit instabiler Angina pectoris (481 pg/mg Kreatinin [316; 684] vs. 198 pg/mg Kreatinin [105; 321];  $p < 0,001$  *one-way ANOVA*), und Myokardinfarkt ohne ST-Streckenhebung (481 pg/mg Kreatinin [316; 684] vs. 345 pg/mg Kreatinin [240; 519];  $p < 0,05$  *one-way ANOVA*) ab.

### 3.1.7.2 Querschnittsanalysen

Korrelationsanalysen (siehe Tab. 21) ergaben eine negative Korrelation der 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Konzentration bei Aufnahme mit der Serumkreatinin-Konzentration ( $\rho = -0,199$ ,  $p < 0,05$ ) sowie eine positive Korrelation mit CRP ( $\rho = 0,387$ ,  $p < 0,001$ ) und Troponin T ( $\rho = 0,567$ ,  $p < 0,001$ ).

Tab. 21: Korrelationsanalysen zwischen der 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Konzentration bei Aufnahme und LDL, HDL, Serumkreatinin, eGFR, CRP und Troponin T. Angegeben jeweils Spearman-Korrelationskoeffizient  $\rho$  und Signifikanz als  $p$ -Wert (Parameter mit  $p < 0,05$  hervorgehoben). LDL low-density lipoprotein; HDL high-density lipoprotein; eGFR estimated GFR (Glomeruläre Filtrationsrate); CRP C-reaktives Protein.

	Spearman-Korrelationskoeffizient $\rho$	Signifikanz (p-Wert)
LDL	0,106	0,251
HDL	-0,034	0,715
<b>Serumkreatinin</b>	<b>-0,199</b>	<b>0,026</b>
eGFR	0,094	0,301
<b>CRP</b>	<b>0,387</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>Troponin T</b>	<b>0,567</b>	<b>&lt;0,001</b>

### 3.1.7.3 Prognostische Bedeutung

Neben der in Kap. 3.1.7.1 gezeigten diagnostischen Bedeutung von 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  wurde die prognostische Bedeutung von 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  für das Überleben der Patienten untersucht. Dies erfolgte anhand Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse hinsichtlich des kombinierten Endpunktes „Myokardinfarkt, Schlaganfall oder Tod“ über 1200 Tage.

Bei Betrachtung der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration bei Aufnahme treten bei 67 Fällen, deren 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration unter dem Median (231 pg/mg Kreatinin) liegt, 16 Ereignisse auf (Abb. 42). Bei 70 Fällen hingegen, deren 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration größer als die mediane Konzentration ist oder dieser entspricht, treten 19 Ereignisse auf (Abb. 42). Die Überlebenszeitkurve der Patienten mit einer 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration, die den Median übersteigt, liegt kontinuierlich unter der der Patienten mit einer niedrigeren als der medianen 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration, was auf ein tendenziell verkürztes Überleben derjenigen mit 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentrationen über dem Median hinweist (Abb. 42). Die mediane Beobachtungszeit beträgt 395 Tage [Q<sub>0,25</sub>=316; Q<sub>0,75</sub>=1016].

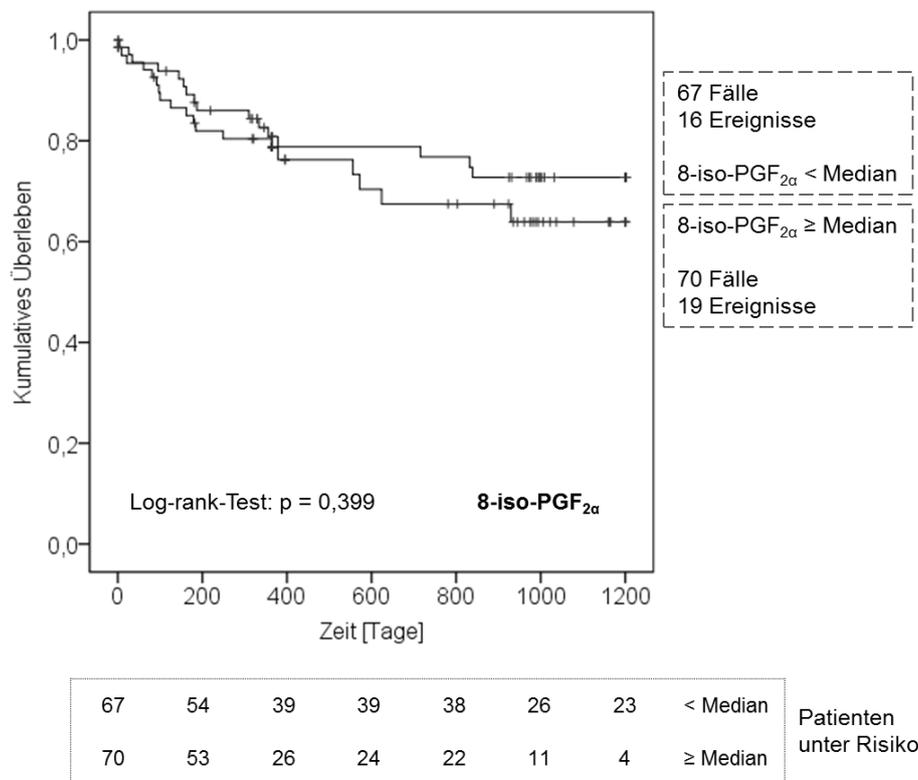


Abb. 42: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse mit der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration im Urin bei Aufnahme. Kumulatives Überleben (0 - 1 entspricht 0 - 100%) auf der Ordinate, Beobachtungszeitraum über 1200 Tage auf Abszisse. Kombierter Endpunkt aus Myokardinfarkt, Schlaganfall und Tod. Bei Eintritt des kombinierten Endpunktes Sprung der Kurve nach unten, zensierte Patienten (*lost to follow-up*: der Beobachtung ohne Eintritt des Endpunktes verloren gegangen) durch einen senkrechten Strich gekennzeichnet. Jeweils Überlebenskurve und Anzahl der Patienten unter Risiko für 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration < und ≥ Median (231 pg/mg Kreatinin). Log-rank-Test als nichtparametrischer Test auf unterschiedliches Risiko der beiden Gruppen für Eintritt des Endpunktes.

## 3.2 Zusammenhang zwischen 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und S1P

### 3.2.1 Netzwerkanalyse

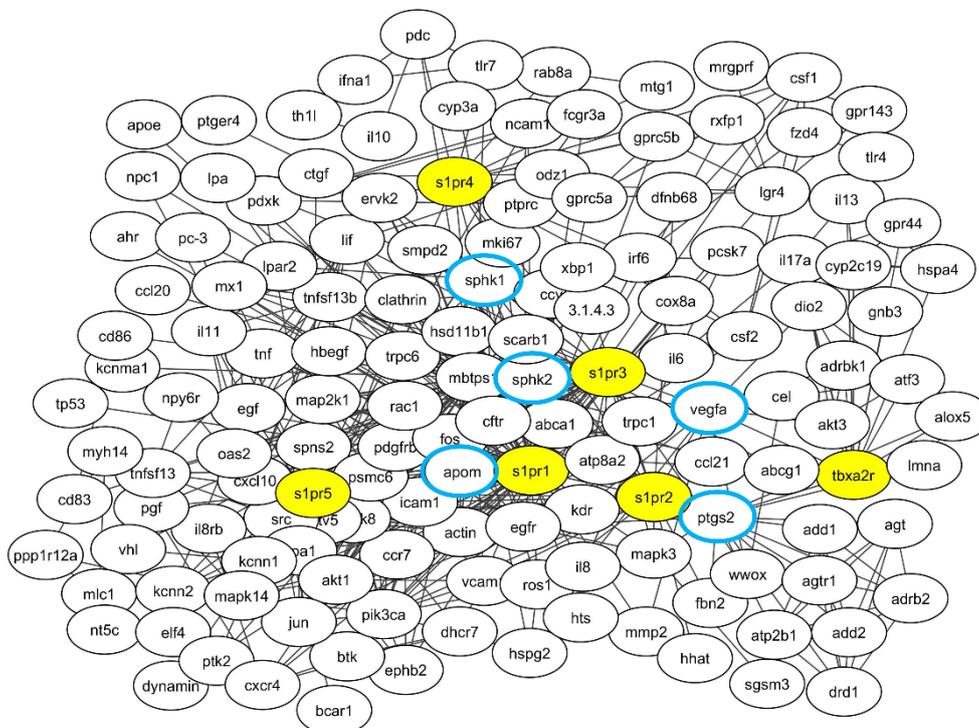


Abb. 43: Netzwerk der mit S1PR<sub>1-5</sub>- und TP-assoziierten Gene. Es wird die Verknüpfung der S1PR<sub>1-5</sub>-Expression untereinander und zum TP dargestellt. Entsprechende Gene zur Expression von S1PR<sub>1-5</sub>- und TP selbst sind gelb hervorgehoben, im Text beschriebene assoziierte Gene sind mit blauem Rahmen gekennzeichnet. s1pr1 S1P-Rezeptor 1-Gen; s1pr2 S1P-Rezeptor 2-Gen; s1pr3 S1P-Rezeptor 3-Gen; s1pr4 S1P-Rezeptor 4-Gen; s1pr5 S1P-Rezeptor 5-Gen; tbxa2r Thromboxan-Rezeptor (TP)-Gen; sphk1 Sphingosin-Kinase 1-Gen; sphk2 Sphingosin-Kinase 2-Gen; apom Apolipoprotein M-Gen; vegfa VEGF-A (*vascular endothelial growth factor A*)-Gen; ptgs2 COX-2 (Cyclooxygenase-2)-Gen.<sup>19</sup>

Ein möglicher Zusammenhang zwischen 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und S1P auf Expressionsebene der jeweiligen Rezeptoren wurde anhand einer Netzwerkanalyse untersucht. Das in Abb. 43 dargestellte Netzwerk verdeutlicht die Verknüpfung der S1PR<sub>1-5</sub> untereinander und mit Genen von am S1P-Stoffwechsel beteiligten Proteinen, so z. B. sphk1 (Sphingosin-Kinase 1), sphk2 (Sphingosin-Kinase 2) und apom (Apolipoprotein M). Außerdem wird die Verknüpfung von tbxa2r, dem Gen zur Expression des TP, mit denen der S1PR<sub>1-5</sub> veranschaulicht:

<sup>19</sup> erstellt mit Agilent Literature Search 3.1.1 in Cytoscape 3.3.0

Verbindungen liegen z. B. über Genregulation von *vegfa* (VEGF-A *vascular endothelial growth factor A*) und *ptgs2* (COX-2) vor (Abb. 43). Insgesamt interagieren die mit S1P<sub>R1-5</sub>- und TP-assoziierten Gene in einem komplexen Netzwerk.

### 3.2.2 S1P-Konzentrationen in TP-KO und WT-Geschwistern

Die Aktivierung des TP durch Thromboxan stellt eine Voraussetzung für die S1P-Freisetzung aus Thrombozyten dar [100]. Bei einer TP-Defizienz, wie sie in den TP-KO-Mäusen vorliegt, könnte durch fehlende Stimulation des TP und somit verringerter Aktivierung des nachgeschalteten Signalweges eine reduzierte Freisetzung von S1P aus Thrombozyten resultieren. Um zu untersuchen, ob sich dies in erniedrigten S1P-Konzentrationen im Blut widerspiegelt, wurde S1P im Serum von TP-KO-Mäusen und zum Vergleich im Serum von WT-Geschwistern gemessen.

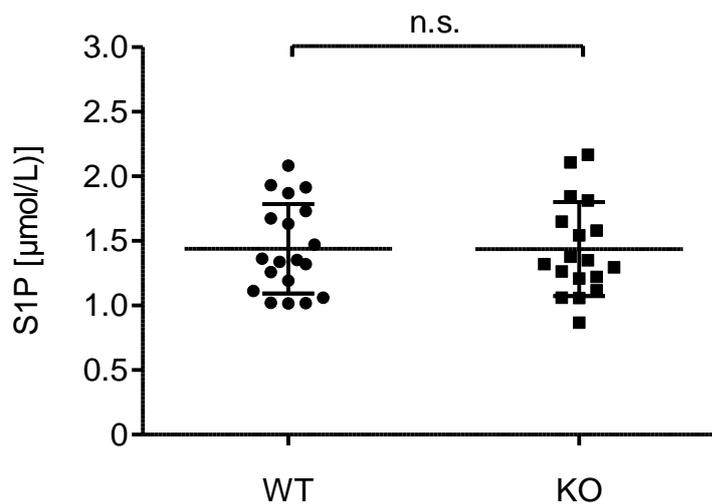


Abb. 44: S1P-Konzentrationen im Serum, gemessen in  $\mu\text{mol/L}$ , von TP-WT- (●;  $n = 19$ ) und TP-KO-Mäusen (■;  $n = 18$ ). Dargestellt als *scatter dot plot* mit  $\text{MW} \pm \text{SD}$ . n.s. nicht signifikant (ungepaarter t-Test).

Die S1P-Konzentration im Serum von TP-KO-Mäusen verglichen mit der im Serum von TP-WT-Mäusen ergab keinen Unterschied (Abb. 44).

### 3.2.3 Intima-Hyperplasie in TP-KO

Im Verletzungsmodell der Ligation der *Arteria carotis* (siehe Kap. 2.3.10) könnte S1P nach Ligation die Entstehung einer Neointima regulieren. Um eine mögliche Änderung in der S1P-Konzentration zu erfassen, wurden die S1P-Konzentrationen im Serum von Wildtyp-Mäusen jeweils unmittelbar vor und 28 Tage nach Ligation der *Arteria carotis* gemessen. Die S1P-Konzentrationen im Serum sanken 28 Tage nach Ligation deutlich ab ( $1,29 \pm 0,12$  vs.  $0,34 \pm 0,23$   $\mu\text{mol/L}$ ;  $p < 0,001$ ; Abb. 45 A:).

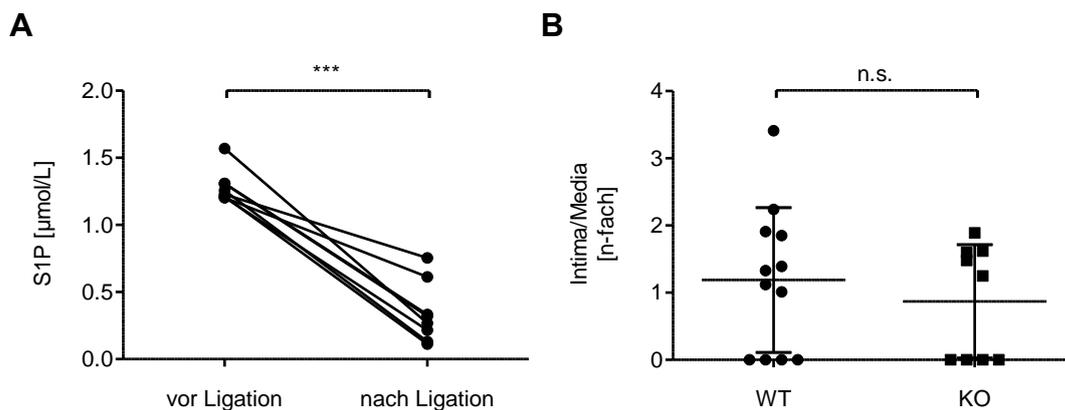


Abb. 45: **A** S1P-Konzentrationen, angegeben in  $\mu\text{mol/L}$ , im Serum von WT-Geschwistertieren, jeweils unmittelbar vor ( $\bullet$ ;  $n=8$ ) und 28 Tage nach ( $\blacksquare$ ;  $n=8$ ) Ligation der *Arteria carotis*. Dargestellt als Einzelwerte im Verlauf. **B** Intima-Media-Quotient der linken *Arteria carotis* in TP-WT ( $\bullet$ ;  $n=12$ ) und -KO-Mäusen ( $\blacksquare$ ;  $n=9$ ) 28 Tage nach Ligation der *Arteria carotis*. Intima-Media-Quotient stellt Dicke der Intima als n-fache der Media dar. Dargestellt als *scatter dot plot* mit  $\text{MW} \pm \text{SD}$ . **A** \*\*\*  $p < 0,001$  (gepaarter t-Test); **B** n.s. nicht signifikant (ungepaarter t-Test).

28 Tage nach Ligation der *Arteria carotis* zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied im Intima-Media-Quotienten zwischen TP-WT und -KO-Karotiden (Abb. 45 B). Die histologischen Schnitte nach HE-Färbung zeigten sowohl für WT- als auch KO-Geschwistertiere unterschiedliche Grade der Hyperplasie (Abb. 46).

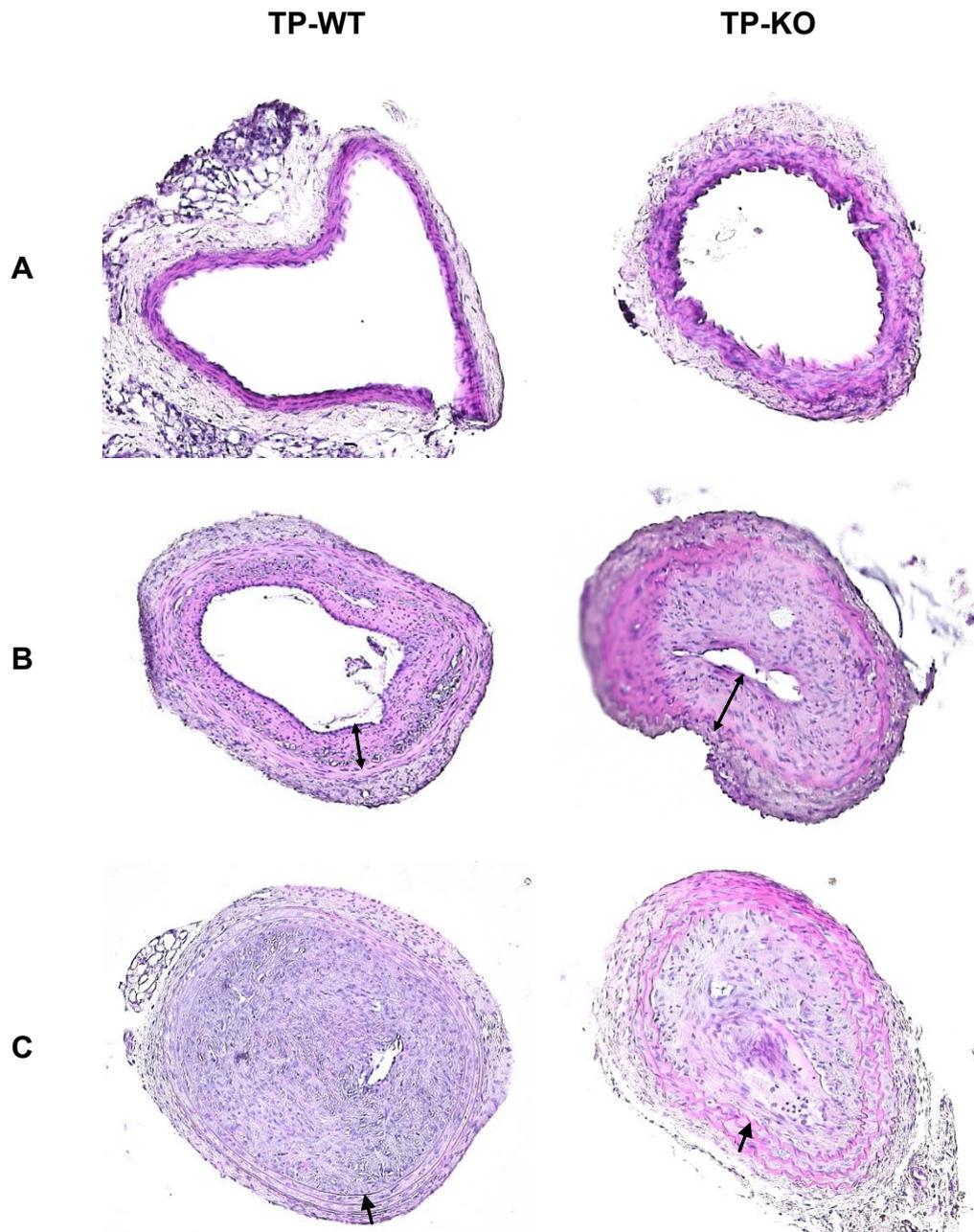


Abb. 46: Histologische Querschnitte der Arteria carotis von TP-WT- (links) und KO-Mäusen (rechts) 28 Tage nach Ligation der Arteria carotis, in 3 Schweregraden: **A** keine Neointima-Ausbildung mit uneingeschränktem Blutfluss, **B** mittelgradige Okklusion mit eingeschränktem Blutfluss (Pfeil stellt Intima-Dicke dar) und **C** hochgradige Stenose mit vollständigem Gefäßverschluss (Pfeil zeigt auf *Lamina elastica interna*). Aufnahmen nach HE-Färbung.

### 3.3 S1P

#### 3.3.1 Quantifizierung von S1P mittels LC-MS/MS

##### 3.3.1.1 C17-S1P als interner Standard

Anhand der in Abb. 47 und Abb. 48 dargestellten Spektren der Reinsubstanzen wurden spezifische MRM (*Multiple Reaction Monitoring*)-Übergänge zur Quantifizierung etabliert. Dabei wird das Mutterion (Molekülion) von S1P mit einem Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z = 380$  in das intensivste Tochterion mit einem Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z = 264$  fragmentiert (Tab. 22 und Abb. 48 B). Als interner Standard wird C17-S1P verwendet, dessen Mutterion mit einem Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z = 366$  in das intensivste Tochterion mit einem Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z = 250$  fragmentiert wird (Tab. 22 und Abb. 47 B).

Abb. 49 zeigt das LC-MS/MS-Chromatogramm von C17-S1P und S1P als Standardsubstanzen. Die aus den Spektren ermittelten Massenübergänge wurden hierzu im MRM-Modus verwendet. Die Retentionszeit  $t_R$  ist für C17-S1P (2,8 min) kürzer als für S1P (3,0 min).

Tab. 22: Massenübergänge als Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  der Analyten S1P und C17-S1P.  $m/z$  des Mutterions  $[M+H]^+$  entspricht Molekulargewicht (unfragmentiertes Molekülion bei  $z = 1$ ),  $m/z$  des Tochterions stellt spezifisches Fragment des Mutterions dar.

Analyt	Mutterion $[M+H]^+$	Tochterion
S1P	380	264
C17-S1P	366	250

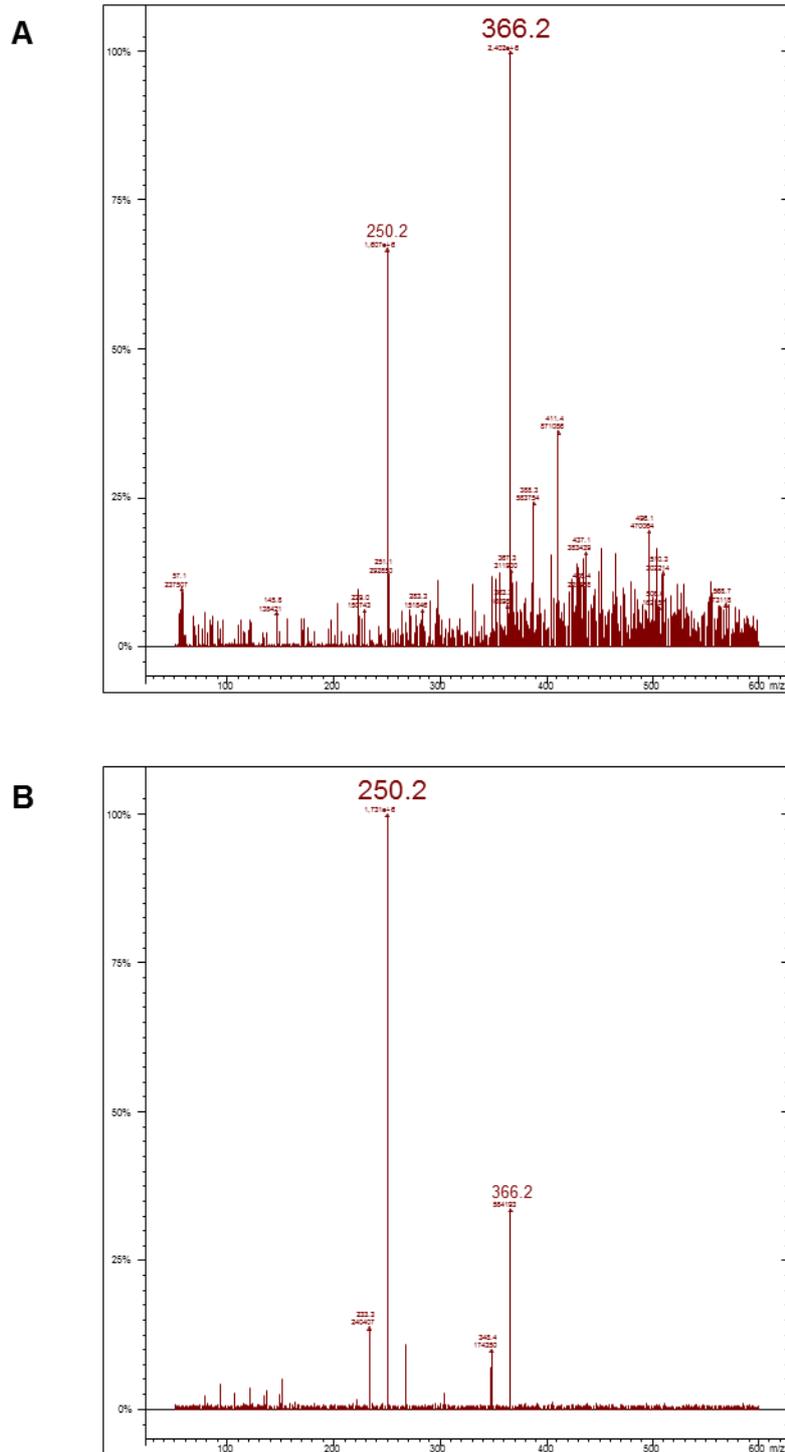


Abb. 47: **A** MS-Spektrum und **B** MS/MS-Spektrum von C17-S1P. Intensität in % auf Ordinate (0 - 100%), Masse/Ladungs-Verhältnis m/z auf Abszisse (m/z = 100 - 600). **A** Selektion des Mutterions m/z = 366 im ersten Quadrupol Q1. **B** Selektion des Tochterions m/z = 250 im dritten Quadrupol Q3 nach Fragmentierung des Mutterions in der Kollisionszelle q2.

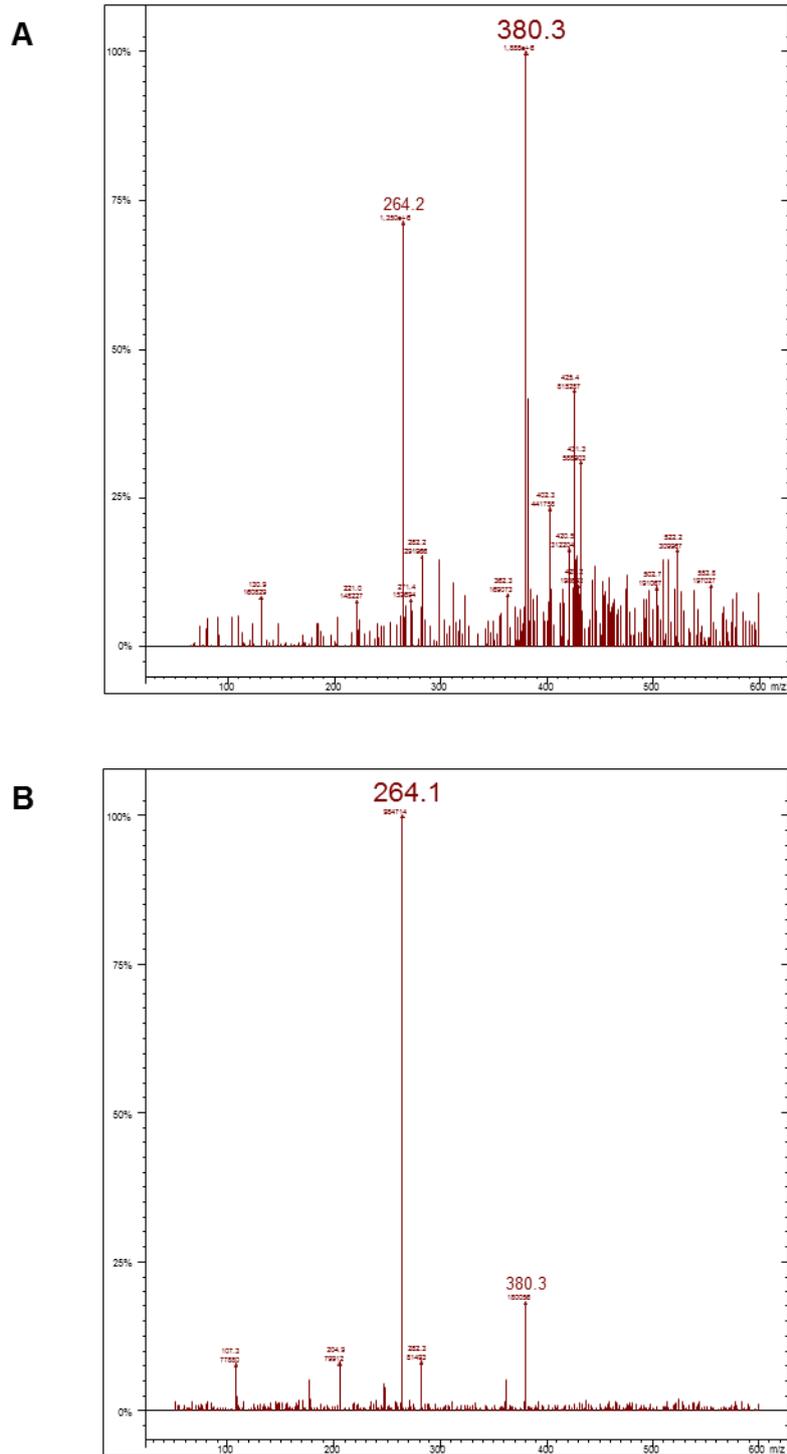


Abb. 48: **A** MS-Spektrum und **B** MS/MS-Spektrum von S1P. Intensität in % auf Ordinate (0 - 100%), Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  auf Abszisse ( $m/z = 100 - 600$ ). **A** Selektion des Mutterions  $m/z = 380$  im ersten Quadrupol Q1. **B** Selektion des Tochterions  $m/z = 264$  im dritten Quadrupol Q3 nach Fragmentierung des Mutterions in der Kollisionszelle q2.

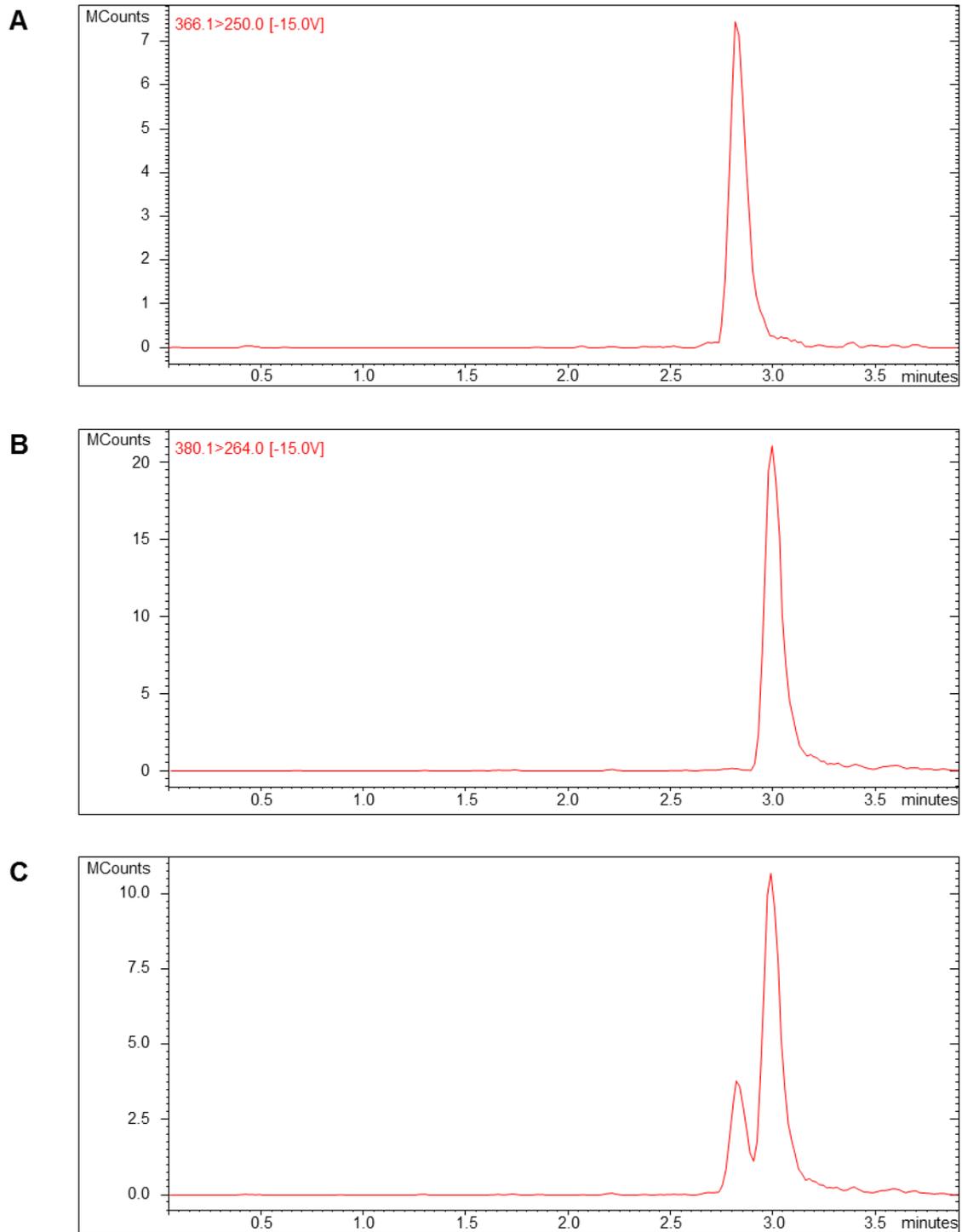


Abb. 49: LC-MS/MS-Chromatogramm von **A** C17-S1P, **B** S1P bzw. **C** C17-S1P und S1P. Intensität in MCounts auf Ordinate, Zeit in Minuten auf Abszisse. **A** Retentionszeit  $t_R$  von C17-S1P = 2,8 min. **B** Retentionszeit  $t_R$  von S1P = 3,0 min. **C** Vergleich der Retentionszeiten ( $t_R$  C17-S1P <  $t_R$  S1P). M Mega.

### 3.3.1.2 [16,17,18-<sup>2</sup>H<sub>7</sub>]-S1P als interner Standard

Anhand der in Abb. 50 dargestellten Spektren der Reinsubstanz wurde ein spezifischer MRM-Übergang zur Quantifizierung etabliert. Dabei wird das Mutterion (Molekülion) von [16,17,18-<sup>2</sup>H<sub>7</sub>]-S1P (S1P-*d*<sub>7</sub>) mit einem Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z = 387$  in das intensivste Tochterion mit einem Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z = 271$  fragmentiert (Tab. 23 und Abb. 50 B).

Abb. 51 zeigt das LC-MS/MS-Chromatogramm von S1P-*d*<sub>7</sub> und S1P. Für S1P und S1P-*d*<sub>7</sub> zeigen sich identische Retentionszeiten ( $t_R = 3,0$  min und 3,0 min).

Tab. 23: Massenübergänge als Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  der Analyten S1P und S1P-*d*<sub>7</sub>.  $m/z$  des Mutterions  $[M+H]^+$  entspricht Molekulargewicht (unfragmentiertes Molekülion bei  $z = 1$ ),  $m/z$  des Tochterions stellt spezifisches Fragment des Mutterions dar.

Analyt	Mutterion $[M+H]^+$	Tochterion
S1P	380	264
S1P- <i>d</i> <sub>7</sub>	387	271

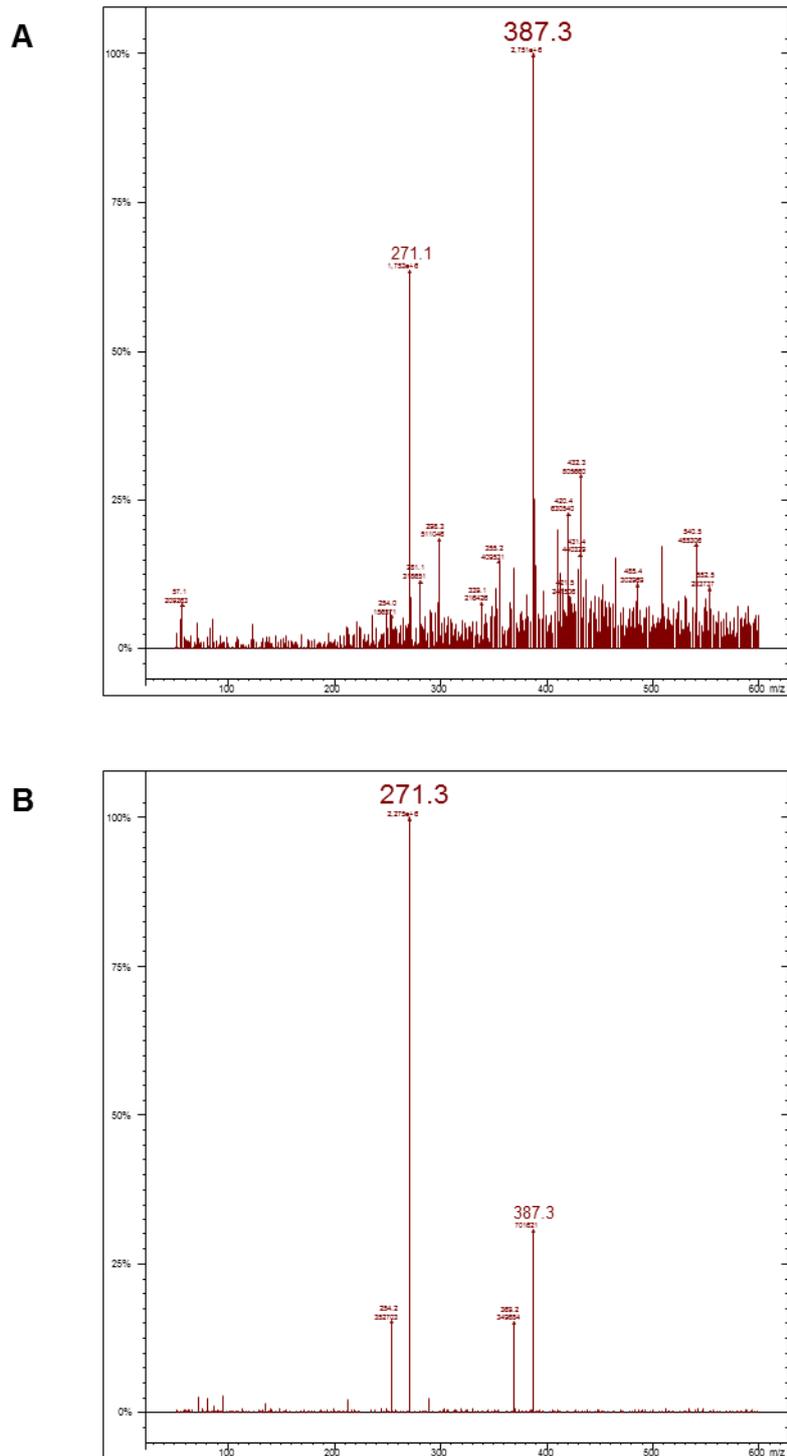


Abb. 50: **A** MS-Spektrum und **B** MS/MS-Spektrum von S1P- $d_7$ . Intensität in % auf Ordinate (0 - 100%), Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  auf Abszisse ( $m/z = 100 - 600$ ). **A** Selektion des Mutterions  $m/z = 387$  im ersten Quadrupol Q1. **B** Selektion des Tochterions  $m/z = 271$  im dritten Quadrupol Q3 nach Fragmentierung des Mutterions in der Kollisionszelle q2.

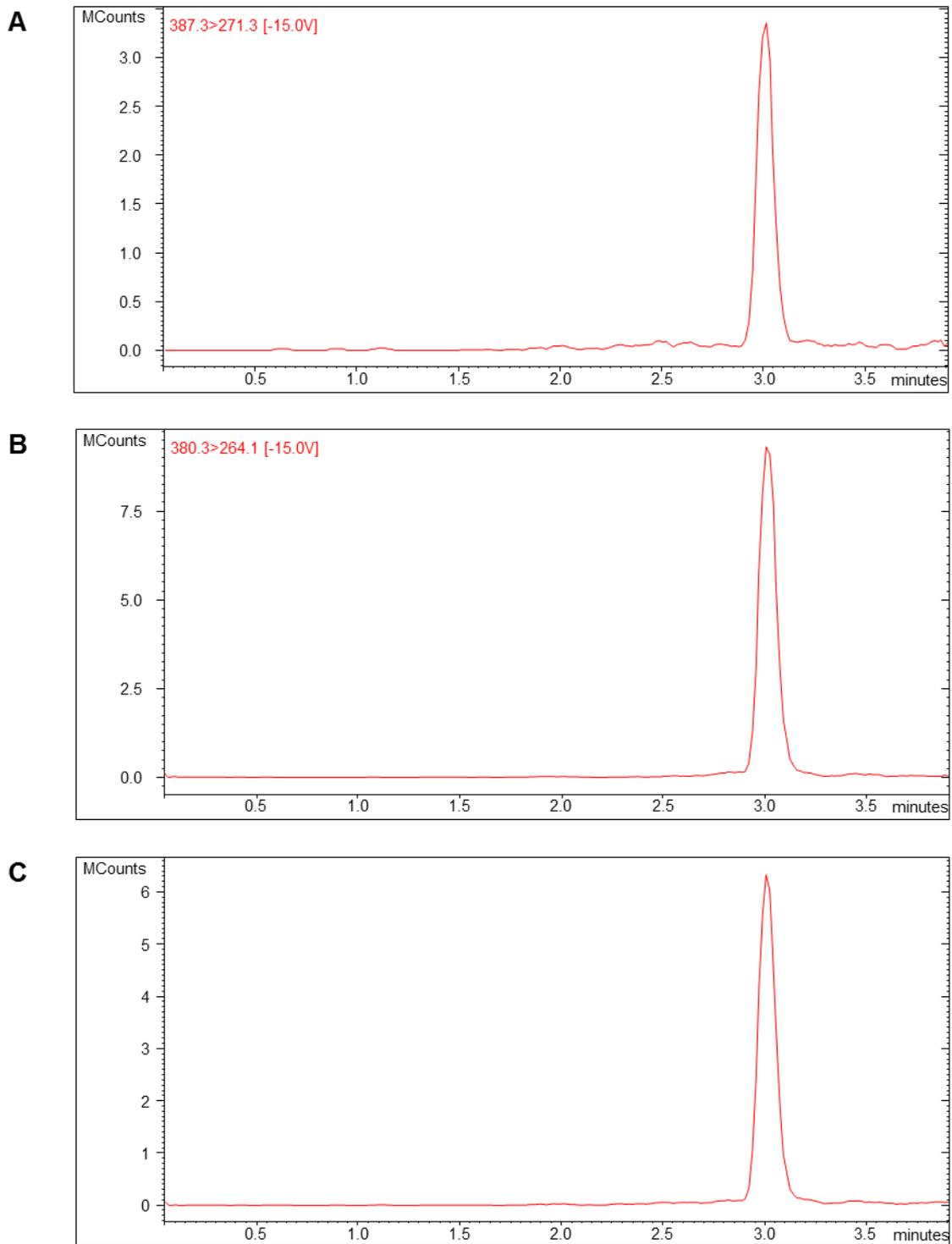


Abb. 51: LC-MS/MS-Chromatogramm von **A** S1P- $d_7$ , **B** S1P bzw. **C** S1P- $d_7$  und S1P. Intensität in MCounts auf Ordinate, Zeit in Minuten auf Abszisse. **A** Retentionszeit  $t_R$  von S1P- $d_7$  = 3,0 min. **B** Retentionszeit  $t_R$  von S1P = 3,0 min. **C** Vergleich der Retentionszeiten ( $t_R$  S1P- $d_7$  =  $t_R$  S1P). M Mega.

### 3.3.1.2.1 Intra-Assay-Validierung

Zur Ermittlung der Intra-Assay-Variabilität der LC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von S1P mit S1P-d7 als internem Standard wurden mittels Additionsmethode 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3 und 10 µmol/L S1P in FCS in fünffacher Ausführung zu humanem Serum gegeben, innerhalb eines Tages aufgearbeitet und vermessen. Die Konzentration des eingesetzten internen Standards betrug 1 µmol/L S1P-d<sub>7</sub>.

Die in Tab. 24 dargestellten Mittelwerte der gemessenen S1P-Konzentrationen liegen, unabhängig von der Menge der hinzugefügten S1P-Konzentration, kontinuierlich unter den erwarteten, hinzugefügten S1P-Konzentrationen. Dies zeigt einen systematischen Fehler. Ab 1 µmol/L beträgt die Wiederfindungsrate 92 - 96%. Als weiteres Maß für Genauigkeit liegt die Präzision der fünf Einzelmessungen pro hinzugefügter S1P-Konzentration, unabhängig von der Menge, zwischen 2 und 8%.

Tab. 24: Intra-Assay-Validierung der LC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von S1P mit S1P-d7 als internem Standard mittels Additionsmethode. Zugabe von 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3 und 10 µmol/L S1P (jeweils n = 5) zu humanem Serum, Aufarbeitung und Messung innerhalb eines Tages. Präzision in % entspricht jeweiligem Variationskoeffizienten der fünf Einzelwerte. Mittelwerte der gemessenen S1P-Konzentrationen abzüglich des S1P-Basalleveles im Serum (MW=0,810 µmol/L; n=5) angegeben in µmol/L. Bias in % entspricht  $(\text{S1P gemessen} - \text{S1P hinzugefügt})/\text{S1P hinzugefügt} \times 100\%$ .

S1P hinzugefügt [µmol/L]	Präzision [%]	S1P gemessen abzügl. Basallevel [µmol/L]	Bias [%]
0,01	4,7±0,2	0,005±0,038	-48,7±385,0
0,03	8,0±0,6	0,003±0,064	-91,7±214,8
0,1	3,2±0,1	0,068±0,028	-31,7±27,7
0,3	3,7±0,1	0,231±0,038	-23,0±12,8
1	2,3±0,1	0,962±0,042	-3,8±4,2
3	3,7±0,1	2,784±0,133	-7,2±4,4
10	8,1±0,7	9,210±0,811	-7,9±8,1
MW	4,8±0,3		-30,6±0,2

### 3.3.1.2.2 Inter-Assay-Validierung

Zur Ermittlung der Inter-Assay-Variabilität LC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von S1P mit S1P- $d_7$  als internem Standard wurde die S1P-Konzentration einer Serum-Probe (zwischenzeitliche Lagerung bei -80 °C) an drei unterschiedlichen Tagen, jeweils in fünffacher Ausführung, bestimmt. Außerdem wurde mittels Additionsmethode, ebenfalls an drei unterschiedlichen Tagen, 1  $\mu\text{mol/L}$  S1P in fünffacher Ausführung zu humanem Serum gegeben, aufgearbeitet und vermessen. Die Konzentration des eingesetzten internen Standards betrug 1  $\mu\text{mol/L}$  S1P- $d_7$ .

Der Mittelwert der 15 gemessenen S1P-Konzentrationen in jeweils mit 1  $\mu\text{mol/L}$  S1P-angereichertem Serum abzüglich des Serum-S1P-Basalleveles beträgt 0,944  $\mu\text{mol/L}$ , woraus sich eine Wiederfindungsrate von 94% ergibt (Tab. 25).

Tab. 25: Inter-Assay-Validierung der LC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von S1P mit S1P- $d_7$  als internem Standard. Messung einer Serum-Probe (0  $\mu\text{mol/L}$  S1P hinzugefügt) an drei unterschiedlichen Tagen, jeweils in Fünffachbestimmung ( $n=15$ ). Mittels Additionsmethode Zugabe von 1  $\mu\text{mol/L}$  S1P zu humanem Serum in fünffacher Ausführung, Aufarbeitung und Messung an drei unterschiedlichen Tagen ( $n=15$ ). Mittelwerte der absoluten S1P-Konzentrationen angegeben in  $\mu\text{mol/L}$ . Präzision in % entspricht jeweiligem Variationskoeffizienten der 15 Einzelwerte. Mittelwert der gemessenen S1P-Konzentrationen im mit 1  $\mu\text{mol/L}$  S1P-angereicherten Serum abzüglich des S1P-Basalleveles im Serum (MW = 0,911  $\mu\text{mol/L}$ ;  $n = 15$ ) angegeben in  $\mu\text{mol/L}$ . Richtigkeit in % entspricht  $(\text{S1P gemessen} - \text{S1P hinzugefügt})/\text{S1P hinzugefügt} \times 100\%$ .

S1P hinzugefügt [ $\mu\text{mol/L}$ ]	S1P gemessen absolut [ $\mu\text{mol/L}$ ]	Präzision [%]	S1P gemessen abzügl. Basallevele [ $\mu\text{mol/L}$ ]	Bias [%]
0	0,911 $\pm$ 0,099	11,0 $\pm$ 1,2	entf.	entf.
1	1,856 $\pm$ 0,117	6,3 $\pm$ 0,4	0,944 $\pm$ 0,117	-5,6 $\pm$ 11,7
MW		8,7 $\pm$ 0,8		

### 3.3.1.3 Einfluss der Matrix auf die S1P-Konzentration im Serum, EDTA-, Heparin- und Citrat-Plasma

Von 10 gesunden Probanden wurden die S1P-Konzentrationen jeweils in Serum, EDTA-, Heparin- und Citrat-Plasma bestimmt und in Abb. 52 dargestellt. Die mittlere S1P-Konzentration im Serum beträgt  $0,943 \pm 0,076 \mu\text{mol/L}$  (MW  $\pm$  SD). Diese fällt im Vergleich zu den S1P-Konzentrationen in den drei verschiedenen Blutplasmen signifikant höher aus. Hier weist Heparin-Plasma mit  $0,537 \pm 0,062 \mu\text{mol/L}$  die höchsten S1P-Konzentrationen auf, gefolgt von EDTA-Plasma mit  $0,519 \pm 0,057 \mu\text{mol/L}$ . Die niedrigsten S1P-Konzentrationen liegen mit  $0,428 \pm 0,092 \mu\text{mol/L}$  in den Citrat-Plasma-Proben vor.

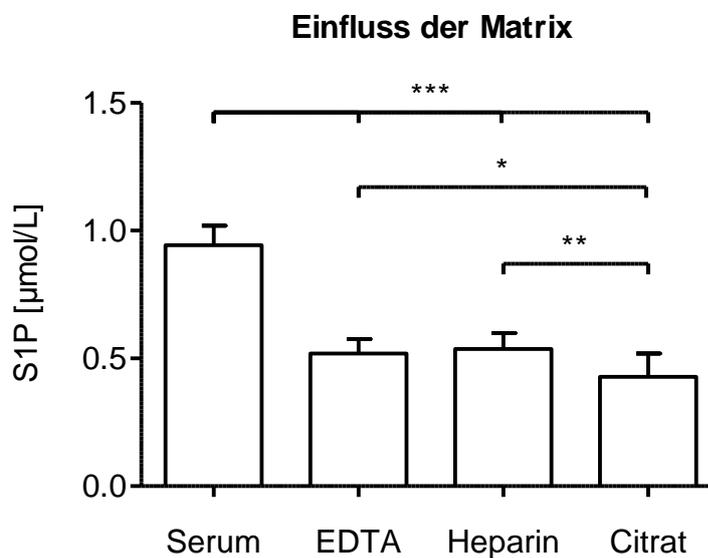


Abb. 52: S1P-Konzentrationen in Serum, EDTA-, Heparin- und Citrat-Plasma von 10 gesunden Probanden, angegeben in  $\mu\text{mol/L}$ . Nach Entnahme sofortige Probenaufbereitung und -messung. Dargestellt jeweils MW  $\pm$  SD. EDTA EDTA-Plasma (Ethylendiamintetraacetat); Heparin Heparin-Plasma; Citrat Citrat-Plasma; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$  (one-way ANOVA, Tukey-Post-hoc-Test).

### 3.3.1.4 S1P-Stabilität in biologischen Proben: Lagerungsdauer und -temperatur

Es wurden jeweils Serum-, EDTA-, Heparin- und Citrat-Plasma-Proben von 10 gesunden Probanden gewonnen und unter unterschiedlichen Bedingungen weiterverarbeitet: Entweder erfolgte eine sofortige Aufbereitung zur Messung, eine vorhergehende 24-stündige Lagerung bei Raumtemperatur oder eine vorhergehende 24-, 48- bzw. 72-stündige Lagerung bei 4 °C im Kühlschrank.

Sowohl nach sofortiger Messung als auch nach vorhergehender Lagerung bei Raumtemperatur oder 4 °C liegen die S1P-Serum-Konzentrationen zwischen 0,93 - 0,98 µmol/L (Abb. 53 A). Im EDTA-Plasma dagegen zeigen die S1P-Konzentrationen nach 24-stündiger Lagerung bei Raumtemperatur einen Anstieg (sofortige Messung vs. 24 h Raumtemperatur:  $0,519 \pm 0,057$  µmol/L vs.  $0,978 \pm 0,120$  µmol/L;  $p < 0,001$  *one-way ANOVA*; Abb. 53 B). Auch bei gekühlter Lagerung steigt die S1P-Konzentration mit zunehmender Lagerungsdauer an (24 h 4 °C:  $0,681 \pm 0,050$  µmol/L; 48 h 4 °C:  $0,726 \pm 0,050$  µmol/L; 72 h 4 °C:  $0,734 \pm 0,055$  µmol/L vs. sofortige Messung:  $0,519 \pm 0,057$  µmol/L; jeweils  $p < 0,001$  *one-way ANOVA*; Abb. 53 B). Die S1P-Konzentrationen im Heparin- und Citrat-Plasma verhalten sich analog zu denen im EDTA-Plasma: Nach 24-stündiger Lagerung bei Raumtemperatur ist ein Anstieg der S1P-Konzentration zu erkennen, ebenso bei 24-, 48- bzw. 72-stündiger Lagerung bei 4 °C (jeweils sofort, 24 h Raumtemperatur, 24 h 4 °C, 48 h 4 °C, 72 h 4 °C: Heparin  $0,537 \pm 0,062$  µmol/L,  $1,022 \pm 0,181$  µmol/L,  $0,715 \pm 0,088$  µmol/L,  $0,756 \pm 0,098$  µmol/L,  $0,806 \pm 0,097$  µmol/L; Citrat  $0,428 \pm 0,092$  µmol/L,  $0,796 \pm 0,139$  µmol/L,  $0,517 \pm 0,081$  µmol/L,  $0,561 \pm 0,071$  µmol/L,  $0,570 \pm 0,096$  µmol/L; Abb. 54).

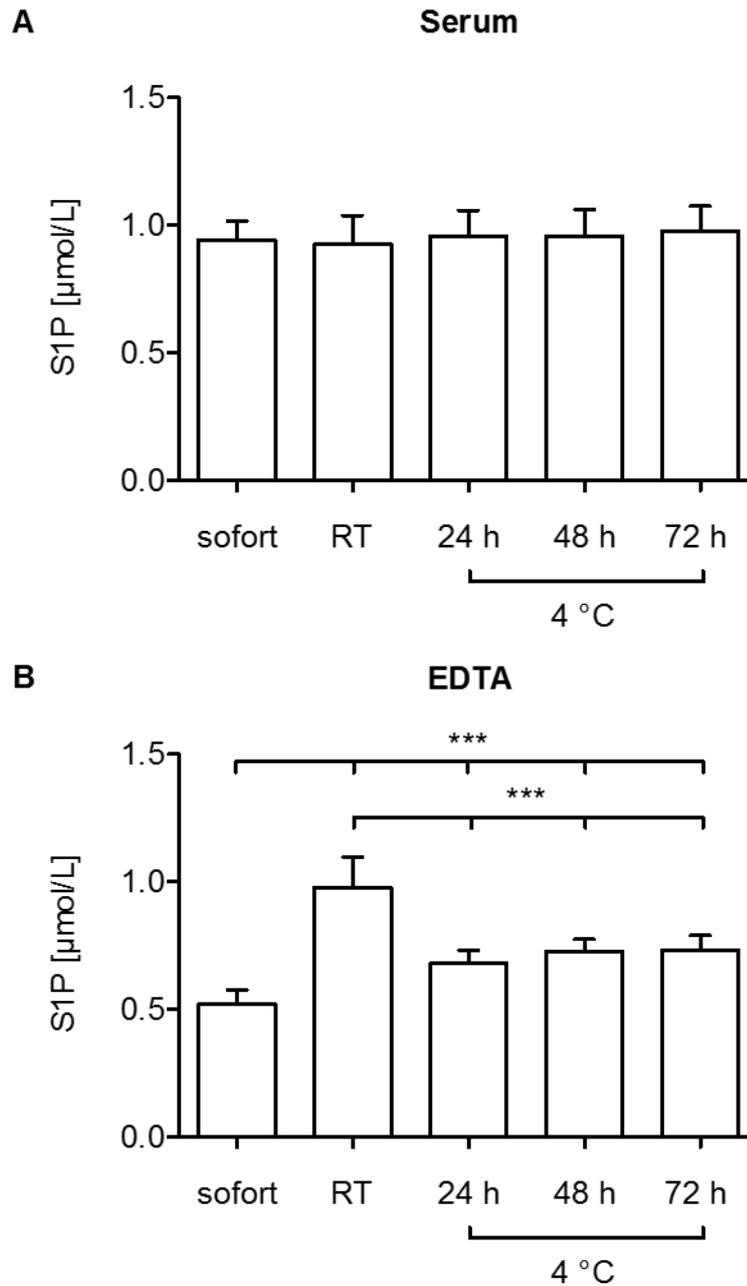


Abb. 53: S1P-Konzentrationen in **A** Serum und **B** EDTA-Plasma von 10 gesunden Probanden, jeweils nach sofortiger Probenaufbereitung und -messung (sofort), vorhergehender 24-stündiger Lagerung bei Raumtemperatur (RT) oder vorhergehender 24-, 48- bzw. 72-stündiger Lagerung bei 4 °C im Kühlschrank (24 h, 48 h bzw. 72 h), angegeben in  $\mu\text{mol/L}$ . Dargestellt jeweils  $\text{MW} \pm \text{SD}$ . RT Raumtemperatur; EDTA EDTA-Plasma (Ethyldiamintetraacetat); \*\*\*  $p < 0,001$  (*one-way ANOVA*, Tukey-Post-hoc-Test).

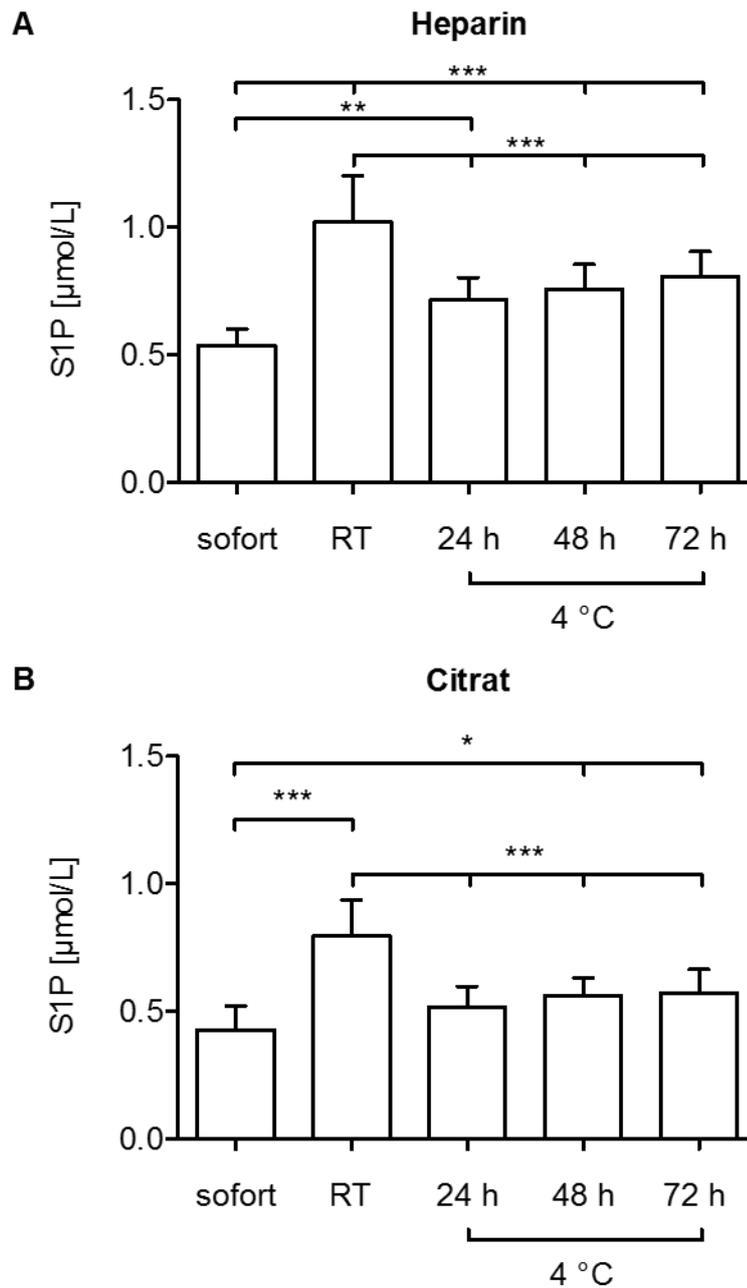


Abb. 54: S1P-Konzentrationen in **A** Heparin- und **B** Citrat-Plasma von 10 gesunden Probanden, jeweils nach sofortiger Probenaufbereitung und -messung (sofort), vorhergehender 24-stündiger Lagerung bei Raumtemperatur (RT) oder vorhergehender 24-, 48- bzw. 72-stündiger Lagerung bei 4 °C im Kühlschrank (24 h, 48 h bzw. 72 h), angegeben in  $\mu\text{mol/L}$ . Dargestellt jeweils  $\text{MW} \pm \text{SD}$ . RT Raumtemperatur; Heparin Heparin-Plasma; Citrat Citrat-Plasma; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$  (one-way ANOVA, Tukey-Post-hoc-Test).

### 3.3.2 S1P-Konzentrationen in verschiedenen Populationen

#### 3.3.2.1 S1P-Konzentrationen in Gesunden<sup>20</sup>

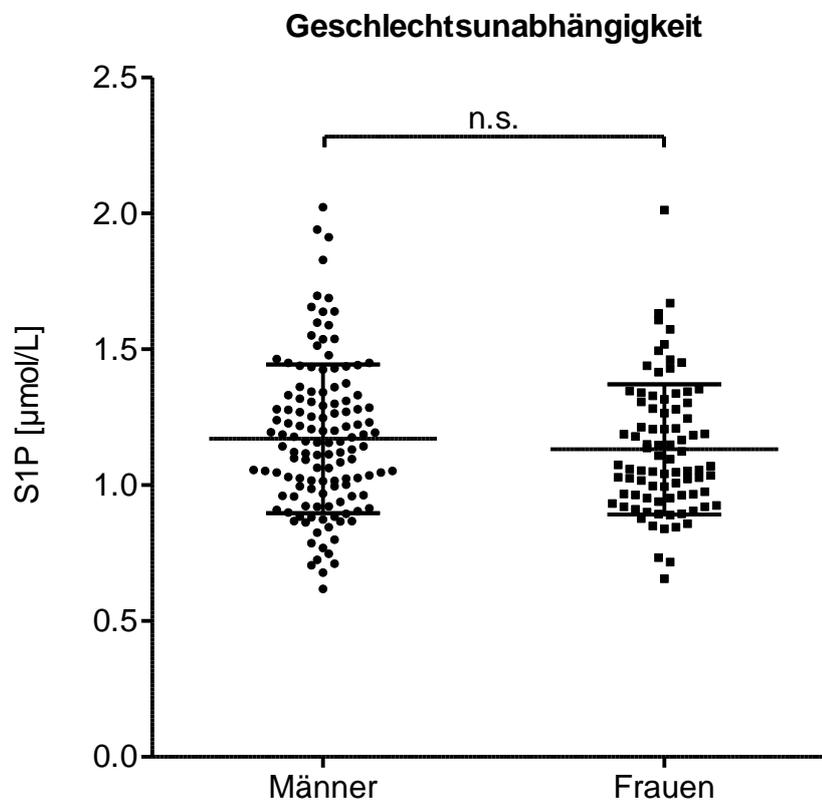


Abb. 55: S1P-Konzentrationen, angegeben in  $\mu\text{mol/L}$ , im Serum von 214 gesunden Kontrollprobanden. Dargestellt sind Einzelwerte in Männern ( $\bullet$ ;  $n=129$ ) und Frauen ( $\blacksquare$ ;  $n=85$ ), sowie  $\text{MW} \pm \text{SD}$ . n.s. nicht signifikant (Mann-Whitney U-Test).

Zur Untersuchung der S1P-Konzentration in Gesunden wurde die S1P-Konzentration im Serum von 214 gesunden Blutspendern gemessen.<sup>21</sup> Die S1P-Konzentrationen im Serum von gesunden Kontrollprobanden verteilten sich sowohl bei Männern als auch bei Frauen im gleichen Wertebereich ( $0,619 - 2,023$  vs.  $0,656 - 2,012$   $\mu\text{mol/L}$ ; Abb. 55). Die S1P-Konzentrationen im Serum von Männern wiesen eine klassische Normalverteilung auf. Beim Vergleich der vorliegenden S1P-Konzentrationen zwischen Männern und Frauen, war kein Unterschied zwischen den Werten zu erkennen ( $1,171 \pm 0,273$  vs.  $1,132 \pm 0,239$   $\mu\text{mol/L}$ ; n.s. Mann-Whitney U Test).

<sup>20</sup> dargestellte Ergebnisse publiziert in [235]

<sup>21</sup> Serumproben freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Maria Geffken und Dr. Sven Peine, Institut für Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE)

Weiterhin zeigten die S1P-Konzentrationen keine Korrelation mit dem Alter, der Spearman-Korrelationskoeffizient betrug nahezu 0 ( $\rho=0,03$ ,  $p=n.s.$ ; Abb. 56). Die mittlere S1P-Konzentration aller Kontrollprobanden betrug  $1,156 \pm 0,261 \mu\text{mol/L}$ .

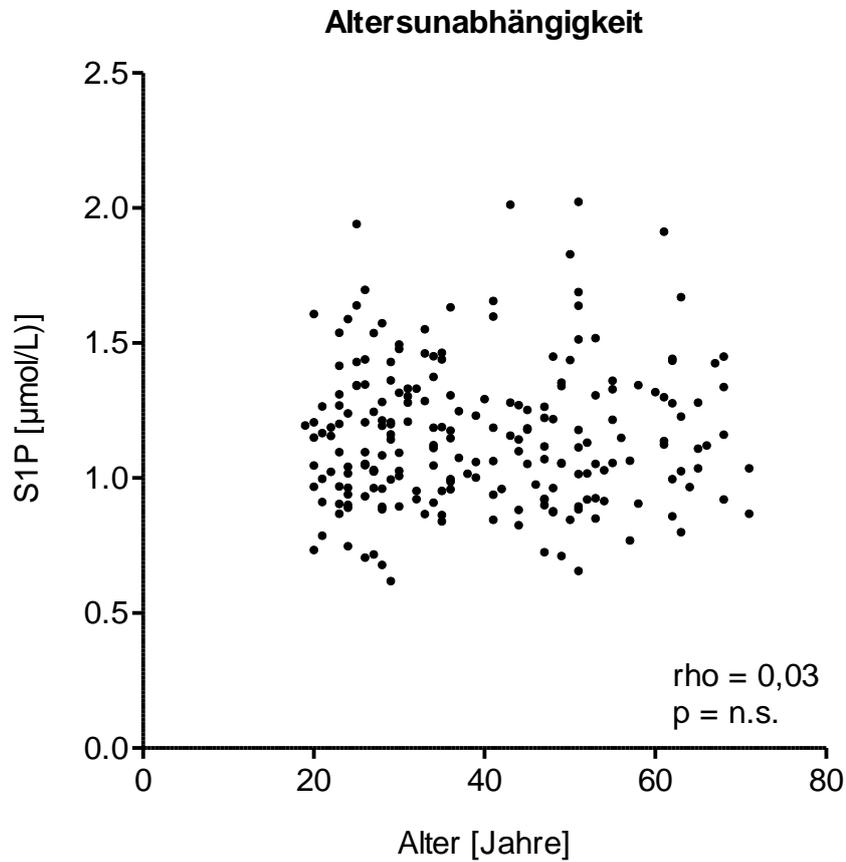


Abb. 56: S1P-Konzentrationen, angegeben in  $\mu\text{mol/L}$ , im Serum von 214 gesunden Kontrollprobanden im Alter von 19 - 71, dargestellt als Einzelwerte (●).  $\rho$  Spearman-Korrelationskoeffizient; n.s. nicht signifikant (Spearman-Korrelation).

### 3.3.2.2 S1P-Konzentrationen in Patienten mit Gefäßerkrankungen

Zur Untersuchung der S1P-Konzentration in Patienten mit Gefäßerkrankungen wurde die S1P-Konzentration im Serum von Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit (n=102) und Patienten mit Karotis-Stenose (n=30) gemessen.<sup>22</sup> Zum Vergleich wurde die S1P-Konzentration in Serumproben einer Kontrollgruppe, bestehend aus 174 gesunden Blutspendern, gemessen.<sup>23</sup> Diese Kontrollgruppe stellt eine zweite, von Kap. 3.3.2.1 unabhängige Kohorte gesunder Blutspender dar. Die Baseline-Charakteristika der Kontrollgruppe und der Patientenkohorte mit Gefäßerkrankungen sind in Tab. 26 aufgeführt.

Tab. 26: Baseline-Charakteristika der Kontrollgruppe aus 174 gesunden Blutspendern und der Patientenkohorte mit Gefäßerkrankungen. Alter als Median [Q<sub>0,25</sub>; Q<sub>0,75</sub>].

	Kontrollgruppe	Patienten mit Gefäßerkrankungen
Anzahl	174	132
Geschlecht	60,9% Männer, 39,1% Frauen	69,7% Männer, 30,3% Frauen
Alter	47 Jahre [33; 57]	70 Jahre [63; 75]

#### 3.3.2.2.1 Diagnostische Bedeutung

Die mittlere S1P-Konzentration in der Kontrollgruppe betrug  $0,879 \pm 0,212 \mu\text{mol/L}$ . Patienten mit Gefäßerkrankungen zeigten, unabhängig von der Lokalisation (alle Patienten), im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigte S1P-Konzentrationen (jeweils Median [Q<sub>0,25</sub>; Q<sub>0,75</sub>]:  $0,561 \mu\text{mol/L}$  [0,465; 0,798] vs.  $0,852 \mu\text{mol/L}$  [0,751; 1,024];  $p < 0,001$  Kruskal-Wallis-Test; Abb. 57). Um diesen beobachteten Unterschied näher zu klassifizieren, wurde hinsichtlich Lokalisation der Gefäßerkrankung zwischen Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit (n=102) und Patienten mit Karotis-Stenose (n=30) differenziert. Die S1P-Konzentration in Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit war im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden signifikant erniedrigt ( $0,595 \mu\text{mol/L}$  [0,462; 0,857] vs.  $0,852 \mu\text{mol/L}$  [0,751; 1,024];  $p < 0,001$  Kruskal-Wallis-Test). Die S1P-Konzentration in Patienten mit Karotis-Stenose lag im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden bei signifikant

<sup>22</sup> Serumproben und Ergebnisse einer durchgeführten Studie von Irina Soltau, AG Günter Daum, Klinik für Gefäßmedizin, Universitäres Herzzentrum Hamburg (UHZ)

<sup>23</sup> Serumproben freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Maria Geffken und Dr. Sven Peine, Institut für Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE)

niedrigeren Werten (0,514  $\mu\text{mol/L}$  [0,467; 0,679] vs. 0,852  $\mu\text{mol/L}$  [0,751; 1,024];  $p < 0,001$  Kruskal-Wallis-Test; Abb. 57).

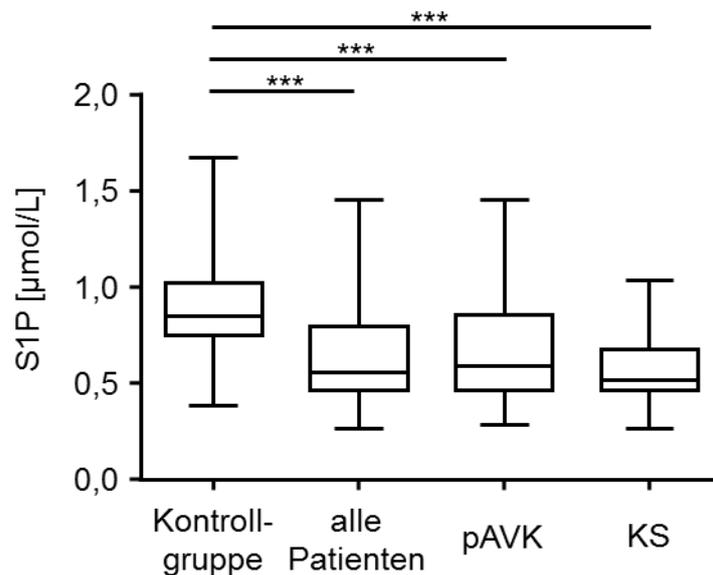


Abb. 57: S1P-Konzentrationen im Serum, gemessen in  $\mu\text{mol/L}$ . Dargestellt jeweils Median, unteres (25%) sowie oberes (75%) Quartil und Minimum sowie Maximum von gesunden Kontrollprobanden ( $n=174$ ), Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit oder Karotis-Stenose (alle Patienten;  $n=132$ ), Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit ( $n=102$ ) und Patienten mit Karotis-Stenose ( $n=30$ ). pAVK periphere arterielle Verschlusskrankheit; KS Karotis-Stenose; \*\*\*  $p < 0,001$  (Kruskal-Wallis-Test, Dunn-Post-hoc-Test).

### 3.3.2.2.2 Querschnittsanalysen

In Querschnittsanalysen wurden mögliche Zusammenhänge zwischen der S1P-Konzentration und anderen Blutparametern der gesunden Kontrollprobanden und Patienten mit Gefäßerkrankungen untersucht. In gesunden Kontrollprobanden zeigte sich eine positive Korrelation der S1P-Konzentration mit der Thrombozytenzahl ( $\rho=0,269$ ,  $p<0,001$ ; Tab. 27). Korrelationsanalysen mit Blutparametern von Patienten mit Gefäßerkrankungen (siehe Tab. 28) ergaben eine positive Korrelation der S1P-Konzentration mit der Hämoglobin-Konzentration ( $\rho=0,197$ ,  $p=0,024$ ), dem Hämatokrit ( $\rho=0,235$ ,  $p=0,007$ ) und der Thrombozytenzahl ( $\rho=0,235$ ,  $p=0,007$ ), sowie eine negative Korrelation mit der Serumkreatinin-Konzentration ( $\rho=-0,217$ ,  $p=0,013$ ).

Tab. 27: Korrelationsanalysen zwischen der S1P-Konzentration und Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, Leukozyten, Thrombozyten, LDL, HDL, Serumkreatinin in gesunden Kontrollprobanden ( $n=174$ ). Angegeben jeweils Spearman-Korrelationskoeffizient  $\rho$  und Signifikanz als  $p$ -Wert (Parameter mit  $p<0,05$  hervorgehoben). LDL *low-density lipoprotein*; HDL *high-density lipoprotein*.

<b>Kontrollgruppe (n=174)</b>		
	Spearman-Korrelationskoeffizient $\rho$	Signifikanz (p-Wert)
Erythrozyten	0,085	0,267
Hämoglobin	0,066	0,390
Hämatokrit	0,088	0,249
Leukozyten	0,118	0,121
<b>Thrombozyten</b>	<b>0,269</b>	<b>&lt;0,001</b>
LDL	0,107	0,161
HDL	-0,102	0,180
Serumkreatinin	-0,050	0,514

Tab. 28: Korrelationsanalysen zwischen der S1P-Konzentration und Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, Leukozyten, Thrombozyten, HDL, Serumkreatinin und CRP in Patienten mit Gefäßerkrankungen (n=132). Angegeben jeweils Spearman-Korrelationskoeffizient rho und Signifikanz als p-Wert (Parameter mit p<0,05 hervorgehoben). HDL *high-density lipoprotein*; CRP C-reaktives Protein.

<b>Patienten mit Gefäßerkrankungen (n=132)</b>		
	Spearman-Korrelationskoeffizient rho	Signifikanz (p-Wert)
Erythrozyten	0,162	0,063
<b>Hämoglobin</b>	<b>0,197</b>	<b>0,024</b>
<b>Hämatokrit</b>	<b>0,235</b>	<b>0,007</b>
Leukozyten	0,159	0,070
<b>Thrombozyten</b>	<b>0,235</b>	<b>0,007</b>
HDL	0,120	0,179
<b>Serumkreatinin</b>	<b>-0,217</b>	<b>0,013</b>
CRP	0,072	0,418

### 3.3.2.3 S1P-Konzentrationen in Patienten mit Akutem Koronarsyndrom

Die Konzentration von S1P im Serum wurde bei 129 Teilnehmern der ACS-Studie bestimmt und im Hinblick auf Unterschiede zwischen den Schweregraden der arteriosklerotischen Erkrankung untersucht (Kap. 2.4.1). Die Blutentnahmen zur Serumgewinnung erfolgten jeweils bei Aufnahme des Patienten. Die zugrunde liegenden *Baseline*-Charakteristika wurden bereits in Kap. 3.1.7 erläutert.

#### 3.3.2.3.1 Diagnostische Bedeutung

Die Serum-Konzentration von S1P bei Aufnahme nimmt mit steigendem Schweregrad der arteriosklerotischen Erkrankung zu, d.h. Patienten mit Koronarer Herzkrankheit ohne akutes Ereignis zeigen die niedrigsten Konzentrationen, während Patienten mit Myokardinfarkt durch die höchsten Konzentrationen gekennzeichnet sind (Abb. 58).

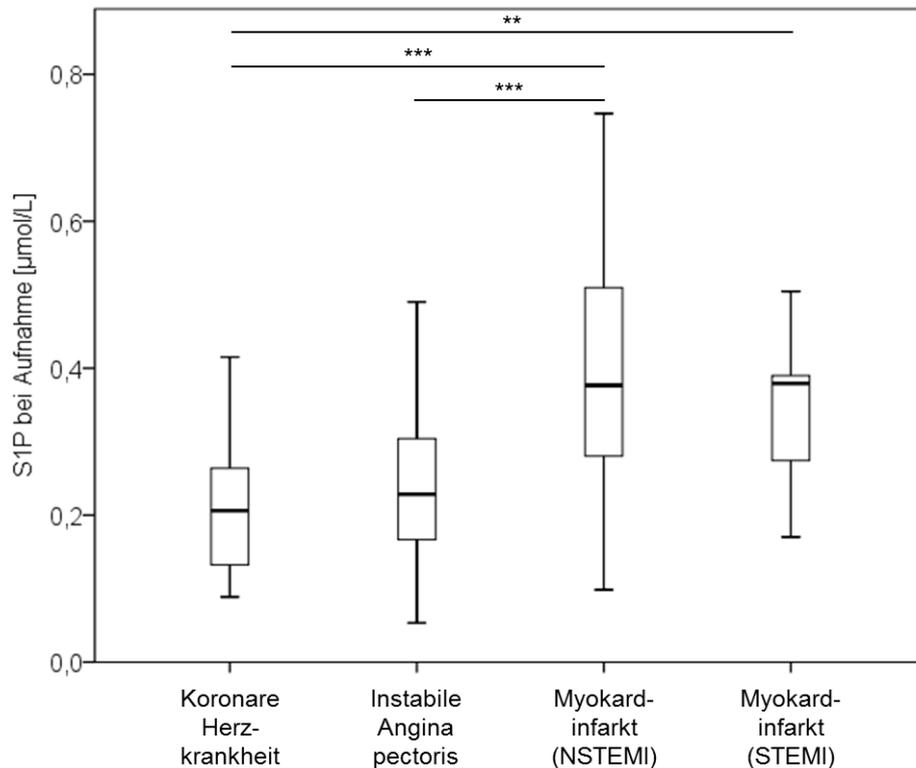


Abb. 58: Konzentration von S1P im Serum bei Aufnahme, angegeben in  $\mu\text{mol/L}$ . Dargestellt jeweils Median, unteres (25%) sowie oberes (75%) Quartil und Minimum sowie Maximum von Patienten mit Koronarer Herzkrankheit (Koronare Herzkrankheit;  $n=41$ ), von Patienten mit instabiler Angina pectoris (Instabile Angina pectoris;  $n=30$ ), von Patienten mit Myokardinfarkt ohne ST-Hebung (Myokardinfarkt (NSTEMI);  $n=47$ ) und von Patienten mit Myokardinfarkt mit ST-Hebung (Myokardinfarkt (STEMI);  $n=11$ ). NSTEMI non-ST-elevation myocardial infarction; STEMI ST-elevation myocardial infarction; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$  (one-way ANOVA, Tukey-Post-hoc-Test).

Patienten mit instabiler Angina pectoris unterscheiden sich nicht von Patienten mit Koronarer Herzkrankheit (jeweils Median [Q<sub>0,25</sub>; Q<sub>0,75</sub>]:  $0,228 \mu\text{mol/L}$  [0,166; 0,305] vs.  $0,206 \mu\text{mol/L}$  [0,130; 0,264]; n.s. one-way ANOVA), ein schwacher Trend zu höheren Konzentrationen ist jedoch ersichtlich. Innerhalb der Patientengruppen mit akuten Ereignissen liegen die S1P-Konzentrationen bei Patienten mit Myokardinfarkt auf einem höheren Niveau als die bei Patienten mit instabiler Angina pectoris (Instabile Angina pectoris vs. Myokardinfarkt (NSTEMI):  $0,228 \mu\text{mol/L}$  [0,166; 0,305] vs.  $0,377 \mu\text{mol/L}$  [0,272; 0,526];  $p<0,001$  one-way ANOVA bzw. Instabile Angina pectoris vs. Myokardinfarkt (STEMI):  $0,228 \mu\text{mol/L}$  [0,166; 0,305] vs.  $0,379 \mu\text{mol/L}$  [0,263; 0,394]; n.s. one-way ANOVA). S1P-Konzentrationen im Serum von Patienten mit Myokardinfarkt ohne ST-Hebung fallen signifikant höher aus als die im Serum von Patienten mit Koronarer Herzkrankheit ( $0,206 \mu\text{mol/L}$  [0,130; 0,264] vs.  $0,377 \mu\text{mol/L}$  [0,272; 0,526];  $p<0,001$  one-way ANOVA) sowie Patienten mit instabiler Angina pectoris (s.o.). Das untere Quartil und der Median der Serum-Konzentrationen von Patienten mit Myokardinfarkt mit ST-Streckenhebung entsprechen denen von Patienten mit

Myokardinfarkt ohne ST-Streckenhebung, das obere Quartil und Maximum sind jedoch deutlich erniedrigt, sodass die entsprechenden Konzentrationen nur noch signifikant von denen in Patienten mit Koronarer Herzkrankheit differenziert werden können (0,206  $\mu\text{mol/L}$  [0,130; 0,264] vs. 0,379  $\mu\text{mol/L}$  [0,263; 0,394];  $p < 0,01$  *one-way ANOVA*), dagegen nicht von denen in Patienten mit instabiler Angina pectoris und mit Myokardinfarkt ohne ST-Streckenhebung.

### 3.3.2.3.2 Querschnittsanalysen

Korrelationsanalysen (siehe Tab. 29) ergaben eine positive Korrelation der S1P-Konzentration bei Aufnahme mit der entsprechenden 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Konzentration zum selben Zeitpunkt ( $\rho = 0,507$ ,  $p < 0,001$ ; Abb. 59) sowie mit LDL ( $\rho = 0,273$ ,  $p < 0,01$ ), CRP ( $\rho = 0,283$ ,  $p = 0,001$ ) und Troponin T ( $\rho = 0,578$ ,  $p < 0,001$ ).

Tab. 29: Korrelationsanalysen zwischen der S1P-Konzentration bei Aufnahme und der 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Konzentration, LDL, HDL, Serumkreatinin, eGFR, CRP und Troponin T. Angegeben jeweils Spearman-Korrelationskoeffizient  $\rho$  und Signifikanz als p-Wert (Parameter mit  $p < 0,05$  hervorgehoben). LDL *low-density lipoprotein*; HDL *high-density lipoprotein*; eGFR *estimated GFR* (Glomeruläre Filtrationsrate); CRP C-reaktives Protein.

	Spearman-Korrelationskoeffizient $\rho$	Signifikanz (p-Wert)
<b>8-iso-PGF<sub>2<math>\alpha</math></sub></b>	<b>0,507</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>LDL</b>	<b>0,273</b>	<b>0,002</b>
HDL	0,037	0,680
Serumkreatinin	-0,002	0,985
eGFR	-0,075	0,400
<b>CRP</b>	<b>0,283</b>	<b>0,001</b>
<b>Troponin T</b>	<b>0,578</b>	<b>&lt;0,001</b>

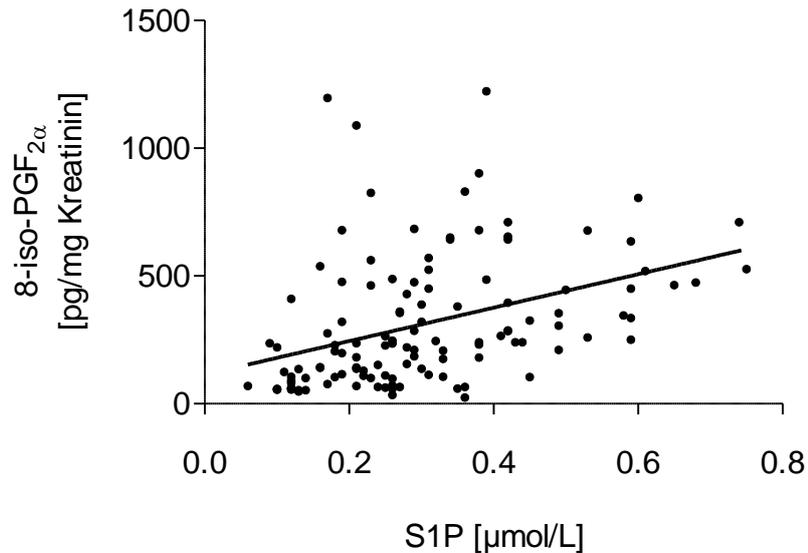


Abb. 59: Korrelationsanalyse von S1P-Konzentration, angegeben in  $\mu\text{mol/L}$ , und 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Konzentration, angegeben in pg/mg Kreatinin (n=122; rho=0,507, p<0,001). rho Spearman-Korrelationskoeffizient.

### 3.3.2.3.3 Prognostische Bedeutung

Neben der in Kap. 3.3.2.3.1 gezeigten diagnostischen Bedeutung der Serum-S1P-Konzentration bei Aufnahme sollte auch die Bedeutung von S1P als prognostischer Marker für das Überleben untersucht werden. Dies erfolgte anhand Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse hinsichtlich des kombinierten Endpunktes „Myokardinfarkt, Schlaganfall oder Tod“ über 1200 Tage.

Bei Betrachtung der S1P-Konzentration bei Aufnahme treten bei 64 Fällen, deren S1P-Konzentration unter dem Median (0,270  $\mu\text{mol/L}$ ) liegt, 10 Ereignisse auf (Abb. 60). Bei 65 Fällen hingegen, deren S1P-Konzentration größer als die mediane Konzentration ist oder dieser entspricht, treten 21 Ereignisse auf (Abb. 60). Die Überlebenszeitkurve der Patienten mit einer S1P-Konzentration, die größer als der Median ist, sinkt im Vergleich zu der der Patienten mit einer niedrigeren als der medianen S1P-Konzentration ab (Abb. 60). Folglich prognostiziert eine S1P-Konzentration, die bei Aufnahme größer als die mediane S1P-Konzentration ausfällt, eine signifikant verkürzte Überlebenszeit (Log-rank-Test: p=0,016). Dieser Zusammenhang zeigt sich auch tendenziell in einer Alters- und Geschlechts-adjustierten Cox-Regression (p=0,054). Die mediane Beobachtungszeit beträgt 395 Tage [Q<sub>0,25</sub>=312; Q<sub>0,75</sub>=1005].

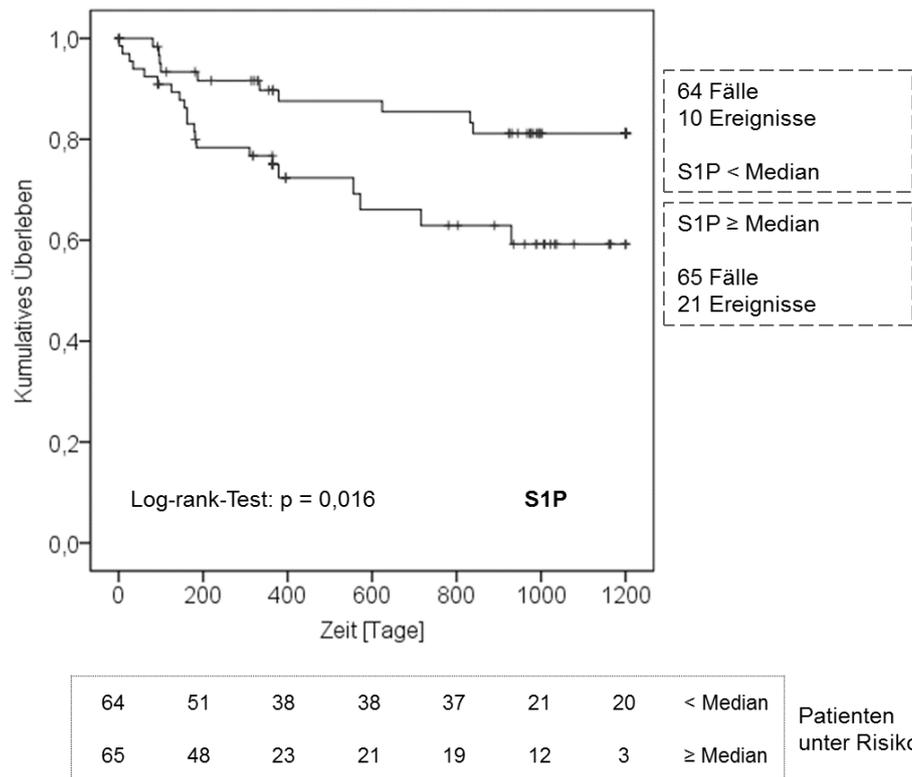


Abb. 60: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse mit der S1P-Konzentration im Serum bei Aufnahme. Kumulatives Überleben (0 - 1 entspricht 0 - 100%) auf der Ordinate, Beobachtungszeitraum über 1200 Tage auf Abszisse. Kombiniertes Endpunkt aus Myokardinfarkt, Schlaganfall und Tod. Bei Eintritt des kombinierten Endpunktes Sprung der Kurve nach unten, zensierte Patienten (*lost to follow-up*: der Beobachtung ohne Eintritt des Endpunktes verloren gegangen) durch einen senkrechten Strich gekennzeichnet. Jeweils Überlebenskurve und Anzahl der Patienten unter Risiko für S1P-Konzentration < und  $\geq$  Median ( $0,270 \mu\text{mol/L}$ ). Log-rank-Test als nichtparametrischer Test auf unterschiedliches Risiko der beiden Gruppen für Eintritt des Endpunktes.

### 3.3.2.4 S1P-Konzentrationen in Patienten mit Pulmonaler Arterieller Hypertonie

S1P wurde im Plasma von Patienten mit PAH (n=108) als diagnostischer und prognostischer Marker für das 3-Jahres-Überleben untersucht. Die Baseline-Charakteristika der sog. iP4-Studie sind in Tab. 30 aufgeführt. Der mittlere pulmonalarterielle Druck der eingeschlossenen Patienten betrug 50 mmHg [77]. 24% der Studienkohorte ließ sich in NYHA I oder II einkategorisieren, 66% in NYHA III und 10% in NYHA IV [77].<sup>24</sup>

Tab. 30: Baseline-Charakteristika der iP4-Studienteilnehmer. Alter, Größe, Gewicht und BMI jeweils als Median [Q<sub>0,25</sub>; Q<sub>0,75</sub>]. BMI *Body-Mass-Index*.

iP4-Studie	
Anzahl	108
Geschlecht	48,1% Männer, 51,9% Frauen
Alter	55 Jahre [42; 68]
BMI	25,2 kg/m <sup>2</sup> [21,3; 29,9]

#### 3.3.2.4.1 Diagnostische Bedeutung

Im Plasma von 108 PAH-Patienten beträgt die mittlere bzw. mediane S1P-Konzentration  $0,447 \pm 0,165$   $\mu\text{mol/L}$  (MW  $\pm$  SD) bzw.  $0,454$   $\mu\text{mol/L}$  [0,327; 0,560] (Median [Q<sub>0,25</sub>; Q<sub>0,75</sub>] (Abb. 61). Vergleicht man innerhalb dieser PAH-Kohorte die S1P-Konzentrationen der 76 iPAH- und 32 non-iPAH-Patienten (jeweils Median [Q<sub>0,25</sub>; Q<sub>0,75</sub>]:  $0,457$   $\mu\text{mol/L}$  [0,334; 0,560] vs.  $0,397$   $\mu\text{mol/L}$  [0,314; 0,557]; n.s.), zeichnet sich kein signifikanter Unterschied ab, dennoch ein schwacher Trend zu erniedrigten Konzentrationen im Plasma der non-iPAH-Patienten (Abb. 61). Da die Gruppe aller PAH-Patienten hauptsächlich aus iPAH-Patienten besteht, sind beide Gruppen durch einen nahezu identischen Median und Interquartilsabstand (alle PAH-Patienten:  $0,454$   $\mu\text{mol/L}$  [0,327; 0,560] bzw. iPAH-Patienten:  $0,457$   $\mu\text{mol/L}$  [0,334; 0,560]) sowie durch eine nahezu identische Spannweite ( $0,103 - 0,924$   $\mu\text{mol/L}$  bzw.  $0,136 - 0,924$   $\mu\text{mol/L}$ ) gekennzeichnet (Abb. 61).

<sup>24</sup> ausführliche Analysen in [77]

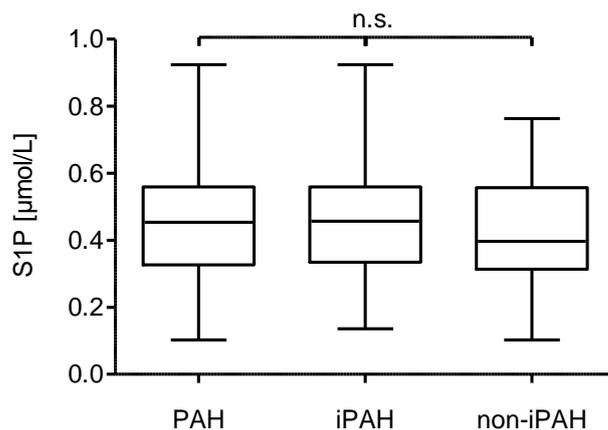


Abb. 61: Konzentration von S1P im Plasma von allen PAH-Patienten der iP4-Studie (links: PAH; n=108), iPAH-Patienten der iP4-Studie (Patienten mit idiopathischer PAH; Mitte: iPAH; n=76) und non-iPAH-Patienten der iP4-Studie (Patienten mit hereditärer PAH, durch Medikamente oder Toxine verursachter PAH, mit Bindegewebserkrankungen oder angeborenen Herzfehlern assoziierter PAH und PVOD; rechts: non-iPAH; n=32), angegeben in  $\mu\text{mol/L}$ . Dargestellt jeweils Median, unteres (25%) sowie oberes (75%) Quartil und Minimum sowie Maximum. n.s. nicht signifikant (*one-way ANOVA*, Tukey-Post-hoc-Test).

### 3.3.2.4.2 Querschnittsanalysen

Korrelationsanalysen (siehe Tab. 31) ergaben keine Korrelationen der S1P-Konzentration mit der entsprechenden 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Konzentration, der Serumkreatinin-Konzentration oder dem N-terminalem Propeptid BNP (NT-proBNP).

Tab. 31: Korrelationsanalysen zwischen der S1P-Konzentration im Plasma und der 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Konzentration im Urin, Serumkreatinin und NT-proBNP. Angegeben jeweils Spearman-Korrelationskoeffizient rho und Signifikanz als p-Wert. NT-proBNP N-terminales Propeptid BNP (brain natriuretic peptide).

	Spearman-Korrelationskoeffizient rho	Signifikanz (p-Wert)
8-iso-PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	0,057	0,562
Serumkreatinin	0,096	0,324
NT-proBNP	0,101	0,297

### 3.3.2.4.3 Prognostische Bedeutung

Bei Betrachtung der S1P-Plasma-Konzentration treten bei 54 Fällen, deren S1P-Konzentration unter dem Median ( $0,454 \mu\text{mol/L}$ ) liegt, 15 Ereignisse auf (Abb. 62). Bei 54 Fällen hingegen, deren S1P-Konzentration größer als die mediane Konzentration ist oder dieser entspricht, treten 12 Ereignisse auf (Abb. 62). Die Überlebenszeitkurve der Patienten mit einer niedrigeren als der medianen S1P-Konzentration, liegt kontinuierlich unter der der Patienten, deren S1P-Konzentration den Median übersteigt, was auf ein tendenziell verkürztes Überleben derjenigen mit S1P-Konzentrationen unter dem Median hinweist (Abb. 62). Allerdings handelt es sich dabei lediglich um eine schwache Tendenz, der Log-rank-Wert liegt weit über der Signifikanzgrenze. Die mediane Beobachtungszeit beträgt 1092 Tage [ $Q_{0,25}=1092$ ;  $Q_{0,75}=1092$ ].

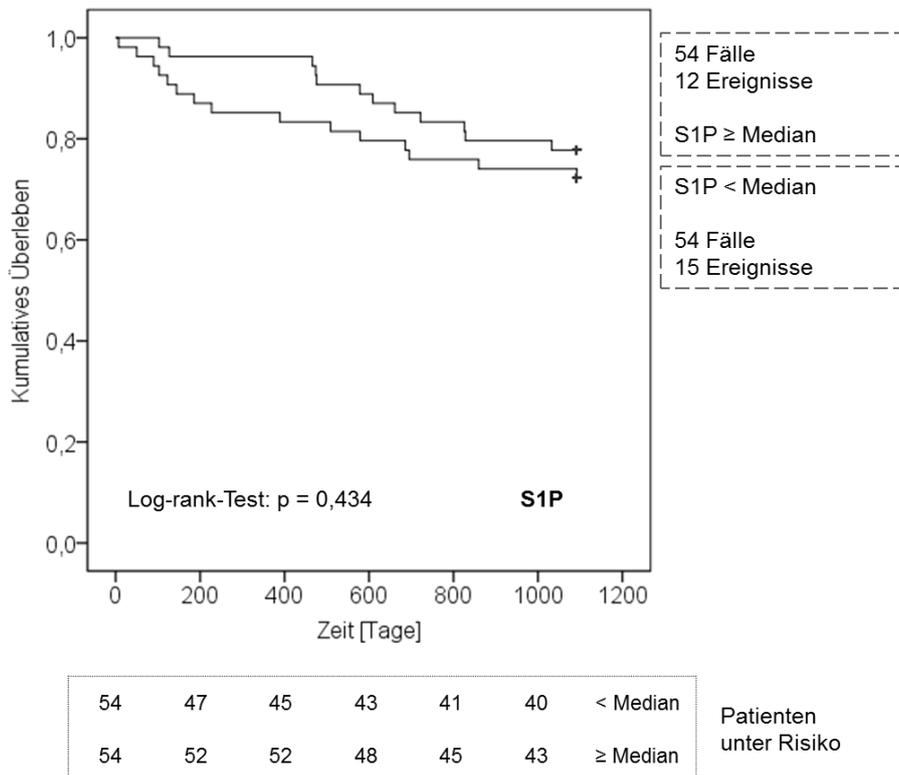


Abb. 62: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse mit der S1P-Konzentration im Plasma von PAH-Patienten. Kumulatives Überleben (0 - 1 entspricht 0 - 100%) auf der Ordinate, Beobachtungszeitraum über 1200 Tage auf Abszisse. Gesamtmortalität als primärer Endpunkt. Bei Eintritt des Endpunktes Sprung der Kurve nach unten, zensierte Patienten (*lost to follow-up*: der Beobachtung ohne Eintritt des Endpunktes verloren gegangen) durch einen senkrechten Strich gekennzeichnet, hier jedoch keine zensierten Patienten innerhalb 3-jährigem Beobachtungszeitraum. Jeweils Überlebenskurve und Anzahl der Patienten unter Risiko für S1P-Konzentration < und ≥ Median ( $0,454 \mu\text{mol/L}$ ). Log-rank-Test als nichtparametrischer Test auf unterschiedliches Risiko der beiden Gruppen für Eintritt des Endpunktes.

## 4 Diskussion

### 4.1 8-iso-PGF<sub>2α</sub>

#### 4.1.1 Nachweis des TP

Die TP-Defizienz konnte auf genomischer Ebene mittels klassischer und auf Transkriptionsebene mittels quantitativer *real-time* PCR nachgewiesen werden. Für eine Genotypisierung der verfügbaren TP-Mäuse reicht die Durchführung einer klassischen PCR aus, wobei die verwendeten Tiere nach Versuchsbeendigung, zum Ausschluss von Tierverwechslungen, nachgenotypisiert wurden. Die TP-Rezeptor-Expressionsanalyse in Geweben wurde mittels quantitativer *real-time* PCR durchgeführt, z. B. nach Injektion des AAV-Vektors in TP-KO-Mäuse (Kap. 4.1.5).

Mittels Western Blot konnte weder die An- noch die Abwesenheit des TP-Proteins im murinen Gewebe detektiert werden. Diese Methode eignet sich bisher nicht zum TP-Nachweis, was an der Unspezifität für den murinen TP der eingesetzten Antikörper liegen könnte, z. B. stellen die Aminosäuren 323-343 des humanen TP das Epitop des verwendeten Antikörpers *Anti-Thromboxane A2 receptor antibody* (ab92883; abcam) dar. Außerdem handelt es sich bei den verwendeten Antikörpern um polyklonale Antikörper. Auch bei Verwendung als Primäntikörper für immunhistochemische Färbungen zeigte sich nach Behandlung mit Sekundäntikörper nicht die gewünschte Differenzierungsmöglichkeit, weder zwischen den beiden Genotypen noch zwischen Lokalisation in unterschiedlichen Zelltypen und -schichten.

Für einen verlässlichen TP-Nachweis liefern nur die standardisierten auf PCR-basierenden Methoden reproduzierbare Ergebnisse. Die auf Proteinebene stattfindenden Nachweise blieben erfolglos und spiegeln die allgemeine Problematik bei Antikörpern gegen GPCRs wider [236]. Um eine minimale Kreuzreaktivität zu erzielen, sollten monoklonale Antikörper gegen spezifische Epitope des murinen TP getestet werden.

#### 4.1.2 Phänotypisierung von TP-KO und WT-Geschwistern

##### 4.1.2.1 Einfluss des Genotypes auf die Produktion von Superoxid in Normoxie und Hypoxie

Inwiefern eine TP-Defizienz den Metabolismus reaktiver Sauerstoffspezies beeinflusst, sollte anhand der Messung der Superoxid-Produktion in verschiedenen Geweben von TP-WT- und

-KO-Mäusen evaluiert werden. In Lungengewebe zeigte sich sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie kein Unterschied in der Superoxid-Produktion hinsichtlich des Genotypes. Allerdings lag bei beiden Genotypen unter hypoxischen Bedingungen eine signifikant reduzierte Superoxid-Bildung vor (Abb. 21). Dieser Abfall steht im Widerspruch zum beobachteten „Superoxid-Burst“ von Hernansanz-Agustín et al. [80]. Dieser „Superoxid-Burst“ stellt einen transienten Anstieg der Superoxid-Produktion als Akutreaktion auf Hypoxie dar. In dieser Arbeit wurde die Superoxid-Produktion allerdings erst nach vierwöchiger Haltung unter hypoxischen Bedingungen erfasst, sodass der beobachtete Abfall eine chronische Reaktion auf Hypoxie darstellt. Auch im linken Ventrikel trat kein Unterschied hinsichtlich des Genotypes auf, außerdem deutete sich, erneut bei beiden Genotypen, ein schwacher Trend zu niedrigerer Superoxid-Produktion unter hypoxischen Bedingungen an (Abb. 22 A). Im rechten Ventrikel zeichnete sich kein erkennbarer Unterschied ab (Abb. 22 B). In Leukozyten wurde, unabhängig von der Sauerstoffversorgung, eine potentiell erhöhte Superoxid-Produktion in TP-KO-Mäusen beobachtet, unter Hypoxie war dieser Effekt stärker ausgeprägt. In TP-WT-Mäusen wiederholte sich dagegen der Trend zu niedrigerer Superoxid-Produktion unter hypoxischen Bedingungen (Abb. 23). Insgesamt wurde die höchste Superoxid-Produktion und daraus folgend das höchste Aufkommen von reaktiven Sauerstoffspezies in hypoxischen TP-KO-Leukozyten nachgewiesen. Einerseits wird damit die in der Literatur beschriebene vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies unter hypoxischen Bedingungen bekräftigt, andererseits die TP-Defizienz als möglicher Nachteil für das Ausmaß des vorherrschenden oxidativen Stresses dargestellt [80] [81] [82] [83].

### **4.1.2.2 Einfluss des Genotypes auf das metabolische Profil von TP-KO und WT-Geschwistern**

Im Plasma von TP-KO-Mäusen lag, verglichen mit WT-Geschwistern, eine erhöhte Gesamtkonzentration an Diacyl-Phosphatidylcholinen und Lyso-Phosphatidylcholinen vor (Abb. 24). Die absoluten Einzelkonzentrationen der untersuchten Diacyl- und Lyso-Phosphatidylcholinen waren ebenfalls erhöht, während die relativen Anteile an der jeweiligen Gesamtkonzentration erniedrigt waren (Tab. 18 + Tab. 19). Diese Änderungen im metabolischen Profil von TP-KO-Mäusen können neben Phospholipasen die Hämostase und den Lipidstoffwechsel modulieren. Bei, in Bezug auf arteriosklerotische Veränderungen, positiver Beeinflussung könnte eine TP-Defizienz protektiv wirken. Sutter et al. fanden in einer Analyse des Lipidprofils 45 bzw. 42 verschiedene Glycerophospholipide und Sphingolipide, die im Plasma von Patienten mit Koronarer Herzkrankheit bzw. von Patienten mit Myokardinfarkt erniedrigt waren [203]. Eine Erhöhung wäre daher wünschenswert und durch eine Blockade des TP denkbar.

### 4.1.3 Effekte von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in TP-KO und WT-Geschwistern

#### 4.1.3.1 *Ex vivo*-Effekte von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> auf die Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur

Insgesamt induzieren die untersuchten endogenen Isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> sowie 8-iso-PGE<sub>2</sub> und Prostaglandine PGF<sub>2α</sub> sowie PGE<sub>2</sub>, analog zum TP-Agonisten U-46619, eine konzentrationsabhängige Vasokonstriktion der thorakalen Aorten und Pulmonalarterien aus TP-WT-Mäusen. In thorakalen Aorten und Pulmonalarterien aus TP-defizienten Mäusen blieb die vasokonstriktorische Wirkung aller Substanzen aus, sodass eine zusätzliche Aktivierung anderer Rezeptoren im Hinblick auf resultierende Vasokonstriktion unwahrscheinlich ist. Daraus resultiert die Abhängigkeit der beobachteten Vasokonstriktion von TP-Rezeptoren. Der damit nachgewiesene TP-vermittelte Mechanismus stellt eine neue Erkenntnis hinsichtlich der vasokonstriktorisches Eigenschaften von Isoprostanen und Prostaglandinen dar.

Hinsichtlich ihrer vasokonstriktorisches Eigenschaften in Aorten aus TP-WT-Mäusen lassen sich die untersuchten TP-Agonisten nach steigender Potenz ordnen (Tab. 32 + Kap. 3.1.3.1.1):

Tab. 32: Rangliste der Prostaglandine PGF<sub>2α</sub> und PGE<sub>2</sub>, Isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub> sowie U-46619 nach Potenz der vasokonstriktorisches Eigenschaften in Aorten aus TP-WT-Mäusen.

---


$$\text{PGE}_2 < \text{PGF}_{2\alpha} < 8\text{-iso-PGF}_{2\alpha} < 8\text{-iso-PGE}_2 < \text{U-46619}$$


---

Zudem können die untersuchten Substanzen hinsichtlich ihrer Potenz in drei Gruppen eingeteilt werden: Die stärkste Potenz wies U-46619 auf, eine mittlere Potenz kennzeichnete 8-iso-PGE<sub>2</sub> und die schwächste Potenz zeigten 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, PGF<sub>2α</sub> und PGE<sub>2</sub>. Beispielsweise zeigte PGE<sub>2</sub> noch keine Wirkung in dem Konzentrationsbereich, in dem U-46619 bereits seine maximale Wirkung erreicht hatte.

Darüber hinaus wies U-46619 die stärkste intrinsische Aktivität hinsichtlich der vasokonstriktorisches Eigenschaften in Aorten aus TP-WT-Mäusen (max. Konstriktion im Konzentrationsbereich 10<sup>-10</sup> bis 10<sup>-4,5</sup> M = 249%) auf und stellt einen Vollagonisten am TP dar. Die Isoprostane 8-iso-PGE<sub>2α</sub> und 8-iso-PGF<sub>2α</sub> könnten im untersuchten Konzentrationsbereich als Partialagonisten eingestuft werden (Abb. 28).

Analog zu den vasokonstriktorischen Eigenschaften in Aorten aus TP-WT-Mäusen lassen sich die untersuchten TP-Agonisten hinsichtlich ihrer vasokonstriktorischen Eigenschaften in Pulmonalarterien aus TP-WT-Mäusen nach steigender Potenz ordnen (Tab. 33 + Kap. 3.1.3.1.2):

Tab. 33: Rangliste des Prostaglandins  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , Isoprostans 8-iso- $\text{PGF}_{2\alpha}$  sowie U-46619 nach Potenz der vasokonstriktorischen Eigenschaften in Pulmonalarterien aus TP-WT-Mäusen.

---

$\text{PGF}_{2\alpha} < 8\text{-iso-PGF}_{2\alpha} < \text{U-46619}$

---

Erneut wies U-46619 die stärkste intrinsische Aktivität hinsichtlich der vasokonstriktorischen Eigenschaften in Pulmonalarterien aus TP-WT-Mäusen (max. Konstriktion im Konzentrationsbereich  $10^{-11}$  bis  $10^{-4,7}$  M = 236%) auf und stellt einen Vollagonisten am TP dar. Das Prostaglandin  $\text{PGF}_{2\alpha}$  könnte im untersuchten Konzentrationsbereich als Partialagonist eingestuft werden (Abb. 29).

Als Zusammenfassung der Konstriktionsmessungen in Aorten und Pulmonalarterien aus TP-WT-Mäusen konnte im Vergleich zu Prostaglandinen eine stärkere Potenz der Isoprostane gezeigt werden. U-46619 ist sowohl im pulmonalen als auch Aorten-Gefäßbett der potenteste TP-Agonist.

Die vorliegenden Untersuchungen zu Konstriktionseigenschaften von Prostaglandinen und Isoprostanen wurden erstmals an murinen Gefäßen durchgeführt. Ferner stellen die vorliegenden Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstmalige Untersuchungen mit dem aus TP-WT- und TP-KO-Mäusen bestehenden TP-Tiermodell dar. Die beobachtete Abhängigkeit von TP-Rezeptoren ist eine aufschlussreiche Erkenntnis über die zugrunde liegende Signaltransduktion der zuvor beschriebenen vasokonstriktorischen Eigenschaften [41] [42] [43]. Wagner et al. konnten aus einer reduzierten Vasokonstriktion bei Anwesenheit des TP-Antagonisten SQ29548 lediglich eine Beteiligung des TP folgern, nicht jedoch die ausschließliche Vermittlung über den TP [41]. Wagner et al. verwendeten Aorten- und Pulmonalarterien-Ringe von Ratten, Kromer et al. Koronararterien-Ringe von Schweinen und Rindern, Cracowski et al. Ringe der humanen *Arteria mammaria interna* [41] [42] [43]. Die genannten Veröffentlichungen beschränken sich auf 8-iso- $\text{PGF}_{2\alpha}$ , sodass mit den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Aorten- und Pulmonalarterien-Ringen von Mäusen nicht nur das Spektrum an Spezies, sondern mit den getesteten Isoprostanen und Prostaglandinen auch an Substanzen erweitert wurde. Wagner et al. konnten aus einer Verminderung der durch 8-iso- $\text{PGF}_{2\alpha}$ -induzierten Vasokonstriktion bei Anwesenheit der COX-Hemmstoffe Indomethacin und Ibuprofen lediglich die zusätzliche Beteiligung anderer aus dem COX-Stoffwechselweg

stammender Mediatoren schließen [41]. Dies weist auf die in Kap. 3.1.3.1 gezeigten vasokonstriktorisches Eigenschaften der Prostaglandine PGF<sub>2α</sub> und PGE<sub>2</sub> hin. Darüber hinaus wurden TP-vermittelte vasokonstriktorisches Eigenschaften von 8-iso-PGE<sub>2</sub> bereits von Fukunaga et al. vermutet [237]. Die ermittelten EC<sub>50</sub>-Werte für 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (Aorta: EC<sub>50</sub> [log M] = -5,5; Pulmonalarterie: EC<sub>50</sub> [log M] = -6,1) sind vergleichbar mit denen von Wagner et al. (Aorta: 0,9 μmol/L; Pulmonalarterie: 7,7 μmol/L) [41]. Allerdings weisen die in dieser Arbeit bestimmten EC<sub>50</sub>-Werte auf eine höhere Potenz von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in der Pulmonalarterie hin, während 8-iso-PGF<sub>2α</sub> bei Wagner et al. einen niedrigeren EC<sub>50</sub>-Wert in der Aorta zeigt [41].

Die gezeigten vasokonstriktorisches Effekte von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> auf murine Pulmonalarterien bestätigen 8-iso-PGF<sub>2α</sub> als potentiellen Mediator zur Erhöhung des Gefäßwiderstandes in der Pulmonalarterie. Welche Auswirkungen dies in der Pathogenese einer Pulmonalen Arteriellen Hypertonie hat, ist noch unklar. Aufschluss darüber könnte ein murines Hypoxie-Modell bringen, insbesondere ob eine TP-Defizienz protektive Eigenschaften impliziert.

#### **4.1.3.2 *In vivo*-Effekte von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in TP-KO und WT-Geschwistern**

##### **4.1.3.2.1 Einfluss von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> auf die Konstriktion von Arteriolen im Musculus cremaster**

Nachdem die Isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub>, Prostaglandine PGF<sub>2α</sub> und PGE<sub>2</sub> sowie U-46619 sich bei Untersuchungen am Myographen durch TP-vermittelte Vasokonstriktion auszeichneten, sollte diese Eigenschaft auch *in vivo* überprüft werden. Im *M. cremaster* von TP-WT-Mäusen wird die durch 8-iso-PGF<sub>2α</sub> getriggerte, auf kurzzeitige Vasodilatation folgende, Vasokonstriktion der Arteriolen durch Aktivierung des TP vermittelt, da dieser Verlauf bei TP-KO-Mäusen ausbleibt (Abb. 30 A). Genauso wird die durch PGF<sub>2α</sub> induzierte Vasodilatation der Arteriolen in TP-WT-Mäusen über einen TP-abhängigen Signalweg hervorgerufen (Abb. 30 B). Die Zugabe von 8-iso-PGE<sub>2</sub> wiederum führt zu einer zumindest transienten, TP-abhängigen Vasokonstriktion (Abb. 30 C). Die nachgewiesene *in vivo*-Vasoaktivität von U-46619 stellt die stärkste Vasokonstriktion im zugrunde liegenden Versuch dar und wird über den TP vermittelt (Abb. 30 E).

Die Vasoaktivität der vorliegenden Substanzen wurde mit Arteriolen des *M. cremaster* erstmals an Arteriolen der quergestreiften Skelettmuskulatur getestet. Dabei wurden die Substanzen in Salzlösung als Superperfusat direkt auf das *Cremaster*-Präparat geleitet (Kap. 2.3.3). Anhand dieses *in vivo*-Versuches konnte jedoch nur bei 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, 8-iso-PGE<sub>2</sub> und U-46619 eine TP-vermittelte Vasokonstriktion beobachtet werden.

Insgesamt spiegeln sich die *ex vivo* nachgewiesenen vasokonstriktorisches Eigenschaften von 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, 8-iso-PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGE<sub>2</sub> und U-46619 nur teilweise *in vivo* wider. Der synthetische TP-Agonist U-46619 erweist sich konsequent als stärkster Vasokonstriktor. Vor allem die vasokonstriktorisches Eigenschaften der Prostaglandine bleiben jedoch *in vivo* aus. Die Übertragung der *ex vivo* erhobenen Erkenntnisse auf das *in vivo*-Verhalten ist demnach nur eingeschränkt möglich. Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse ist in Tab. 34 dargestellt.

Tab. 34: Zusammenfassung der nachgewiesenen TP-vermittelten vasokonstriktorisches Eigenschaften von 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, 8-iso-PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGE<sub>2</sub> und U-46619. Jeweils *ex vivo* am Myographen mit murinen Aorten und Pulmonalarterien sowie *in vivo* mittels Intravitalmikroskopie von Arteriolen im Musculus cremaster. ✓ vasokonstriktorisches Eigenschaften nachgewiesen; (✓) vasokonstriktorisches Eigenschaften eingeschränkt nachgewiesen; ✗ vasokonstriktorisches Eigenschaften nicht nachgewiesen.

Substanz	<i>ex vivo</i>	<i>in vivo</i>
8-iso-PGF <sub>2α</sub>	✓	✓
8-iso-PGE <sub>2</sub>	✓	(✓)
PGF <sub>2α</sub>	✓	✗
PGE <sub>2</sub>	✓	✗
U-46619	✓	✓

Ursächlich für die beobachteten Unterschiede könnten die unterschiedlichen untersuchten Gefäßbetten sein: *ex vivo* Aorten und Pulmonalarterien, *in vivo* Arteriolen des *M. cremaster*. Aorta und Pulmonalarterie sind herznahe Arterien vom elastischen Typ, deren *Tunica media* sich neben glatten Gefäßmuskelzellen hauptsächlich aus elastischen Fasern zusammensetzt. Arteriolen dagegen sind die kleinsten herzfernen Arterien vom muskulären Typ und bilden den Übergang zwischen Arterien und Kapillaren. Die *Tunica media* in Arteriolen besteht lediglich aus einer dünnen Schicht glatter Gefäßmuskelzellen. Die beschriebenen histologischen Unterschiede können das unterschiedliche Ansprechen auf die untersuchten TP-Agonisten bedingen. Weiterhin sind die Arteriolen im *M. cremaster in vivo* von quergestreiftem Skelettmuskelgewebe umgeben, wodurch sich für die Substanzen möglicherweise ein längerer Diffusionsweg ergibt als bei von Fettgewebe freipräparierten Aorten und Pulmonalarterien *ex vivo*. Außerdem könnte es beim *Cremaster*-Modell aufgrund ungleichmäßiger Verteilung auf dem Präparat eher zu Konzentrationsschwankungen kommen

als bei Zugabe der Substanzen in die Badlösung während der Untersuchungen am Myographen.

#### 4.1.3.2.2 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration und -Metabolismus

Zuerst wurde eine Unabhängigkeit der basalen 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration vom TP-Genotyp gezeigt. Die exogene Zufuhr von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> via Minipumpen mit einer Abgaberate von 1 µg/kg KG/h ergab im Vergleich mit der Kontrollgruppe keine Erhöhung der Ausscheidung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> im 24-Stunden-Sammelurin. Mit der gesteigerten Abgaberate von 5 µg/kg KG/h konnte eine signifikant erhöhte Ausscheidung und somit eine erhöhte endogene 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe erreicht werden. Jedoch befanden sich die erzielten 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentrationen dieser Gruppe teilweise im gleichen Bereich der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentrationen, die auch in der Kontrollgruppe gemessen wurden, sodass die Spannweiten beider Gruppen deutlich überlappten. Außerdem ergab sich aus den einzelnen 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentrationen der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Gruppe mit einer Abgaberate von 5 µg/kg KG/h eine hohe absolute Standardabweichung (2200±295 pg/mg Kreatinin; Abb. 32 D), was einem Variationskoeffizienten von 13% entspricht. Beim Vergleich beider 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Gruppen untereinander zeigte sich bei einer Abgaberate von 5 µg/kg KG/h im Vergleich zu 1 µg/kg KG/h eine signifikante Erhöhung in der renalen 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Ausscheidung.

Um zu untersuchen, ob diese Beobachtungen mit einem möglicherweise durch die zusätzliche exogene Applikation von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> induzierten, verstärkten Metabolismus zusammenhängen, sollte die 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Ausscheidung unter gehemmter peroxisomaler β-Oxidation bestimmt werden. Als Hemmstoff der peroxisomalen β-Oxidation diente Thioridazin. Nach Thioridazin-Injektion in Woche 4 zeigte sich eine deutlich gesteigerte 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Ausscheidung im Vergleich zur zweiten Woche.

Durch Thioridazin wird der Hauptabbauweg im Metabolismus von 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, die peroxisomale β-Oxidation, gehemmt und somit in Woche 4 ein erhöhter Anteil an unmetabolisiertem 8-iso-PGF<sub>2α</sub> renal ausgeschieden [238] [239]. Eine vergleichbare Beobachtung wurde bei Kindern mit Zellweger-Syndrom gemacht: Durch fehlende Peroxisomen kann keine peroxisomale β-Oxidation stattfinden, was zu einer erhöhten Konzentration an unmetabolisiertem 8-iso-PGF<sub>2α</sub> im Urin führt [219].

Der beobachtete Anstieg in Woche 4 bestätigt somit, dass eine erhöhte 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Ausscheidung bei gehemmtem Metabolismus theoretisch möglich ist, folglich also durch die exogene 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Zufuhr ein verstärkter Metabolismus ausgelöst wird, wodurch die renale Ausscheidung von unmetabolisiertem 8-iso-PGF<sub>2α</sub> schließlich abnimmt. Wäre die 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-

Ausscheidung unter Hemmung des Metabolismus nicht angestiegen, wäre ein verstärkter Metabolismus nicht der Grund für die relativ niedrige 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Ausscheidung unter normalen Versuchsbedingungen. Würde kein verstärkter Metabolismus vorliegen, könnten ähnliche Absolutwerte wie in Woche 4 gemessen werden. Eine weitere Erhöhung der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration, bspw. mit einer resultierenden Abgaberate von 10 µg/kg KG/h ist aufgrund des Löslichkeitsproduktes auch nicht möglich. Die 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Applikation über osmotische Minipumpen erscheint daher insgesamt nicht sinnvoll.

### **4.1.3.2.3 Einfluss des Genotyps und von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> auf die Regulation des systolischen Blutdruckes in TP-KO und WT-Geschwistern**

In Woche 0 zeigt sich ein Trend zu niedrigeren Blutdruckwerten in TP-KO-Mäusen (110±9 vs. 127±7 mmHg; p=n.s.). Dies deckt sich mit der von Thomas et al., ebenfalls *Tail-cuff*-basierten, beobachteten Tendenz von 114 mmHg vs. 121 mmHg [49]. Bei Xiao et al. zeigte sich lediglich eine Differenz von 3 mmHg (101 mmHg vs. 104 mmHg) [240]. In Woche 4 liegt in TP-KO-Mäusen ein signifikant niedrigeres Blutdruckniveau als in deren WT-Geschwistern vor (103±14 vs. 132±6 mmHg; p<0,05), somit wird die Regulation des systolischen Blutdruckes in Mäusen durch TP-Rezeptoren beeinflusst. Der beobachtete Phänotyp der TP-KO-Mäuse wird erst ab Woche 2 sichtbar, was an der Adaption der Mäuse gegenüber der *Tail-cuff*-Methode und der damit verbundenen reproduzierbaren Blutdruckwerten liegen könnte. Da in dieser Arbeit pro Genotyp jeweils Tiere aus der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>- und Vehikel-Gruppe zusammengefasst wurden, kann ein zusätzlicher Einfluss durch 8-iso-PGF<sub>2α</sub> oder 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in Kombination mit dem Genotyp nicht ausgeschlossen werden. Zur endgültigen Abklärung wäre eine telemetrische Blutdruckmessung über einen längeren Zeitraum (ca. 4 Wochen) und mit größerer n-Zahl sinnvoll.

Die Hypothese, dass es aufgrund einer erhöhten 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration im Organismus zu einer chronischen Blutdrucksteigerung kommen kann, konnte unter den beschriebenen Versuchsbedingungen nicht bestätigt werden. Grund dafür könnte eine durch osmotische Minipumpen nicht erreichbare kontinuierliche Erhöhung der zirkulierenden 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration sein (vgl. Kap. 3.1.4.2.2). Die von Audoly et al. berichtete Blutdruckerhöhung beruht dagegen auf einer, der *Tail-cuff*-Methode überlegenen, katheterbasierten Messung des MAP in der *Arteria carotis* während einer simultanen venösen 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Injektion mithilfe eines zweiten Katheters in die *Vena jugularis* und stellt einen Akuteffekt dar [23]. In TP-KO-Mäusen blieb der Blutdruck unverändert auf Ausgangsniveau, wodurch die Regulation über den TP bewiesen wurde [23]. Als Alternative könnte der TP-Agonist U-46619 für zukünftige Versuche eingesetzt werden.

#### 4.1.4 Generierung von TP-WT- und TP-MUT-transgenen Mäusen

Weder die Wildtyp-Variante noch die mutierte Variante des humanen TP konnten auf Transkriptions-Ebene mittels quantitativer *real-time*-PCR oder auf Protein-Ebene mittels Western Blot nachgewiesen werden. Demzufolge blieb die geplante Generierung der transgenen Mausmodelle erfolglos. Ursächlich dafür könnte die bei Pronukleusinjektion ungerichtete, zufällige genomische Integration der Transgen-DNA, vielleicht in stille DNA-Abschnitte, sein. Außerdem bleibt die Anzahl der Transgenkopien unklar. Transkription und Translation könnten zudem durch mögliche DNA-Methylierung und -Acetylierung inhibiert werden.

#### 4.1.5 Zielgerichtete Überexpression des murinen TP in pulmonalen Endothelzellen

Durch Injektion des AAV-Vektors AAV2-L1-CMV-LUC-2A-mTBXA2R kommt es zu einer zielgerichteten Überexpression des murinen TP in pulmonalen Endothelzellen von TP-KO-Mäusen. Der AAV-Serotyp 2 (AAV2) weist einen natürlichen Tropismus u. a. für Gefäßmuskelzellen auf [241]. Mittels *in vivo*-Screening einer sog. Peptid-*library* für spezifische Peptide der AAV-Kapsidoberfläche wurde das Heptapeptid (L1) zur zielgerichteten Expression in pulmonalen Endothelzellen ausgewählt, in den AAV2-Vektor inseriert und 60x auf der Kapsidoberfläche präsentiert, wodurch der Tropismus des AAV2-Vektors modifiziert wurde [234]. Die Spezifität für pulmonale Endothelzellen konnte auf der einen Seite durch die Aktivität des Luciferase-Reportergens nachgewiesen werden, hier war die niedrigste Virusmenge von  $5 \times 10^{10}$  vg/Maus ausreichend, und auf der anderen Seite durch die gezeigte TP-Expression. Hier stehen weitere Untersuchungen zur optimalen Dosisfindung des AAV-Vektors an, da bisher keine Titrationsreihe reproduziert werden konnte, was an der Injektionstechnik und individuellen Integration liegen könnte. Eine Expression in anderen Organen konnte mithilfe beider Nachweismöglichkeiten ausgeschlossen werden, auch im Endothel der Pulmonalarterie, was im Hinblick auf ein murines PAH-Modell interessant gewesen wäre. Nichtsdestotrotz stellt der etablierte Vektor eine neue vielversprechende Alternative zur Generierung transgener Mäuse dar.

## 4.1.6 8-iso-PGF<sub>2α</sub> im Akuten Koronarsyndrom

### 4.1.6.1 Diagnostische Bedeutung

Oxidativer Stress stellt einen entscheidenden Triggerfaktor für die Entstehung von Arteriosklerose dar. 8-iso-PGF<sub>2α</sub> stellt einen Marker für oxidativen Stress und gleichzeitig für arteriosklerotische Erkrankungen und Akutes Koronarsyndrom dar (Kap. 1.1.5 + Kap. 3.1.7). Insbesondere diejenigen Patienten, die eine erhöhte Isoprostanbildung und -ausscheidung aufweisen, könnten von einem alternativem therapeutischen Konzept profitieren: der Blockade des TP. Im Urin von Teilnehmern der ACS-Studie nimmt die 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration bei Aufnahme mit steigendem Schweregrad der arteriosklerotischen Erkrankung zu. Bei akut vorliegendem Myokardinfarkt ohne und mit ST-Streckenhebung wurde mit der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration bei Aufnahme ein diagnostischer Biomarker gefunden, mit dem Patienten mit Myokardinfarkt von Gesunden und Patienten mit asymptomatischer Koronarer Herzkrankheit, aber auch von Patienten mit instabiler Angina pectoris, abgegrenzt werden können. Weiterhin weisen Patienten bei einem Myokardinfarkt mit ST-Streckenhebung nochmals höhere 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentrationen auf als bei einem Myokardinfarkt ohne ST-Streckenhebung, sodass anhand der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration eine Differenzierung zwischen beiden Myokardinfarkt-Typen möglich ist. Eine mögliche Bedeutung als diagnostischer Marker für das Vorliegen einer Koronaren Herzkrankheit oder einer instabilen Angina pectoris konnte nicht nachgewiesen werden, da die Spannweite der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration der Kontrollgruppe die der Koronaren Herzkrankheit fast vollständig einschließt. Zwar ist ein schwacher Trend zu höheren Konzentrationen in der Patientengruppe mit instabiler Angina pectoris erkennbar, jedoch stellt die 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration kein Unterscheidungskriterium zwischen Patienten mit instabiler Angina pectoris bzw. Patienten mit Koronarer Herzkrankheit und Gesunden ohne arteriosklerotische Veränderungen dar. Die 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration korreliert negativ mit der Serumkreatinin-Konzentration ( $\rho = -0,199$ ), d.h. die 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration im Urin nahm mit steigender Serumkreatinin-Konzentration, was eine verschlechterte Nierenfunktion widerspiegelt, ab.

Zusammengefasst stellt 8-iso-PGF<sub>2α</sub> einen geeigneten Marker für das Vorliegen eines Myokardinfarktes dar: Mit der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration bei Aufnahme steht ein potentieller diagnostischer Marker des akuten Myokardinfarktes zur Verfügung. Im Vergleich zu den gängigen Herzinfarkt-Markern CK-MB (*creatine kinase muscle brain type*) und kardialem Troponin T, die nach 3 - 8 Stunden post-Infarkt im Blut nachgewiesen werden können, scheint 8-iso-PGF<sub>2α</sub> tendenziell früher anzusteigen, da die Urinproben der Myokardinfarkt-Gruppen hauptsächlich von Patienten mit Myokardinfarkt stammen, die mit akuten Symptomen in die Klinik eingeliefert wurden, dies im Optimalfall weniger als 3 Stunden post-Infarkt [242]. 8-iso-

PGF<sub>2α</sub> könnte somit neben Veränderungen im Elektrokardiogramm und Myoglobin, welches bereits 1 Stunde post-Infarkt ansteigt, eine Rolle in der Frühdiagnostik spielen [242]. Je nachdem, wie lange die erhöhten Konzentrationen persistieren, könnte 8-iso-PGF<sub>2α</sub> auch als Biomarker mit retrospektiver Aussagekraft bezüglich zurückliegender Ereignisse dienen. Dagegen spricht die 24 Stunden nach Eingriff beobachtete Rückkehr zum Ausgangsniveau von Delanty et al. sowie Reilly et al. [69] [70]. Zur weiterführenden Klärung sind kinetische Untersuchungen, d.h. wie lange die Erhöhung der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration andauert, notwendig. Eine länger anhaltende Erhöhung würde andererseits die Detektion zeitnaher Reinfarkte limitieren. Als potentieller Biomarker zur Frühdiagnostik wäre 8-iso-PGF<sub>2α</sub> Troponin T durch den früheren Anstieg im Urin überlegen, eine Urinsammlung im Ablauf der Notaufnahme ist einer routinemäßigen Blutentnahme wiederum unterlegen. Die Differenzierung zwischen NSTEMI- und STEMI-Myokardinfarkt anhand der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration bei Aufnahme beruht, analog zu CK-MB und Troponin T, auf niedrigeren Werten in der NSTEMI- als in der STEMI-Myokardinfarkt-Gruppe [243].

Die vorliegenden Ergebnisse aus der ACS-Studie unterstützen die Erkenntnis aus einer Studie von Delanty et al. über höhere 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentrationen im Urin von Patienten mit Myokardinfarkt [69]. Die bereits bei Aufnahme gezeigte Erhöhung der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration beim Akuten Koronarsyndrom steht im Widerspruch zum im Tiermodell und in Patienten erst nach Reperfusion beobachteten Anstieg der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration [69] [70]. Übertragen auf die ACS-Studie, würde demnach ein Anstieg erst nach Intervention auftreten. Delanty et al. untersuchte Urinproben von Patienten mit Bypass-Operation, was im Gegensatz zur Herzkatheteruntersuchung ± Ballondilatation eine mögliche Diskrepanz durch unterschiedliche Interventionen erklären könnte, Reilly et al. hingegen analysierte Urinproben von Patienten mit diagnostischer Koronarangiographie, elektiver PTCA (Perkutane Transluminale Koronarangioplastie) sowie PTCA bei akutem Myokardinfarkt [69] [70]. Ersteres entspricht der Intervention der ACS-Studie bei Patienten mit Koronarer Herzkrankheit, letzteres der durchgeführten Herzkatheteruntersuchung ± Ballondilatation bei Patienten mit akutem NSTEMI- oder STEMI-Myokardinfarkt. Bei folglich vergleichbaren Interventionen wäre ein Anstieg der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration in der ACS-Studie erst nach Intervention zu erwarten gewesen, dieser tritt jedoch schon vor Intervention bei Aufnahme in die Klinik auf.

Zur Klärung der Bedeutung der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration im chronischen Stadium der Koronaren Herzkrankheit und im akuten Geschehen einer instabilen Angina pectoris im Zusammenhang mit akuten Myokardinfarkten sind weitere Untersuchungen in einer größer angelegten Studie notwendig. Die von Schwedhelm et al. bzw. Wolfram et al. beobachteten erhöhten 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentrationen im Urin von Patienten mit Koronarer Herzkrankheit beruhen auf Fall-Kontroll-Studien mit jeweils 93 bzw. 20 Patienten mit Koronarer Herzkrankheit

und gesunden Kontrollprobanden, sodass die zugrunde liegende ACS-Studie bezüglich der Fallzahlen eine Zwischenstellung einnimmt [8] [64]. Des Weiteren zeigten die Metabolite 2,3-Dinor-8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> im Urin Gesunder und von Patienten mit KHK höhere Konzentrationen und größere Unterschiede als 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, sodass durch die Messung der Metabolite unter pathologischen Bedingungen möglicherweise eine bessere diagnostische Aussage getroffen werden könnte [11].

#### **4.1.6.2 Prognostische Bedeutung**

Die 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentrationen im Urin bei Aufnahme weisen zwar eine diagnostische, jedoch keine prognostische Aussagekraft hinsichtlich Eintritt des kombinierten Endpunktes „Myokardinfarkt, Schlaganfall oder Tod“ innerhalb 1200 Tagen auf. Zwar zeigt sich in der Kaplan-Meier-Überlebensanalyse mit der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration bei Aufnahme ein im Trend erhöhtes Risiko für Myokardinfarkt, Schlaganfall oder Tod, je größer die 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration der untersuchten Patienten ist, dennoch liegt keine Signifikanz vor.

Im Vergleich zu den herkömmlichen Herzinfarkt-Markern CK-MB, Troponin T und Myoglobin, die sich neben ihrer diagnostischen Bedeutsamkeit außerdem durch prognostische Eigenschaften hinsichtlich Reinfarkt-Risiko und Tod auszeichnen, stellt 8-iso-PGF<sub>2α</sub> einen äquivalenten Biomarker in der Diagnostik dar [244] [245] [246] [247]. Allerdings stellt die aufwendige Probenaufbereitung und zeitintensive GC-MS/MS-Analytik zur 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Bestimmung einen erheblichen Nachteil gegenüber den erhältlichen Schnelltests von CK-MB, Troponin T und Myoglobin dar.

## **4.2 S1P**

### **4.2.1 Optimierung der LC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von S1P**

Zur Bestimmung der S1P-Konzentration in biologischen Proben wurde eine LC-MS/MS-Methode etabliert (Kap. 2.1.2 + Kap. 3.3.1). Als interner Standard wurde C17-S1P bzw. S1P-*d*<sub>7</sub> verwendet. C17-S1P weist mit 2,8 min eine kürzere t<sub>R</sub> als S1P mit 3,0 min auf. Ursächlich dafür ist das im Vergleich zu S1P (C18:1) um eine Methylengruppe (CH<sub>2</sub>) verkürzte Aminoalkoholgrundgerüst des C17-S1P (C17:1), daher auch die Bezeichnung als C17-S1P (Differenz von 14 Masseneinheiten zwischen Molekülpeak von C17-S1P bei m/z = 366 und Molekülpeak von S1P bei m/z = 380 spiegelt Masse der Methylengruppe wider). Die verkürzte Kohlenwasserstoffkette bedingt eine Reduktion der Lipophilie und der unpolaren

Eigenschaften des C17-S1P, sodass dieser Analyt schwächer als S1P an die unpolare *reversed-phase*-Chromatographiesäule adsorbiert wird und bereits bei einer weniger unpolaren Zusammensetzung des Fließmittelgradienten als S1P von der Säule eluiert wird.

S1P- $d_7$  weist mit 3,0 min. die gleiche  $t_R$  wie S1P auf. Ursächlich dafür sind die im Vergleich zu S1P unveränderten physikochemischen Eigenschaften des deuterierten S1P- $d_7$ : Durch gleiche Lipophilie und unpolare Eigenschaften von S1P- $d_7$  ergeben sich keine Unterschiede im Adsorptions- und Elutionsverhalten während der Flüssigkeitschromatographie, sodass beide Analyten simultan ins Massenspektrometer gelangen.

Es gibt Hinweise, dass das aufgrund der ungeraden Kettenlänge für unphysiologisch gehaltene C17-S1P dennoch endogen vorkommt und die definierte exogene Zugabe von C17-S1P als internem Standard verfälschen kann [248]. Des Weiteren wird die Existenz einer hinsichtlich des Massenüberganges nicht von C17-S1P unterscheidbaren, interferierenden Substanz vermutet [248]. Aufgrund des endogenen Vorkommens sowie möglichem unspezifischen Massenübergang wurde C17-S1P als interner Standard zur Quantifizierung von S1P durch S1P- $d_7$  als neuem internen Standard ohne endogenes Vorkommen sowie mit spezifischem Massenübergang ersetzt (Kap. 3.3.1.2).

Aus einer Intra-Assay-Validierung resultierte eine ausreichende Wiederfindung ab einer mittels Additionsmethode hinzugefügten S1P-Konzentration von 1  $\mu\text{mol/L}$  (96%), sodass insgesamt bei Spannweiten der S1P-Konzentrationen von 0,794 - 1,092  $\mu\text{mol/L}$  im Serum Gesunder ( $n=10$ ) von einer ausreichenden Wiederfindungsrate ausgegangen werden kann. Eine mittlere Präzision von 4,8% spricht für eine hohe Präzision der etablierten Messmethode. Die mittlere Wiederfindungsrate von 70% ist deutlich zu niedrig, zeigt sich aber insbesondere bei den Konzentrationen  $<1 \mu\text{mol/L}$ . Ein möglicher Grund hierfür könnte die Adsorption der kleinen Stoffmengen an Oberflächen sein, was aber durch die Silikonisierung aller Reaktionsgefäße (Kap. 2.1.2.1) ausgeschlossen werden kann. Dass die Bindungsstellen der Proteine im FCS bei niedrigen Konzentrationen nicht gesättigt sind und somit kein freies messbares S1P vorliegt, könnte einen weiteren Grund darstellen. Dagegen spricht jedoch die S1P-Messbarkeit in den FCS-Kalibratoren mit 0, 0,1 und 0,3  $\mu\text{M}$  der S1P-Standardsubstanz (Kap. 2.1.2.3 + Kap. 2.1.2.7). Möglicherweise werden die Proteine des verwendeten Serums, v. a. HDL und Albumin, durch das zugebene FCS mit S1P beladen, was zu einer Umverteilung und Reduktion des freien S1P-Anteiles führen könnte. Sattler et al. nutzen einen ähnlichen Effekt bewusst für experimentelle Ansätze aus, indem isoliertes HDL durch Erythrozyten mit S1P beladen wird. Dabei werden Erythrozyten mit Sphingosin vorinkubiert, welches in den Erythrozyten durch SphK-Aktivität zu S1P phosphoryliert wird [106] [198]. Hinsichtlich der Reproduzierbarkeit an unterschiedlichen Tagen ergab eine Inter-Assay-Validierung mit 8,6%

ein erneut zufriedenstellendes Präzisionsmaß. Weiterhin spiegelt der mittlere Bias von -5,6% die Tendenz der Intra-Assay-Validierung wider.

Weiteren Aufschluss über die Richtigkeit der Methode würde die Vermessung einer standardisierten Referenzsubstanz, bspw. eines USP-Referenzstandards (*United States Pharmacopeia*) geben, ein derartiger S1P-Standard ist bisher jedoch noch nicht erhältlich. In der Literatur beschriebene Methoden basieren bisher auf der Verwendung von C17-S1P [185] [249].

#### 4.2.2 Einflüsse auf die S1P-Konzentration

Die S1P-Konzentration ist von der Blutmatrix abhängig und weist unterschiedliche Konzentrationsbereiche in Serum und Plasma auf. Im Serum gesunder Kontrollprobanden treten im Vergleich zu Plasmaproben signifikant erhöhte S1P-Konzentrationen auf (Kap. 3.3.1.3). Von den unterschiedlich gewonnenen Plasmen weist Citrat-Plasma die niedrigsten S1P-Konzentrationen auf (Kap. 3.3.1.3). Aufgrund dieser Beobachtungen entfällt die Vergleichbarkeit von S1P-Konzentrationen unterschiedlicher Matrices. Sinnvoll sind lediglich Vergleiche von S1P-Konzentrationen in der gleichen Blutmatrix.

Die durchschnittlichen S1P-Konzentrationen im Serum von  $0,943 \pm 0,076 \mu\text{mol/L}$  und im EDTA-Plasma von  $0,519 \pm 0,057 \mu\text{mol/L}$  fallen höher aus als bereits publizierte mit durchschnittlichen Serum-Konzentrationen von  $0,484 \pm 0,082 \mu\text{mol/L}$  bzw.  $0,663 \pm 0,117 \mu\text{mol/L}$  und durchschnittlichen Plasma-Konzentrationen von  $0,191 \pm 0,079 \mu\text{mol/L}$  bzw.  $0,350 \mu\text{mol/L}$  (Spannweite:  $0,217 - 0,708 \mu\text{mol/L}$ ) [96] [97] [98] [99]. Die Diskrepanz kann durch unterschiedliche Probenaufbereitung und LC-MS/MS-Methoden erklärt werden. Der Quotient aus Serum- und Plasma-Konzentration im relativen Vergleich bleibt mit 1,8 - 2,5 konstant, d.h. dass im Serum etwa die doppelte S1P-Konzentration als im Plasma vorliegt. Damit bestätigen die vorliegenden Ergebnisse, dass die erhöhten S1P-Konzentrationen im Serum mit der eintretenden bzw. ausbleibenden Blutgerinnung bei Serum- bzw. Plasmagewinnung assoziiert sein müssen. Die Differenz zwischen Serum- und Plasma-S1P-Konzentration beruht auf dem S1P-Gehalt der Thrombozyten, welcher während der Thrombozytenaggregation ins Serum übergeht. Dieser Anteil fehlt im Plasma, da hier die Thrombozyten weiterhin inaktiviert und intakt vorliegen.

S1P selbst weist in biologischen Proben eine hohe Stabilität auf, da im Verlauf der Lagerung keine Anzeichen einer Degradation zu erkennen sind. Im Gegenteil, S1P wird bei Lagerung vermehrt ins Blutplasma freigesetzt (Kap. 3.3.1.4).

Die S1P-Konzentration im EDTA-, Heparin- und Citrat-Plasma ist von der Lagerungsdauer und -temperatur abhängig. Allein die S1P-Konzentration im Serum ist beständig gegenüber

Lagerung bei Raumtemperatur und 4 °C (Kap. 3.3.1.4). Die Ergebnisse veranschaulichen, dass für quantitative Untersuchungen der S1P-Konzentration bevorzugt Serum-Proben herangezogen werden sollten, da diese am wenigsten durch unterschiedliche Lagerungsbedingungen im Klinikalltag oder in Studienzentren verfälscht werden können. Bei dennoch unvermeidbarer Verwendung von Plasma-Proben sollte unbedingt ein besonderes Augenmerk auf unverzügliche Probenaufbereitung gerichtet werden. Vor allem durch Lagerung bei Raumtemperatur aber auch bereits nach 24-stündiger Lagerung im Kühlschrank treten signifikante Veränderungen gegenüber der sofortigen Probenprozessierung auf. Der beobachtete Anstieg der S1P-Konzentration kann durch im Verlauf der Lagerung stattfindende Aktivierung von Thrombozyten verursacht werden und dadurch zur Annäherung an Serum-Level führen.

### 4.2.3 S1P in Gesunden

Die Voraussetzung einer Geschlechts- und Altersunabhängigkeit zur Etablierung eines Biomarkers ist für S1P erfüllt (Kap. 3.3.2.1). Folglich kann ausgeschlossen werden, dass veränderte S1P-Konzentrationen in Patienten mit verschiedenen Erkrankungen, z. B. Gefäßerkrankungen (Kap. 3.3.2.2), Akutem Koronarsyndrom (Kap. 3.3.2.3) oder Pulmonaler Hypertonie (Kap. 3.3.2.4), im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe auf eventuelle Unterschiede in der Geschlechts- oder Altersverteilung zurückzuführen sind.

Die mittlere S1P-Konzentration im Serum Gesunder von  $1,16 \pm 0,26 \mu\text{mol/L}$  konnte erstmalig in einer ausreichenden Gruppengröße von 214 gesunden Kontrollprobanden beschrieben werden [235]. In einer weiteren unabhängigen Kohorte aus 174 Gesunden betrug die mittlere S1P-Konzentration  $0,88 \pm 0,21 \mu\text{mol/L}$  (Kap. 3.3.2.2.1). Zuvor basierten die publizierten Referenzwerte lediglich auf Kontrollgruppen bestehend aus 8 bzw. 11 gesunden Probanden [96] [97] [98]. Die Repräsentativität der 214 bzw. 174 Gesunden wird jedoch durch die Tatsache eingeschränkt, dass es sich hierbei um freiwillige Blutspender handelt. Die Auswertung der S1P-Serum-Konzentrationen einer populationsbasierten Studie mit 4196 Teilnehmern (SHIP-Trend-Studie (*Study of Health in Pomerania*) der Universität Greifswald) steht als Weiterführung der vorliegenden Arbeit noch aus [250]. Die in dieser Arbeit ermittelten durchschnittlichen Referenzwerte für S1P liegen deutlich über denen von Igarashi et al. und Yatomi et al. bzw. Deutschman et al. beschriebenen, was durch unterschiedliche Probenaufbereitung und LC-MS/MS-Methoden erklärt werden könnte (Tab. 35). Außerdem wird die durchschnittliche S1P-Konzentration einer gesunden Bevölkerung vielmehr durch eine Gruppengröße von 214 bzw. 174 als 8 bzw. 11 gesunden Kontrollprobanden abgebildet, wohingegen die in Kap. 3.3.1.3 dargestellte Analyse der S1P-Konzentration im Serum 10 gesunder Probanden mit  $0,94 \pm 0,08 \mu\text{mol/L}$  dicht an den mittleren Referenzwerten

1,16±0,26 µmol/L bzw. 0,88±0,21 µmol/L der Analysen im Serum der 214 bzw. 174 gesunden Probanden liegt. Dies, obwohl beide Analysen mithilfe unterschiedlicher Methoden durchgeführt wurden: erstere mit S1P-*d*<sub>7</sub> als internem Standard und die beiden letzteren mit C17-S1P. Demzufolge könnte die mittlere S1P-Serumkonzentration im Bereich von 1 µmol/L (Mittelwert auf 0,94, 1,16 und 0,88 µmol/L) liegen.

Tab. 35: Vergleich von S1P-Referenzwerten unterschiedlicher Studien. S1P-Referenzwerte jeweils als MW ± SD, angegeben in µmol/L, mit entsprechender n-Zahl sowie entsprechendem Autor und Literaturverweis bzw. entsprechender Kapitelangabe des Ergebnisteiles der vorliegenden Arbeit.

Studie	S1P-Referenzwert	Anzahl Gesunder
Igarashi et al. 1997 [97] Yatomi et al. 1997 [96]	0,48±0,08 µmol/L	8
Deutschman et al. 2003 [98]	0,66±0,12 µmol/L	11
Winkler et al. 2015 [235] Kap. 3.3.2.1	1,16±0,26 µmol/L	214
Kap. 3.3.2.2.1	0,88±0,21 µmol/L	174
Kap. 3.3.1.3	0,94±0,08 µmol/L	10

Die Bestimmung eines S1P-Referenzintervalles in Gesunden hat den Vorteil, dass zukünftige Studien in Patientenkohorten auf diesen Bereich bezogen und in Relation gesetzt werden können. Nichtsdestotrotz empfiehlt sich zusätzlich für andere Analytik-Labore die gleichzeitige Messung einer Kontrollgruppe, da unterschiedliche Probenaufbereitung und LC-MS/MS-Methoden Schwankungen im Messbereich verursachen können. In unserem Labor wird die Vergleichbarkeit neuer mit vorhergehenden Studien durch die beschriebene Validierung und definierte Qualitätskontrollen gewährleistet (Kap. 3.3.1.2.1 + Kap. 3.3.1.2.2, Kap. 2.1.2.4).

#### 4.2.4 S1P in Patienten mit Gefäßerkrankungen

Als Signallipid im Blut kann S1P die Entstehung von Arteriosklerose beeinflussen [164] [251] [252]. Insbesondere der S1PR1 spielt eine Rolle für die Lymphozytenmigration aus lymphatischen Organen ins Blut, wodurch auch eine mögliche Regulation der entzündlichen Prozesse bei Arteriosklerose durch S1P resultiert [189] [253]. Da Arteriosklerose eine der Hauptursachen für Gefäßerkrankungen ist, sollte untersucht werden, ob die S1P-

Konzentrationen im Serum von Patienten mit Gefäßerkrankungen im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden verändert sind.

S1P stellt einen potentiellen Biomarker für Patienten mit Gefäßerkrankungen dar (Kap. 3.3.2.2). S1P-Konzentrationen im Serum von Patienten mit Gefäßerkrankungen zeichnen sich im Vergleich zu Kontrollprobanden ohne Gefäßerkrankungen durch einen erniedrigten Konzentrationsbereich aus. Diese Beobachtung ist unabhängig von den eingeschlossenen Krankheitsbildern einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit und Karotis-Stenose, anhand der S1P-Konzentration kann nicht zwischen den beiden Krankheitsbildern differenziert werden. Die veränderten S1P-Konzentrationen in humanen Serumproben von Patienten mit Gefäßerkrankungen können als translationale Übertragung der durch S1PR modulierten Neointima-Bildung und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen in murinen Gefäßverletzungsmodellen betrachtet werden [185] [186]. Darüber hinaus spiegeln die erniedrigten S1P-Konzentrationen im Serum von Patienten mit Gefäßerkrankungen den im murinen Verletzungsmodell beobachteten Abfall nach Ligation wider (Kap. 3.3.2.2.1, Kap. 3.2.2). Dabei wird durch Ligation eine reproduzierbare Gefäßverletzung herbeigeführt, welche als Pendant zu humanen arteriellen Gefäßdysfunktionen dienen soll.

Die in Kap. 1.2.4 dargestellte Beteiligung von S1P in der Pathogenese von Arteriosklerose spiegelt sich in den vorliegenden Ergebnissen der verringerten S1P-Konzentrationen im Serum von Patienten mit den arteriosklerotischen Erkrankungen periphere arterielle Verschlusskrankheit und Karotis-Stenose wider. Die bei Arteriosklerose nachgewiesene HDL-Dysfunktion konnte von Sattler et al. mittels S1P-Beladung behoben werden [198]. Demnach könnten Risikopatienten für Gefäßerkrankungen von einer S1P-Substitution profitieren, sodass ein Abfall der S1P-Serum-Konzentration, wie in Patienten mit Gefäßerkrankungen beobachtet, *a priori* verhindert wird. Insgesamt besitzt die S1P-Konzentration diagnostischen Wert für Gefäßerkrankungen, eignet sich jedoch nicht zur weiterführenden Differentialdiagnostik. Eine in diesem Zusammenhang denkbare prognostische Bedeutung der erniedrigten S1P-Konzentration vor Eingriff, bspw. für das Auftreten von Restenosen oder das Überleben wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Dass Thrombozyten an der Regulation der S1P-Konzentration im Serum beteiligt sind, bestätigte die positive Korrelation zwischen der Thrombozytenzahl und der S1P-Konzentration im Serum von gesunden Kontrollprobanden ( $\rho=0,269$ ; Tab. 27) und von Patienten mit Gefäßerkrankungen ( $\rho=0,235$ ; Tab. 28) (vgl. Kap. 1.2.1.1) [97]. Die Korrelation der S1P-Serum-Konzentration mit der Hämoglobin-Konzentration ( $\rho=0,197$ ; Tab. 28) und dem Hämatokrit ( $\rho=0,235$ ; Tab. 28) in Patienten mit Gefäßerkrankungen spiegelt außerdem die Relevanz der Erythrozyten als Quelle für zirkulierendes S1P wider (vgl. Kap. 1.2.1.1) [105] [106]. In Patienten mit Gefäßerkrankungen zeigte sich zudem eine negative Korrelation

mit der Serumkreatinin-Konzentration ( $\rho=-0,217$ ), d.h. dass die S1P-Konzentrationen bei eingeschränkter Nierenfunktion abfallen.

## **4.2.5 S1P im Akuten Koronarsyndrom**

### **4.2.5.1 Diagnostische Bedeutung**

S1P stellt einen potentiellen Marker für arteriosklerotische Erkrankungen und Akutes Koronarsyndrom dar (Kap. 1.2.5.1 + Kap. 1.2.5.2). Im Serum nimmt die S1P-Konzentration bei Aufnahme mit steigendem Schweregrad der arteriosklerotischen Erkrankung zu. Bei akut vorliegendem Myokardinfarkt ohne und mit ST-Streckenhebung wurde mit der S1P-Konzentration bei Aufnahme ein neuer diagnostischer Biomarker gefunden, mit dem Patienten mit Myokardinfarkt von Gesunden und Patienten mit asymptomatischer Koronarer Herzkrankheit, aber auch von Patienten mit instabiler Angina pectoris, abgegrenzt werden können. Dieses Unterscheidungskriterium ist besonders beim NSTEMI-Myokardinfarkt ausgeprägt, was an der deutlich geringeren Anzahl an STEMI-Myokardinfarkt-Patienten (STEMI:  $n = 11$  vs. NSTEMI:  $n = 47$ ) und der daraus resultierenden geringeren Spannweite der S1P-Konzentration liegen könnte. Eine mögliche Bedeutung als diagnostischer Marker für das Vorliegen einer Koronaren Herzkrankheit oder einer instabilen Angina pectoris konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den aus 214 bzw. 174 gesunden Blutspendern bestehenden Referenz-Kontrollgruppen (Tab. 35) zeigen sich in allen Patienten mit KHK oder ACS, analog zu Patienten mit Gefäßerkrankungen (Abb. 57), erniedrigte S1P-Konzentrationen (Abb. 58). Des Weiteren korrelierte die S1P-Konzentration positiv mit der LDL-Konzentration ( $\rho=0,273$ ), obwohl S1P im Blut an HDL, und nicht an LDL, gebunden vorliegt [110]. Dies könnte an der Erhöhung der LDL-Konzentrationen in Patienten mit arteriosklerotischen Erkrankungen und einer daraus resultierenden Umverteilung liegen.

Im Plasma wurde eine maximale Differenz zwischen der S1P-Konzentration in Patienten mit Myokardinfarkt und Patienten mit Koronarer Herzkrankheit bzw. gesunden Kontrollprobanden nach 2 - 12 Stunden-anhaltenden Symptomen beobachtet, die nach 24 Stunden-anhaltenden Symptomen rückläufig war [99]. In der ACS-Studie lag die Dauer der anhaltenden Symptome in der Regel innerhalb 2 - 12 Stunden. Allerdings traten auch bereits nach transienter kardialer Ischämie erhöhte Plasma-S1P-Konzentrationen auf, was beispielweise bei einer Koronarangiographie der Fall sein könnte [200]. Dies wurde in der ACS-Studie nicht bestätigt.

S1P stellt einen geeigneten Marker für das Vorliegen eines Myokardinfarktes dar. Im Vergleich zu den gängigen Herzinfarkt-Markern CK-MB und kardialem Troponin T, die nach 3 - 8 Stunden post-Infarkt im Blut nachgewiesen werden können, scheint S1P tendenziell

früher anzusteigen, da die entnommenen Blutproben der Myokardinfarkt-Gruppen hauptsächlich von Patienten mit Myokardinfarkt stammen, die mit akuten Symptomen in die Klinik eingeliefert wurden, dies im Optimalfall weniger als 3 Stunden post-Infarkt [242]. S1P könnte somit neben Veränderungen im Elektrokardiogramm und Myoglobin, welches bereits 1 Stunde post-Infarkt ansteigt, eine Rolle in der Frühdiagnostik spielen [242]. Eine Troponin T-Erhöhung hält bis zu zwei Wochen post-Infarkt an, Nachteil dieser langen Nachweisbarkeit ist die Nichterfassbarkeit zeitnaher Reinfarkte, welche jedoch dank einer kurzen Halbwertszeit durch Myoglobin identifiziert werden können [242]. Dies könnte ebenso durch Überwachung der S1P-Konzentration möglich sein, wenn diese zeitnah zum Ausgangswert zurückkehren würde.

Insgesamt ist die S1P-Serumkonzentration bei Aufnahme ein neuer diagnostischer Marker des akuten Myokardinfarktes. Beim akuten Myokardinfarkt vorliegende aktivierte Thrombozyten können S1P ausschütten und stellen folglich eine mögliche Quelle für den Anstieg der S1P-Konzentration bei Aufnahme dar [99]. Die vorliegenden Ergebnisse aus der ACS-Studie untermauern die Erkenntnis aus einer Studie von Deutschman et al. über höhere Serum-S1P-Konzentrationen bei zunehmendem Schweregrad einer Koronarstenose [98]. Gleichzeitig liegen die Serum-Konzentrationen von Patienten mit Koronarer Herzkrankheit bzw. Myokardinfarkt, wie von Sattler et al. bzw. Knapp et al. und Sutter et al. für Plasma-S1P-Konzentrationen beobachtet, deutlich unter den Werten der gesunden Kohorten. Eine Normalisierung der Plasma-S1P-Konzentration auf entsprechende HDL-Konzentrationen zeigt wiederum erhöhte Konzentrationen in Patienten mit Koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt [99] [202] [203]. Zur Klärung der Bedeutung der S1P-Konzentration im chronischen Stadium der Koronaren Herzkrankheit und im akuten Geschehen einer instabilen Angina pectoris sind weitere Untersuchungen mit ausreichend großen Gruppengrößen notwendig. Dabei sollte besonderer Wert auf eine repräsentative Kontrollgruppe ohne arteriosklerotische Veränderungen mit trotzdem durchgeführter Koronarangiographie gelegt werden.

#### **4.2.5.2 Prognostische Bedeutung**

Neben der diagnostischen Bedeutung der Serum-S1P-Konzentration bei Aufnahme weist dieser Parameter auch eine prognostische Bedeutung hinsichtlich Eintritt des kombinierten Endpunktes „Myokardinfarkt, Schlaganfall oder Tod“ innerhalb 1200 Tagen auf: Je höher die S1P-Konzentration bei Aufnahme des Patienten ausfällt, desto höher ist das Risiko, innerhalb der nachfolgenden 3 Jahren einen (weiteren) Myokardinfarkt oder Schlaganfall zu erleiden, bzw. zu sterben. Die Signifikanz der zugrunde liegenden Kaplan-Meier-Überlebensanalyse fundiert die prospektive Aussagekraft der S1P-Konzentration bei Aufnahme.

Die vorliegenden Ergebnisse beschreiben erstmalig die prognostische Bedeutung von S1P im kardiovaskulären Zusammenhang. Im Vergleich zu den herkömmlichen Herzinfarkt-Markern CK-MB, Troponin T und Myoglobin, die sich neben ihrer diagnostischen Bedeutsamkeit außerdem durch prognostische Eigenschaften hinsichtlich Reinfarkt-Risiko und Tod auszeichnen, stellt S1P einen äquivalenten Biomarker dar [244] [245] [246] [247]. Allerdings stellt die aufwendige Probenaufbereitung und zeitintensive LC-MS/MS-Analytik zur S1P-Bestimmung einen erheblichen Nachteil gegenüber den erhältlichen Schnelltests von CK-MB, Troponin T und Myoglobin dar.

## **4.2.6 S1P bei Pulmonaler Arterieller Hypertonie**

### **4.2.6.1 Diagnostische Bedeutung**

S1P stellt einen potentiellen Marker für kardiovaskuläre Erkrankungen dar (Kap. 1.2.5). Hinsichtlich PAH implizieren experimentelle Daten aus Zellkultur- und tierexperimentellen Studien die Beteiligung von S1P in der Pathogenese (Kap. 1.2.5.4). Dennoch sind, neben S1P-Messungen in Lungen und glatten Gefäßmuskelzellen der Pulmonalarterie von Patienten mit PAH, bis dato keine klinischen Studien bekannt, in denen zirkulierende S1P-Konzentrationen im Blut von Patienten mit PAH gemessen wurden. Die vorliegenden Ergebnisse repräsentieren erstmalig die Messung von zirkulierenden S1P-Konzentrationen im Blut von Patienten mit PAH. Jedoch kann anhand der S1P-Plasma-Konzentration nicht zwischen iPAH-Patienten und anderen PAH-Patienten (Patienten mit hereditärer PAH, durch Medikamente oder Toxine verursachter PAH, mit Bindegewebserkrankungen oder angeborenen Herzfehlern assoziierter PAH und PVOD) differenziert werden. Trotz den schwach erniedrigten S1P-Konzentrationen in non-iPAH-Patienten kann S1P keine diagnostische Aussagekraft zugeschrieben werden.

Weiterhin kann bei einem alleinigen Vergleich von Patientenproben ohne Kontrollgruppe keine Aussage über mögliche Veränderungen gegenüber Gesunden getroffen werden. Beim Vergleich der mittleren S1P-Plasma-Konzentrationen von PAH-Patienten ( $0,447 \pm 0,165$   $\mu\text{mol/L}$ ;  $n=108$ ) mit publizierten durchschnittlichen Plasma-Konzentrationen von Gesunden ( $0,191 \pm 0,079$   $\mu\text{mol/L}$ ;  $n=8$  bzw.  $0,350$   $\mu\text{mol/L}$  (Spannweite:  $0,217 - 0,708$   $\mu\text{mol/L}$ );  $n=85$ ) kann eine Erhöhung in PAH-Patienten vermutet werden, was mit der Beobachtung erhöhter S1P-Konzentrationen in Lungen sowie glatten Gefäßmuskelzellen der Pulmonalarterie von Patienten mit PAH korrespondiert [215]. Ein Vergleich mit Konzentrationen, die mithilfe anderer analytischer Methoden und Geräte bestimmt wurden sowie von ungematchten Kontrollprobanden stammen, ist jedoch kritisch zu betrachten [96] [97] [99]. Die Hypothese wird bei Betrachtung mit identischer LC-MS/MS-Methode und Gerät gemessener S1P-

Plasma-Konzentrationen gesunder Probanden ( $0,519 \pm 0,057 \mu\text{mol/L}$ ;  $n=10$ ) zufällig, demnach lägen reduzierte Konzentrationen in PAH-Patienten vor. Aufschluss würde die zeitgleiche Vermessung der Patientenproben mit Proben einer gematchten Kontrollgruppe bringen oder Messungen im Serum mit Vergleich zur Referenz-Kontrollgruppe.

#### **4.2.6.2 Prognostische Bedeutung**

Nachdem mit der S1P-Plasma-Konzentration keine diagnostische Aussagekraft in der iP4-Studie vorliegt, zeichnet sich auch keine prognostische Bedeutung hinsichtlich Eintritt des primären Endpunktes „Gesamtmortalität“ innerhalb 1200 Tagen ab, obgleich für PAH-Patienten mit niedrigen S1P-Konzentration im Trend ein erhöhtes Sterberisiko besteht. Daraus könnte, im Vergleich zu iPAH-Patienten, ein verkürztes Überleben für non-iPAH-Patienten mit tendenziell niedrigeren S1P-Konzentrationen gefolgert werden.

Insgesamt stellt S1P im Plasma, im Gegensatz zum Akuten Koronar-Syndrom in der ACS-Studie, bisher keinen potentiellen Biomarker zur Diagnose von und Prognose bei PAH dar. In der ACS-Studie beruhen die Ergebnisse jedoch auf Serumproben, sodass durch Wiederholung der S1P-Bestimmung im Serum von PAH-Patienten weiterhin mögliche diagnostische und/oder prognostische Eigenschaften aufgedeckt werden können und eine endgültige Aussage getroffen werden kann, zumal bei Verwendung von Plasmaproben in klinischen Studien aufgrund der Lagerungsdauer und -temperatur-Abhängigkeit der S1P-Konzentration eine hohe Variabilität berücksichtigt werden muss (Kap. 4.2.2).

### **4.3 Zusammenhang zwischen 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und S1P**

Der mittels Netzwerkanalyse gezeigte Zusammenhang zwischen 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und S1P auf Expressionsebene (Abb. 43) war der Hintergrund zur Untersuchung von S1P im TP-Tiermodell (Kap. 4.3.1) und zum Vergleich von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und S1P als Biomarker in Patienten (Kap. 4.3.2).

#### **4.3.1 S1P im TP-Tiermodell**

Die von Ulrych et al. nachgewiesene TP-abhängige S1P-Freisetzung aus Thrombozyten erlaubt die Hypothese einer reduzierten S1P-Freisetzung aus Thrombozyten von TP-KO-Mäusen [100]. Dies konnte im Vergleich zu TP-WT-Mäusen jedoch nicht durch eine Erniedrigung der S1P-Serum-Konzentration belegt werden (Kap. 3.2.1). Die bei TP-Defizienz unveränderten S1P-Konzentrationen im Serum könnten durch verschiedene gegenregulatorische Mechanismen erklärt werden: erhöhte Aktivität der SphK2 in

Thrombozyten, gesteigerte Expression des ABC-Transporters in der Thrombozytenmembran und/oder reduzierte Aktivität der S1P-Phosphatasen und -Lyase im Serum. Zudem könnte eine verminderte S1P-Freisetzung aus Thrombozyten durch vermehrte Freisetzung aus Erythrozyten kompensiert werden.

Im Plasma konnte, analog zur Untersuchung im Serum, kein Unterschied in der S1P-Konzentration zwischen TP-WT- und -KO-Mäusen festgestellt werden ( $0,46 \pm 0,07 \mu\text{mol/L}$  vs.  $0,51 \pm 0,09 \mu\text{mol/L}$ ) [100]. Der Quotient aus Serum- und Plasma-Konzentration im relativen Vergleich mit 3,1 bzw. 2,8, d.h. dass im Serum etwa die dreifache S1P-Konzentration als im Plasma vorliegt, entspricht nahezu dem humanen (siehe Kap. 4.2.2). Die Diskrepanz ergibt sich aus dem S1P-Gehalt der Thrombozyten, der mit der S1P-Serum-Konzentration bei im Serum stattfindender Thrombozytenaggregation und daraus resultierender S1P-Freisetzung erfasst wird, im Plasma bei ausbleibender Thrombozytenaggregation dagegen nicht ausgeschüttet wird und in den Thrombozyten verbleibt.

Die Thrombin-induzierte S1P-Freisetzung aus isolierten Thrombozyten von TP-KO-Mäusen war im Vergleich zu Thrombozyten von TP-WT-Geschwistern jedoch vermindert [100]. Aufgrund der Annahme, dass eine TP-vermittelte S1P-Freisetzung nur aus aktivierten Thrombozyten erfolgen kann, wird hier durch Inkubation mit Thrombin (mit PAR-1-AP (*protease-activated receptor-1activating peptide*) bei humanen Thrombozyten) eine experimentelle Aktivierung der Thrombozyten ausgelöst [100]. Da unter physiologischen Bedingungen weder im Serum noch im Plasma aktivierte Thrombozyten auftreten, hängen die dort vorherrschenden S1P-Konzentrationen nicht vom TP-Genotyp ab, was die unveränderten S1P-Konzentrationen im Serum und Plasma von TP-KO-Mäusen erklärt [100]. Die Tatsache, dass durch Thrombin-Stimulation aus Thrombozyten von TP-KO-Mäusen trotzdem, wenn auch vermindert, in gewissem Maße S1P ausgeschüttet wird, weist auf einen weiteren, allerdings TP-unabhängigen, Mechanismus zur S1P-Freisetzung hin [100].

Nachdem bei S1PR2-KO-Mäusen im Ligationsmodell der Arteria carotis die Bildung einer Neointima beobachtet wurde, während in WT-Geschwistern eine derartige Beobachtung ausblieb, könnte S1P über den S1PR2 hinsichtlich vaskulärer Läsionen protektiv wirken [185]. Dies sollte auch in TP-KO-Mäusen untersucht werden. Bei einer TP-Defizienz könnte eine reduzierte Freisetzung von S1P aus Thrombozyten einen verminderten protektiven Effekt hinsichtlich vaskulärer Läsionen verursachen, auch wenn sich die reduzierte Freisetzung von S1P aus Thrombozyten nicht in erniedrigten S1P-Konzentrationen im Serum widerspiegelte (siehe Kap. 3.2.1). Nach 28 Tagen trat im Hinblick auf die Intima-Media-Quotienten der explantierten Karotiden kein Unterschied zwischen TP-KO- und -WT-Geschwistern auf: Bei beiden Genotypen blieb die Neointima aus, kam es zu mittelgradiger Okklusion mit persistierendem Blutfluss oder zu hochgradiger Stenose mit vollständigem Gefäßverschluss

(Kap. 3.2.2). Somit konnte mit diesem Tiermodell hinsichtlich vaskulärer Läsionen keine weitere Gemeinsamkeit des TP mit S1PR, hier S1PR2, beschrieben werden, genauso wenig eine begünstigte Neointima-Bildung durch reduzierte S1P-Freisetzung aus Thrombozyten bei TP-Defizienz.

Neben den histologischen Auswertungen wurde im TP-WT-Serum der Verlauf der S1P-Konzentration vor und nach Ligation analysiert. Der Abfall der S1P-Konzentration 28 Tage nach Ligation veranschaulicht die Bedeutung von S1P als Mediator und Triggerfaktor nach Gefäßverletzungen (Kap. 3.2.2). Shimizu et al. sahen keine derartigen Veränderungen der S1P-Konzentration im Plasma, im Gegenteil eher einen potentiellen Anstieg [185]. Die Plasmaproben wurden allerdings an Tag 7 und 14 entnommen, sodass eine entgegengesetzte Entwicklung an Tag 28 nicht vollständig ausgeschlossen werden kann [185]. Allerdings könnten die Änderungen der S1P-Konzentration u. a. durch die unterschiedlichen Blutentnahmebedingungen beeinflusst worden sein. Vor Ligation erfolgte die Blutentnahme mittels submandibulärer Punktion am lebenden Tier, wohingegen die finale Blutentnahme erst nach Todeseintritt durchgeführt wurde. In jedem Fall wurde mit dem vorliegenden Tiermodell ein bestehender Zusammenhang zwischen S1P und pathophysiologischen Prozessen nach Gefäßverletzungen aufgedeckt, der mit S1PR2- und S1PR3- und Mausmodellen bisher nicht beobachtet wurde.

Insgesamt konnte im vorliegenden Ligrationsmodell der linken Arteria carotis hinsichtlich des TP keine Abhängigkeit vom Genotyp gezeigt werden. Obwohl die histologischen Ergebnisse nach Ligation der Arteria carotis sehr heterogen ausfielen (Kap. 3.2.2), zeigte sich bezüglich der S1P-Konzentrationen ein eindeutiger Unterschied in den TP-WT-Tieren.

### **4.3.2 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und S1P im Patienten**

Während in der ACS-Studie die 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration im Urin bei Aufnahme nur diagnostische Eigenschaften aufweist, zeichnet die S1P-Konzentration im Serum bei Aufnahme diagnostische und prognostische Eigenschaften aus.

Die Aussagekraft beider Signallipide ergänzt die in Kap. 1.3 beschriebenen Gemeinsamkeiten von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und S1P. Außerdem ist ein bestehender Zusammenhang zwischen den beiden Biomolekülen nicht unwahrscheinlich. Sowohl die 8-iso-PGF<sub>2α</sub> als auch die S1P-Konzentration steigt in Patienten mit arteriosklerotischen Erkrankungen, vor allem mit Myokardinfarkt, an. Die beobachtete Erhöhung beider Biomarker könnte durch die Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies erklärt werden, da diese die Biosynthese von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und S1P induzieren, woraus ein Anstieg in Urin bzw. Serum folgen könnte (siehe Kap. 1.3.2).

Die 8-iso-PGF<sub>2α</sub>- und S1P-Konzentration bei Aufnahme eignen sich als Biomarker zur Frühdiagnostik für Myokardinfarkte. Da sich die Gewinnung einer Urinprobe zur Bestimmung der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration bei einem Patienten mit akuten Brustschmerzen in der Notaufnahme schwieriger gestaltet und auch beschwerlicher für den Patienten selbst ist, spricht die ausreichende routinemäßige Blutentnahme zur Bestimmung der S1P-Konzentration hinsichtlich Frühdiagnostik für die Überlegenheit von S1P. Zudem könnten durch einen schnellen Abfall der S1P-Konzentration zeitnahe Reinfarkte erfasst werden. Im Gegenteil eignet sich lediglich 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, und nicht S1P, als Biomarker zur Differenzierung zwischen NSTEMI und STEMI sowie bei anhaltender Erhöhung zur Spätdiagnostik für Myokardinfarkte. Jedoch steht mit Troponin T bereits ein etablierter Marker zur Spätdiagnostik zur Verfügung, wohingegen sich S1P im Vergleich zu Troponin T, CK-MB und Myoglobin möglicherweise durch einen schnelleren Anstieg in der Frühdiagnostik auszeichnet. Des Weiteren ist anhand der S1P-Konzentration eine Unterscheidung zwischen Patienten mit instabiler Angina pectoris und Patienten mit im EKG unauffälligem NSTEMI möglich, wohingegen anhand der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration nur zwischen Patienten mit instabiler Angina pectoris und Patienten mit ohnehin im EKG auffälligem STEMI unterschieden werden kann.

In der ACS-Studie zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>- und S1P-Konzentration ( $\rho=0,507$ ). Beide Signallipide korrelierten außerdem mit dem bei ACS erhöhten Entzündungsmarker CRP (8-iso-PGF<sub>2α</sub>:  $\rho=0,387$ ; S1P:  $\rho=0,283$ ) und Herzinfarkt-Marker Troponin T (8-iso-PGF<sub>2α</sub>:  $\rho=0,567$ ; S1P:  $\rho=0,578$ ).

Während in der iP4-Studie die 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration im Urin sowohl diagnostische als auch prognostische Eigenschaften aufweist, bleibt die Rolle von S1P als Biomarker für PAH weiterhin ungeklärt [76] [77]. Zwar konnte die S1P-Konzentration im Plasma im Rahmen dieser Arbeit als Biomarker bereits ausgeschlossen werden, die Bedeutung der S1P-Konzentration im Serum steht aber noch aus und stellt im Vergleich zu Plasma die bessere Matrix für eine zuverlässige S1P-Bestimmung dar (Kap. 4.2.2). Ob in Bezug auf PAH eine weitere Gemeinsamkeit und ein weiterer Zusammenhang zwischen 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und S1P besteht, bleibt weitere Untersuchungen abzuwarten. Momentan besitzt allerdings nur 8-iso-PGF<sub>2α</sub> eine bestätigte Aussagekraft und ist als Biomarker geeignet.

## 4.4 Schlussfolgerung

### 4.4.1 Biologische Aktivität von 8-iso-PGF<sub>2α</sub>

*Welchen Phänotyp weisen TP-KO-Mäuse auf?*

Neben dem bekannten Blutungsphänotyp ist die Superoxid-Produktion unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen im Vergleich zu WT-Geschwistern unterschiedlich stark ausgeprägt. Weiterhin unterscheidet sich das metabolische Profil im Plasma. Die 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration im Urin ist unverändert, der systolische Blutdruck jedoch niedriger als in WT-Geschwistern.

*Welche Rolle spielt 8-iso-PGF<sub>2α</sub> für den Gefäßtonus ex vivo und in vivo?*

Sowohl *ex vivo* am Myographen mit Aorten und Pulmonalarterien als auch *in vivo* mittels Intravitalmikroskopie der Arteriolen des *M. cremaster* zeigt 8-iso-PGF<sub>2α</sub> vasokonstriktorische Eigenschaften, die über den TP vermittelt werden. PGF<sub>2α</sub>, 8-iso-PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> und U-46619 verhalten sich ähnlich (Tab. 34).

*Welche Auswirkungen hat eine 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Supplementation?*

Durch 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Supplementation mit einer Abgaberate von 5 µg/kg KG/h wird eine im Vergleich zur Vehikel-Gruppe vermehrte 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Ausscheidung erreicht, woraus allerdings keine Änderungen in der Blutdruckregulation resultieren. Dies kann durch den bei exogener 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Zufuhr verstärkten Metabolismus erklärt werden.

*Wie kann eine Überexpression des TP im Mausmodell erreicht werden?*

Eine Überexpression des humanen TP in transgenen Mäuse konnte nicht nachgewiesen werden. Mittels Injektion des AAV-Vektors AAV2-L1-CMV-LUC-2A-mTBXA2R wird eine zielgerichtete Überexpression des murinen TP in pulmonalen Endothelzellen erreicht. Als Nachweis dient die Luciferase-Aktivität und TP-Expression auf Transkriptionsebene. Die Etablierung dieses Mausmodelles stellt die Grundlage weiterer experimenteller Ansätze dar, z. B. zur Aufklärung der Pathogenese einer PAH mittels kombiniertem Hypoxie-Modell.

#### 4.4.2 S1P als Biomarker

*Welche S1P-Konzentrationen liegen in Gesunden und in Patienten vor?*

In Gesunden beträgt die mittlere S1P-Konzentration im Serum 1  $\mu\text{mol/L}$  und ist sowohl von Alter als auch Geschlecht unabhängig. In Patienten mit Gefäßerkrankungen und Akutem Koronarsyndrom liegen veränderte S1P-Konzentrationen vor: Patienten mit Gefäßerkrankungen weisen im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden erniedrigte S1P-Konzentrationen auf. Die S1P-Konzentrationen in Patienten mit Akutem Koronarsyndrom hingegen steigen mit zunehmendem Schweregrad der arteriosklerotischen Erkrankung an. In Patienten mit Pulmonaler Arterieller Hypertonie zeigt sich kein Unterschied zu Gesunden.

*Welche Methode eignet sich zur Bestimmung der S1P-Konzentration in biologischen Proben?*

Zur Bestimmung der S1P-Konzentration in biologischen Proben wurde eine LC-MS/MS-Methode entwickelt und validiert. Als interner Standard wird vorzugsweise S1P-*d7* eingesetzt. Die beschriebene Methode eignet sich zur Bestimmung der S1P-Konzentration in großen Studienpopulationen.

*Welche Faktoren (Matrix, Lagerung) beeinflussen die S1P-Konzentration in biologischen Proben? Wie kann eine zuverlässige Probenqualität zur Bestimmung der S1P-Konzentration gewährleistet werden?*

Die S1P-Konzentration wird von der Matrix und der Lagerungsdauer sowie -temperatur beeinflusst. Generell sollten S1P-Konzentrationen nur in gleichen Matrices verglichen werden. Die Proben sollten nach Blutentnahme zügig aufgearbeitet oder eingefroren werden. Serumproben eignen sich am besten zur Bestimmung der S1P-Konzentration.

#### 4.4.3 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> und S1P

Im TP-Tiermodell liegen nach Ligation der *Arteria carotis* veränderte S1P-Konzentrationen vor, was einen möglichen Zusammenhang des TP mit S1P bei Gefäßerkrankungen herstellen kann. Außerdem interagieren die mit S1PR<sub>1-5</sub>- und TP-assoziierten Gene in einem komplexen Netzwerk. Als Gemeinsamkeit weisen beide Signallipide diagnostische Eigenschaften in Patienten mit Akutem Koronarsyndrom auf, wohingegen sich in Patienten mit Pulmonaler Arterieller Hypertonie bisher lediglich 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  als Biomarker mit diagnostischen und prognostischen Eigenschaften eignet.

## 5 Zusammenfassung

Das Isoprostan 8-iso-Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  (8-iso-PGF $_{2\alpha}$ ) und das Sphingolipid Sphingosin-1-phosphat (S1P) stellen vasoaktive Signallipide dar, die nicht nur als Biomarker für kardiovaskuläre Erkrankungen eine Rolle spielen, sondern auch in deren Pathogenese. Ziel dieser Arbeit war, einerseits die Aufklärung von möglichen Pathomechanismen der Isoprostanwirkung in verschiedenen tierexperimentellen Ansätzen sowie der Bedeutung von 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  als Biomarker in Patienten mit Akutem Koronarsyndrom (ACS), andererseits die Etablierung einer validen LC-MS/MS-Methode (Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie) zur Bestimmung der S1P-Konzentration in biologischen Proben sowie die Aufklärung der Bedeutung von S1P als Biomarker in Patienten mit Gefäßerkrankungen, ACS und Pulmonaler Arterieller Hypertonie (PAH).

Hinsichtlich Pathomechanismen von 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  konnten vasokonstriktorische Eigenschaften sowohl *ex vivo* am Myographen mit murinen Aorten und Pulmonalarterien als auch *in vivo* an Arteriolen des Musculus cremaster nachgewiesen werden. Diese Effekte blieben in Thromboxan-Rezeptor-Knockout-Mäusen (TP-KO) aus, woraus eine TP-vermittelte Signaltransduktion geschlossen werden konnte. Der systolische Blutdruck von TP-KO-Mäusen war im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistern tendenziell erniedrigt, eine mögliche Konsequenz der reduzierten Vasokonstriktion bei TP-Defizienz. In Patienten mit ACS zeigte 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  als Biomarker diagnostische Bedeutung.

Für S1P wurde eine LC-MS/MS-Methode etabliert, bei der die Überstände nach Deproteinisierung der biologischen Probe mit einem binären Gradienten eluiert und in den Fraktionen mit einem Massenspektrometer detektiert werden. Dabei wird S1P ( $m/z = 380$ ) in ein Tochterion ( $m/z = 264$ ) fragmentiert, welches zur Quantifizierung verwendet wird. Als interner Standard wird deuteriertes S1P- $d7$  zugesetzt. Mit Hilfe einer Kontrollgruppe wurden Alters- und Geschlechtsabhängigkeit ausgeschlossen sowie eine mittlere Serumkonzentration von 1  $\mu\text{mol/L}$  ermittelt. In Patienten mit Gefäßerkrankungen trat eine Erniedrigung der S1P-Konzentration auf. In Patienten mit ACS zeigte S1P als Biomarker diagnostische und prognostische Bedeutung. In Patienten mit PAH zeigten sich keine Veränderungen.

Insgesamt spiegelt diese Arbeit die Relevanz von 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  und S1P als Biomarker für kardiovaskuläre Erkrankungen wider. Tierexperimentelle Studien bestätigen außerdem die Bedeutung für die zugrunde liegende Pathogenese. Des Weiteren stellt die angewandte Methode zur Bestimmung der S1P-Konzentration eine Grundlage zur Messung umfangreicher klinischer Studien dar.



## 6 Abstract

The isoprostane 8-iso-prostaglandin  $F_{2\alpha}$  (8-iso-PGF $_{2\alpha}$ ) and the sphingolipid sphingosine-1-phosphate are vasoactive signaling lipids. They do not only represent biomarkers for cardiovascular disease (CVD), they rather play a role in the pathogenesis of CVD. One aim of this thesis was to elucidate potential pathomechanisms of isoprostanes in different animal experiments as well as the diagnostic and prognostic impact of 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  as a biomarker in patients with acute coronary syndrome (ACS). The second aim of the present thesis was to establish a valid liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for determination of S1P in biological fluids, furthermore to clarify the diagnostic and prognostic impact of S1P as biomarker in patients with vascular diseases, ACS and pulmonary arterial hypertension (PAH).

Regarding pathomechanisms, 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  showed vasoconstrictive effects both on aortic as well as pulmonary arterial rings of mice *ex vivo* and arterioles of the mouse cremaster muscle *in vivo*. This effects were absent in thromboxane receptor-knockout mice (TP-KO) suggesting a TP-dependent signal transduction. Possibly due to reduced vasoconstriction in TP-KO mice, the systolic blood pressure tended to be decreased compared to wildtype littermates. In patients with ACS 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  was identified as biomarker with diagnostic impact: The urinary 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  concentration increased with severity of arteriosclerotic disease.

For determination of S1P in biological fluids the following LC-MS/MS method was established: After sample deproteinization with acetonitrile and centrifugation supernatants were subjected to reversed-phase chromatography. S1P was eluted by a binary gradient and detected by mass spectrometry monitoring the  $m/z=380$  (S1P parent ion)  $\rightarrow$  264 (daughter ion) transition. The daughter ion was used for quantitation. To correct for variations the internal standard S1P-*d7* was added before deproteinization. Based on a control group a mean concentration of 1  $\mu\text{mol/L}$  was observed in serum. Moreover, age- and sex-dependency was excluded. Patients with vascular diseases showed a decrease in S1P concentration. In patients with ACS S1P was identified as biomarker with both diagnostic and prognostic impact: Analogous to 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ , the S1P concentration in serum increased with severity of arteriosclerotic disease. Elevated S1P concentrations were associated with an increased risk for cardiovascular events or death within three years. No alterations occurred in patients with PAH.

Thus, clinical data of this thesis emphasize the relevance of 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  and S1P as biomarkers for CVD, while animal experiments also confirmed the involvement in the underlying pathogenesis. In addition, the performed LC-MS/MS method provides determination of S1P concentration in large cohorts.



## 7 Literaturverzeichnis

1. Morrow, J.D., Hill, K.E., Burk, R.F., Nammour, T.M., Badr, K.F., Roberts, L.J.: A series of prostaglandin F<sub>2</sub>-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**(23), 9383–9387 (1990)
2. Morrow, J.D., Awad, J.A., Boss, H.J., Blair, I.A., Roberts, L.J.: Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F<sub>2</sub>-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**(22), 10721–10725 (1992)
3. Roberts, L.J., Morrow, J.D.: Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free radical biology & medicine* **28**(4), 505–513 (2000)
4. Cracowski, J.-L., Durand, T., Bessard, G.: Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications. *Trends in pharmacological sciences* **23**(8), 360–366 (2002)
5. Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., Milzani, A.: Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical chemistry* **52**(4), 601–623 (2006). doi: 10.1373/clinchem.2005.061408
6. Rokach, J., Khanapure, S.P., Hwang, S.W., Adiyaman, M., Lawson, J.A., FitzGerald, G.A.: Nomenclature of isoprostanes: a proposal. *Prostaglandins* **54**(6), 853–873 (1997)
7. Bauer, J., Ripperger, A., Frantz, S., Ergün, S., Schwedhelm, E., Benndorf, R.A.: Pathophysiology of isoprostanes in the cardiovascular system: implications of isoprostane-mediated thromboxane A<sub>2</sub> receptor activation. *British journal of pharmacology* **171**(13), 3115–3131 (2014). doi: 10.1111/bph.12677
8. Schwedhelm, E., Bartling, A., Lenzen, H., Tsikas, D., Maas, R., Brümmer, J., Gutzki, F.-M., Berger, J., Frölich, J.C., Böger, R.H.: Urinary 8-iso-prostaglandin F<sub>2</sub>α as a risk marker in patients with coronary heart disease: a matched case-control study. *Circulation* **109**(7), 843–848 (2004). doi: 10.1161/01.CIR.0000116761.93647.30
9. Roberts, L.J., Moore, K.P., Zackert, W.E., Oates, J.A., Morrow, J.D.: Identification of the major urinary metabolite of the F<sub>2</sub>-isoprostane 8-iso-prostaglandin F<sub>2</sub>α in humans. *The Journal of biological chemistry* **271**(34), 20617–20620 (1996)
10. Chiabrando, C., Valagussa, A., Rivalta, C., Durand, T., Guy, A., Zuccato, E., Villa, P., Rossi, J.C., Fanelli, R.: Identification and measurement of endogenous beta-oxidation metabolites of 8-epi-Prostaglandin F<sub>2</sub>α. *The Journal of biological chemistry* **274**(3), 1313–1319 (1999)

11. Nourooz-Zadeh, J., Cooper, M.B., Ziegler, D., Betteridge, D.J.: Urinary 8-epi-PGF<sub>2</sub>alpha and its endogenous beta-oxidation products (2,3-dinor and 2,3-dinor-5,6-dihydro) as biomarkers of total body oxidative stress. *Biochemical and biophysical research communications* **330**(3), 731–736 (2005). doi: 10.1016/j.bbrc.2005.03.024
12. Yan, Z., Mas, E., Mori, T.A., Croft, K.D., Barden, A.E.: A significant proportion of F<sub>2</sub>-isoprostanes in human urine are excreted as glucuronide conjugates. *Analytical biochemistry* **403**(1-2), 126–128 (2010). doi: 10.1016/j.ab.2010.04.016
13. Hirata, M., Hayashi, Y., Ushikubi, F., Yokota, Y., Kageyama, R., Nakanishi, S., Narumiya, S.: Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane A<sub>2</sub> receptor. *Nature* **349**(6310), 617–620 (1991). doi: 10.1038/349617a0
14. Stahl, G.L., Darius, H., Lefer, A.M.: Antagonism of thromboxane actions in the isolated perfused rat heart. *Life sciences* **38**(22), 2037–2041 (1986)
15. Borg, C., Lim, C.T., Yeomans, D.C., Dieter, J.P., Komiotis, D., Anderson, E.G., Le Breton, G.C.: Purification of rat brain, rabbit aorta, and human platelet thromboxane A<sub>2</sub>/prostaglandin H<sub>2</sub> receptors by immunoaffinity chromatography employing anti-peptide and anti-receptor antibodies. *The Journal of biological chemistry* **269**(8), 6109–6116 (1994)
16. Bresnahan, B.A., Le Breton, G.C., Lianos, E.A.: Localization of authentic thromboxane A<sub>2</sub>/prostaglandin H<sub>2</sub> receptor in the rat kidney. *Kidney international* **49**(5), 1207–1213 (1996)
17. Huang, J.-S., Ramamurthy, S.K., Lin, X., Le Breton, G.C.: Cell signalling through thromboxane A<sub>2</sub> receptors. *Cellular signalling* **16**(5), 521–533 (2004)
18. Ushikubi, F., Nakajima, M., Hirata, M., Okuma, M., Fujiwara, M., Narumiya, S.: Purification of the thromboxane A<sub>2</sub>/prostaglandin H<sub>2</sub> receptor from human blood platelets. *The Journal of biological chemistry* **264**(28), 16496–16501 (1989)
19. Raychowdhury, M.K., Yukawa, M., Collins, L.J., McGrail, S.H., Kent, K.C., Ware, J.A.: Alternative splicing produces a divergent cytoplasmic tail in the human endothelial thromboxane A<sub>2</sub> receptor. *The Journal of biological chemistry* **270**(12), 7011 (1995)
20. Li, Y., Kang, J.X., Leaf, A.: Differential effects of various eicosanoids on the production or prevention of arrhythmias in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *Prostaglandins* **54**(2), 511–530 (1997)
21. Miggin, S.M., Kinsella, B.T.: Expression and tissue distribution of the mRNAs encoding the human thromboxane A<sub>2</sub> receptor (TP) alpha and beta isoforms. *Biochimica et biophysica acta* **1425**(3), 543–559 (1998)
22. Kinsella, B.T.: Thromboxane A<sub>2</sub> signalling in humans: a 'Tail' of two receptors. *Biochemical Society transactions* **29**(Pt 6), 641–654 (2001)

23. Audoly, L.P., Rocca, B., Fabre, J.E., Koller, B.H., Thomas, D., Loeb, A.L., Coffman, T.M., FitzGerald, G.A.: Cardiovascular responses to the isoprostanes iPF(2 $\alpha$ )-III and iPE(2)-III are mediated via the thromboxane A(2) receptor in vivo. *Circulation* **101**(24), 2833–2840 (2000)
24. Tang, M., Cyrus, T., Yao, Y., Vocun, L., Praticò, D.: Involvement of thromboxane receptor in the proatherogenic effect of isoprostane F2 $\alpha$ -III: evidence from apolipoprotein E- and LDL receptor-deficient mice. *Circulation* **112**(18), 2867–2874 (2005). doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA105.562223
25. Benndorf, R.A., Schwedhelm, E., Gnann, A., Taheri, R., Kom, G., Didié, M., Steenpass, A., Ergün, S., Böger, R.H.: Isoprostanes inhibit vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration, tube formation, and cardiac vessel sprouting in vitro, as well as angiogenesis in vivo via activation of the thromboxane A(2) receptor: a potential link between oxidative stress and impaired angiogenesis. *Circulation research* **103**(9), 1037–1046 (2008). doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.184036
26. Khasawneh, F.T., Huang, J.-S., Turek, J.W., Le Breton, G.C.: Differential mapping of the amino acids mediating agonist and antagonist coordination with the human thromboxane A2 receptor protein. *The Journal of biological chemistry* **281**(37), 26951–26965 (2006). doi: 10.1074/jbc.M507469200
27. Khasawneh, F.T., Huang, J.-S., Mir, F., Srinivasan, S., Tiruppathi, C., Le Breton, G.C.: Characterization of isoprostane signaling: evidence for a unique coordination profile of 8-iso-PGF(2 $\alpha$ ) with the thromboxane A(2) receptor, and activation of a separate cAMP-dependent inhibitory pathway in human platelets. *Biochemical pharmacology* **75**(12), 2301–2315 (2008). doi: 10.1016/j.bcp.2008.03.014
28. Hamberg, M., Svensson, J., Samuelsson, B.: Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**(8), 2994–2998 (1975)
29. Folco, G., Granström, E., Kindahl, H.: Albumin stabilizes thromboxane A2. *FEBS letters* **82**(2), 321–324 (1977)
30. Basu, S.: Metabolism of 8-iso-prostaglandin F2 $\alpha$ . *FEBS letters* **428**(1-2), 32–36 (1998)
31. Milne, G.L., Yin, H., Hardy, K.D., Davies, S.S., Roberts, L.J.: Isoprostane generation and function. *Chemical reviews* **111**(10), 5973–5996 (2011). doi: 10.1021/cr200160h
32. Fanelli, F., Mauri, M., Capra, V., Raimondi, F., Guzzi, F., Ambrosio, M., Rovati, G.E., Parenti, M.: Light on the structure of thromboxane A<sub>2</sub>receptor heterodimers. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **68**(18), 3109–3120 (2011). doi: 10.1007/s00018-010-0615-0

33. Offermanns, S., Simon, M.I.: G alpha 15 and G alpha 16 couple a wide variety of receptors to phospholipase C. *The Journal of biological chemistry* **270**(25), 15175–15180 (1995)
34. Kinsella, B.T., O'Mahony, D.J., FitzGerald, G.A.: The human thromboxane A2 receptor alpha isoform (TP alpha) functionally couples to the G proteins Gq and G11 in vivo and is activated by the isoprostane 8-epi prostaglandin F2 alpha. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **281**(2), 957–964 (1997)
35. Hirata, T., Narumiya, S.: Prostanoid receptors. *Chemical reviews* **111**(10), 6209–6230 (2011). doi: 10.1021/cr200010h
36. Hirata, T., Ushikubi, F., Kakizuka, A., Okuma, M., Narumiya, S.: Two thromboxane A2 receptor isoforms in human platelets. Opposite coupling to adenylyl cyclase with different sensitivity to Arg60 to Leu mutation. *The Journal of clinical investigation* **97**(4), 949–956 (1996). doi: 10.1172/JCI118518
37. Kim, H.J., Yoo, H.Y., Jang, J.H., Lin, H.Y., Seo, E.Y., Zhang, Y.H., Kim, S.J.: Wall stretch and thromboxane A2 activate NO synthase (eNOS) in pulmonary arterial smooth muscle cells via H2O2 and Akt-dependent phosphorylation. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* (2016). doi: 10.1007/s00424-015-1778-1
38. Miyosawa, K., Sasaki, M., Ohkubo, S., Nakahata, N.: Different pathways for activation of extracellular signal-regulated kinase through thromboxane A2 receptor isoforms. *Biological & pharmaceutical bulletin* **29**(4), 719–724 (2006)
39. Offermanns, S., Laugwitz, K.L., Spicher, K., Schultz, G.: G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**(2), 504–508 (1994)
40. Moers, A., Nieswandt, B., Massberg, S., Wettschureck, N., Grüner, S., Konrad, I., Schulte, V., Aktas, B., Gratacap, M.-P., Simon, M.I., Gawaz, M., Offermanns, S.: G13 is an essential mediator of platelet activation in hemostasis and thrombosis. *Nature medicine* **9**(11), 1418–1422 (2003). doi: 10.1038/nm943
41. Wagner, R.S., Weare, C., Jin, N., Mohler, E.R., Rhoades, R.A.: Characterization of signal transduction events stimulated by 8-epi-prostaglandin(PG)F2 alpha in rat aortic rings. *Prostaglandins* **54**(2), 581–599 (1997)
42. Kromer, B.M., Tippins, J.R.: Coronary artery constriction by the isoprostane 8-epi prostaglandin F2 alpha. *British journal of pharmacology* **119**(6), 1276–1280 (1996)
43. Cracowski, J.L., Stanke-Labesque, F., Devillier, P., Chavanon, O., Hunt, M., Souvignet, C., Bessard, G.: Human internal mammary artery contraction by isoprostaglandin f(2alpha) type-III [8-iso-prostaglandin F(2alpha)]. *European journal of pharmacology* **397**(1), 161–168 (2000)
44. Yura, T., Fukunaga, M., Khan, R., Nassar, G.N., Badr, K.F., Montero, A.: Free-radical-generated F2-isoprostane stimulates cell proliferation and endothelin-1 expression on

- endothelial cells. *Kidney international* **56**(2), 471–478 (1999). doi: 10.1046/j.1523-1755.1999.00596.x
45. Zahler, S., Becker, B.F.: Indirect enhancement of neutrophil activity and adhesion to cultured human umbilical vein endothelial cells by isoprostanes (iPF<sub>2</sub>alpha-III and iPE<sub>2</sub>-III). *Prostaglandins & other lipid mediators* **57**(5-6), 319–331 (1999)
46. Leitinger, N., Huber, J., Rizza, C., Mechtcheriakova, D., Bochkov, V., Koshelnick, Y., Berliner, J.A., Binder, B.R.: The isoprostane 8-iso-PGF<sub>2</sub>(alpha) stimulates endothelial cells to bind monocytes: differences from thromboxane-mediated endothelial activation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **15**(7), 1254–1256 (2001)
47. Stocker, R., Keaney, J.F.: Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiological reviews* **84**(4), 1381–1478 (2004). doi: 10.1152/physrev.00047.2003
48. Dogné, J.-M., Hanson, J., Pratico, D.: Thromboxane, prostacyclin and isoprostanes: therapeutic targets in atherogenesis. *Trends in pharmacological sciences* **26**(12), 639–644 (2005). doi: 10.1016/j.tips.2005.10.001
49. Thomas, D.W., Mannon, R.B., Mannon, P.J., Latour, A., Oliver, J.A., Hoffman, M., Smithies, O., Koller, B.H., Coffman, T.M.: Coagulation defects and altered hemodynamic responses in mice lacking receptors for thromboxane A<sub>2</sub>. *The Journal of clinical investigation* **102**(11), 1994–2001 (1998). doi: 10.1172/JCI5116
50. Kabashima, K., Murata, T., Tanaka, H., Matsuoka, T., Sakata, D., Yoshida, N., Katagiri, K., Kinashi, T., Tanaka, T., Miyasaka, M., Nagai, H., Ushikubi, F., Narumiya, S.: Thromboxane A<sub>2</sub> modulates interaction of dendritic cells and T cells and regulates acquired immunity. *Nature immunology* **4**(7), 694–701 (2003). doi: 10.1038/ni943
51. Morrow, J.D., Frei, B., Longmire, A.W., Gaziano, J.M., Lynch, S.M., Shyr, Y., Strauss, W.E., Oates, J.A., Roberts, L.J.: Increase in circulating products of lipid peroxidation (F<sub>2</sub>-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *The New England journal of medicine* **332**(18), 1198–1203 (1995). doi: 10.1056/NEJM199505043321804
52. Reilly, M., Delanty, N., Lawson, J.A., FitzGerald, G.A.: Modulation of oxidant stress in vivo in chronic cigarette smokers. *Circulation* **94**(1), 19–25 (1996)
53. Chehne, F., Oguogho, A., Lupattelli, G., Budinsky, A.C., Palumbo, B., Sinzinger, H.: Increase of isoprostane 8-epi-PGF<sub>2</sub>(alpha) after restarting smoking. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* **64**(6), 307–310 (2001). doi: 10.1054/plef.2001.0277
54. Davì, G., Guagnano, M.T., Ciabattini, G., Basili, S., Falco, A., Marinopicolli, M., Nutini, M., Sensi, S., Patrono, C.: Platelet activation in obese women: role of inflammation and oxidant stress. *JAMA* **288**(16), 2008–2014 (2002)

55. Keaney, J.F., Larson, M.G., Vasan, R.S., Wilson, P.W.F., Lipinska, I., Corey, D., Massaro, J.M., Sutherland, P., Vita, J.A., Benjamin, E.J.: Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **23**(3), 434–439 (2003). doi: 10.1161/01.ATV.0000058402.34138.11
56. Davì, G., Ciabattoni, G., Consoli, A., Mezzetti, A., Falco, A., Santarone, S., Pennese, E., Vitacolonna, E., Bucciarelli, T., Costantini, F., Capani, F., Patrono, C.: In vivo formation of 8-iso-prostaglandin f2alpha and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation* **99**(2), 224–229 (1999)
57. Devaraj, S., Hirany, S.V., Burk, R.F., Jialal, I.: Divergence between LDL oxidative susceptibility and urinary F(2)-isoprostanes as measures of oxidative stress in type 2 diabetes. *Clinical chemistry* **47**(11), 1974–1979 (2001)
58. Davi, G., Alessandrini, P., Mezzetti, A., Minotti, G., Bucciarelli, T., Costantini, F., Cipollone, F., Bon, G.B., Ciabattoni, G., Patrono, C.: In vivo formation of 8-Epi-prostaglandin F2 alpha is increased in hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **17**(11), 3230–3235 (1997)
59. Reilly, M.P., Praticò, D., Delanty, N., DiMinno, G., Tremoli, E., Rader, D., Kapoor, S., Rokach, J., Lawson, J., FitzGerald, G.A.: Increased formation of distinct F2 isoprostanes in hypercholesterolemia. *Circulation* **98**(25), 2822–2828 (1998)
60. Gniwotta, C., Morrow, J.D., Roberts, L.J., Kühn, H.: Prostaglandin F2-like compounds, F2-isoprostanes, are present in increased amounts in human atherosclerotic lesions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **17**(11), 3236–3241 (1997)
61. Praticò, D., Iuliano, L., Mauriello, A., Spagnoli, L., Lawson, J.A., Rokach, J., Maclouf, J., Violi, F., FitzGerald, G.A.: Localization of distinct F2-isoprostanes in human atherosclerotic lesions. *The Journal of clinical investigation* **100**(8), 2028–2034 (1997). doi: 10.1172/JCI119735
62. Praticò, D., Rokach, J., Tangirala, R.K.: Brains of aged apolipoprotein E-deficient mice have increased levels of F2-isoprostanes, in vivo markers of lipid peroxidation. *Journal of neurochemistry* **73**(2), 736–741 (1999)
63. Kobayashi, T., Tahara, Y., Matsumoto, M., Iguchi, M., Sano, H., Murayama, T., Arai, H., Oida, H., Yurugi-Kobayashi, T., Yamashita, J.K., Katagiri, H., Majima, M., Yokode, M., Kita, T., Narumiya, S.: Roles of thromboxane A(2) and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *The Journal of clinical investigation* **114**(6), 784–794 (2004). doi: 10.1172/JCI21446
64. Wolfram, R., Oguogho, A., Palumbo, B., Sinzinger, H.: Enhanced oxidative stress in coronary heart disease and chronic heart failure as indicated by an increased 8-epi-

- PGF(2alpha). *European journal of heart failure* **7**(2), 167–172 (2005). doi: 10.1016/j.ejheart.2004.05.007
65. Schwedhelm, E., Bierend, A., Maas, R., Trinks, R., Kom, G.D., Tsikas, D., Böger, R.H.: Redox-generated isoprostanes are associated with residual platelet activity in aspirin-treated patients with stable coronary heart disease. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **8**(12), 2662–2670 (2010). doi: 10.1111/j.1538-7836.2010.04117.x
66. Vassalle, C., Botto, N., Andreassi, M.G., Berti, S., Biagini, A.: Evidence for enhanced 8-isoprostane plasma levels, as index of oxidative stress in vivo, in patients with coronary artery disease. *Coronary artery disease* **14**(3), 213–218 (2003). doi: 10.1097/01.mca.0000063504.13456.c3
67. Shishehbor, M.H., Zhang, R., Medina, H., Brennan, M.-L., Brennan, D.M., Ellis, S.G., Topol, E.J., Hazen, S.L.: Systemic elevations of free radical oxidation products of arachidonic acid are associated with angiographic evidence of coronary artery disease. *Free radical biology & medicine* **41**(11), 1678–1683 (2006). doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.09.001
68. Elesber, A.A., Best, P.J., Lennon, R.J., Mathew, V., Rihal, C.S., Lerman, L.O., Lerman, A.: Plasma 8-iso-prostaglandin F2alpha, a marker of oxidative stress, is increased in patients with acute myocardial infarction. *Free radical research* **40**(4), 385–391 (2006). doi: 10.1080/10715760500539154
69. Delanty, N., Reilly, M.P., Pratico, D., Lawson, J.A., McCarthy, J.F., Wood, A.E., Ohnishi, S.T., Fitzgerald, D.J., FitzGerald, G.A.: 8-epi PGF2 alpha generation during coronary reperfusion. A potential quantitative marker of oxidant stress in vivo. *Circulation* **95**(11), 2492–2499 (1997)
70. Reilly, M.P., Delanty, N., Roy, L., Rokach, J., Callaghan, P.O., Crean, P., Lawson, J.A., FitzGerald, G.A.: Increased formation of the isoprostanes IPF2alpha-I and 8-epi-prostaglandin F2alpha in acute coronary angioplasty: evidence for oxidant stress during coronary reperfusion in humans. *Circulation* **96**(10), 3314–3320 (1997)
71. Cracowski, J.L., Tremel, F., Marpeau, C., Baguet, J.P., Stanke-Labesque, F., Mallion, J.M., Bessard, G.: Increased formation of F(2)-isoprostanes in patients with severe heart failure. *Heart (British Cardiac Society)* **84**(4), 439–440 (2000)
72. Nonaka-Sarukawa, M., Yamamoto, K., Aoki, H., Takano, H., Katsuki, T., Ikeda, U., Shimada, K.: Increased urinary 15-F2t-isoprostane concentrations in patients with non-ischaemic congestive heart failure: a marker of oxidative stress. *Heart (British Cardiac Society)* **89**(8), 871–874 (2003)
73. Mallat, Z., Philip, I., Lebreton, M., Chatel, D., Maclouf, J., Tedgui, A.: Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F2alpha in pericardial fluid of patients with heart failure: a potential role

- for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure. *Circulation* **97**(16), 1536–1539 (1998)
74. Hoeper, M.M., Ghofrani, H.A., Gorenflo, M., Grünig, E., Rosenkranz, S., Schranz, D.: Diagnostik und Therapie der pulmonalen Hypertonie. *Kardiologie* **4**(3), 189–207 (2010). doi: 10.1007/s12181-010-0269-z
75. Montani, D., Günther, S., Dorfmueller, P., Perros, F., Girerd, B., Garcia, G., Jaïs, X., Savale, L., Artaud-Macari, E., Price, L.C., Humbert, M., Simonneau, G., Sitbon, O.: Pulmonary arterial hypertension. *Orphanet journal of rare diseases* **8**, 97 (2013). doi: 10.1186/1750-1172-8-97
76. Cracowski, J.L., Cracowski, C., Bessard, G., Pepin, J.L., Bessard, J., Schwebel, C., Stanke-Labesque, F., Pison, C.: Increased lipid peroxidation in patients with pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* **164**(6), 1038–1042 (2001). doi: 10.1164/ajrccm.164.6.2104033
77. Cracowski, J.-L., Degano, B., Chabot, F., Labarère, J., Schwedhelm, E., Monneret, D., Iuliano, L., Schwebel, C., Chaouat, A., Reynaud-Gaubert, M., Faure, P., Maas, R., Renversez, J.-C., Cracowski, C., Sitbon, O., Yaïci, A., Simonneau, G., Humbert, M.: Independent association of urinary F2-isoprostanes with survival in pulmonary arterial hypertension. *Chest* **142**(4), 869–876 (2012). doi: 10.1378/chest.11-1267
78. Zhang, R., Sun, M.-L., Fan, Y.-F., Jiang, X., Zhao, Q.-H., He, J., Wang, L., Shailendra, P.K., Safdar, Z., Jing, Z.-C.: Plasma 15-F2t-isoprostane in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *International journal of cardiology* **175**(2), 268–273 (2014). doi: 10.1016/j.ijcard.2014.05.014
79. John, G.W., Valentin, J.P.: Analysis of the pulmonary hypertensive effects of the isoprostane derivative, 8-iso-PGF<sub>2</sub>α, in the rat. *British journal of pharmacology* **122**(5), 899–905 (1997). doi: 10.1038/sj.bjp.0701441
80. Hernansanz-Agustín, P., Izquierdo-Álvarez, A., Sánchez-Gómez, F.J., Ramos, E., Villa-Piña, T., Lamas, S., Bogdanova, A., Martínez-Ruiz, A.: Acute hypoxia produces a superoxide burst in cells. *Free radical biology & medicine* **71**, 146–156 (2014). doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.011
81. Vanden Hoek, T.L., Li, C., Shao, Z., Schumacker, P.T., Becker, L.B.: Significant levels of oxidants are generated by isolated cardiomyocytes during ischemia prior to reperfusion. *Journal of molecular and cellular cardiology* **29**(9), 2571–2583 (1997). doi: 10.1006/jmcc.1997.0497
82. Zuo, L., Clanton, T.L.: Reactive oxygen species formation in the transition to hypoxia in skeletal muscle. *American journal of physiology. Cell physiology* **289**(1), C207-16 (2005). doi: 10.1152/ajpcell.00449.2004

83. Clanton, T.L.: Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985) **102**(6), 2379–2388 (2007). doi: 10.1152/jappphysiol.01298.2006
84. Jankov, R.P., Belcastro, R., Ovcina, E., Lee, J., Massaeli, H., Lye, S.J., Tanswell, A.K.: Thromboxane A(2) receptors mediate pulmonary hypertension in 60% oxygen-exposed newborn rats by a cyclooxygenase-independent mechanism. *American journal of respiratory and critical care medicine* **166**(2), 208–214 (2002). doi: 10.1164/rccm.200112-124OC
85. Montuschi, P., Barnes, P.J., Roberts, L.J.: Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **18**(15), 1791–1800 (2004). doi: 10.1096/fj.04-2330rev
86. Levade, T., Jaffrézou, J.P.: Signalling sphingomyelinases: which, where, how and why? *Biochimica et biophysica acta* **1438**(1), 1–17 (1999)
87. Zheng, W., Kollmeyer, J., Symolon, H., Momin, A., Munter, E., Wang, E., Kelly, S., Allegood, J.C., Liu, Y., Peng, Q., Ramaraju, H., Sullards, M.C., Cabot, M., Merrill, A.H.: Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. *Biochimica et biophysica acta* **1758**(12), 1864–1884 (2006). doi: 10.1016/j.bbamem.2006.08.009
88. Larsen, P.J., Tennagels, N.: On ceramides, other sphingolipids and impaired glucose homeostasis. *Molecular metabolism* **3**(3), 252–260 (2014). doi: 10.1016/j.molmet.2014.01.011
89. Sugita, M., Willians, M., Dulaney, J.T., Moser, H.W.: Ceramidase and ceramide synthesis in human kidney and cerebellum. Description of a new alkaline ceramidase. *Biochimica et biophysica acta* **398**(1), 125–131 (1975)
90. Bernardo, K., Hurwitz, R., Zenk, T., Desnick, R.J., Ferlinz, K., Schuchman, E.H., Sandhoff, K.: Purification, characterization, and biosynthesis of human acid ceramidase. *The Journal of biological chemistry* **270**(19), 11098–11102 (1995)
91. Liu, H., Chakravarty, D., Maceyka, M., Milstien, S., Spiegel, S.: Sphingosine kinases: a novel family of lipid kinases. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **71**, 493–511 (2002)
92. Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M.M., Dickson, R., Spiegel, S.: Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. *The Journal of biological chemistry* **273**(37), 23722–23728 (1998)
93. Olivera, A., Kohama, T., Tu, Z., Milstien, S., Spiegel, S.: Purification and characterization of rat kidney sphingosine kinase. *The Journal of biological chemistry* **273**(20), 12576–12583 (1998)

94. Liu, H., Sugiura, M., Nava, V.E., Edsall, L.C., Kono, K., Poulton, S., Milstien, S., Kohama, T., Spiegel, S.: Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform. *The Journal of biological chemistry* **275**(26), 19513–19520 (2000). doi: 10.1074/jbc.M002759200
95. Maceyka, M., Sankala, H., Hait, N.C., Le Stunff, H., Liu, H., Toman, R., Collier, C., Zhang, M., Satin, L.S., Merrill, A.H., Milstien, S., Spiegel, S.: SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. *The Journal of biological chemistry* **280**(44), 37118–37129 (2005). doi: 10.1074/jbc.M502207200
96. Yatomi, Y., Igarashi, Y., Yang, L., Hisano, N., Qi, R., Asazuma, N., Satoh, K., Ozaki, Y., Kume, S.: Sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum. *Journal of biochemistry* **121**(5), 969–973 (1997)
97. Igarashi, Y., Yatomi, Y.: Sphingosine 1-phosphate is a blood constituent released from activated platelets, possibly playing a variety of physiological and pathophysiological roles. *Acta biochimica Polonica* **45**(2), 299–309 (1998)
98. Deutschman, D.H., Carstens, J.S., Klepper, R.L., Smith, W.S., Page, M.T., Young, T.R., Gleason, L.A., Nakajima, N., Sabbadini, R.A.: Predicting obstructive coronary artery disease with serum sphingosine-1-phosphate. *American heart journal* **146**(1), 62–68 (2003). doi: 10.1016/S0002-8703(03)00118-2
99. Sattler, K.J.E., Elbasan, S., Keul, P., Elter-Schulz, M., Bode, C., Gräler, M.H., Bröcker-Preuss, M., Budde, T., Erbel, R., Heusch, G., Levkau, B.: Sphingosine 1-phosphate levels in plasma and HDL are altered in coronary artery disease. *Basic research in cardiology* **105**(6), 821–832 (2010). doi: 10.1007/s00395-010-0112-5
100. Ulrych, T., Böhm, A., Polzin, A., Daum, G., Nüsing, R.M., Geisslinger, G., Hohlfeld, T., Schrör, K., Rauch, B.H.: Release of sphingosine-1-phosphate from human platelets is dependent on thromboxane formation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **9**(4), 790–798 (2011). doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04194.x
101. Tani, M., Sano, T., Ito, M., Igarashi, Y.: Mechanisms of sphingosine and sphingosine 1-phosphate generation in human platelets. *Journal of lipid research* **46**(11), 2458–2467 (2005). doi: 10.1194/jlr.M500268-JLR200
102. Urtz, N., Gaertner, F., Bruehl, M.-L. von, Chandraratne, S., Rahimi, F., Zhang, L., Orban, M., Barocke, V., Beil, J., Schubert, I., Lorenz, M., Legate, K.R., Huwiler, A., Pfeilschifter, J.M., Beerli, C., Ledieu, D., Persohn, E., Billich, A., Baumruker, T., Mederos y Schnitzler, M., Massberg, S.: Sphingosine 1-Phosphate Produced by Sphingosine Kinase 2 Intrinsically Controls Platelet Aggregation In Vitro and In Vivo. *Circulation research* **117**(4), 376–387 (2015). doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306901

103. Ono, Y., Kurano, M., Ohkawa, R., Yokota, H., Igarashi, K., Aoki, J., Tozuka, M., Yatomi, Y.: Sphingosine 1-phosphate release from platelets during clot formation: close correlation between platelet count and serum sphingosine 1-phosphate concentration. *Lipids in health and disease* **12**, 20 (2013). doi: 10.1186/1476-511X-12-20
104. Yatomi, Y., Ruan, F., Hakomori, S., Igarashi, Y.: Sphingosine-1-phosphate: a platelet-activating sphingolipid released from agonist-stimulated human platelets. *Blood* **86**(1), 193–202 (1995)
105. Hänel, P., Andréani, P., Gräler, M.H.: Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **21**(4), 1202–1209 (2007). doi: 10.1096/fj.06-7433com
106. Bode, C., Sensken, S.-C., Peest, U., Beutel, G., Thol, F., Levkau, B., Li, Z., Bittman, R., Huang, T., Tölle, M., van der Giet, M., Gräler, M.H.: Erythrocytes serve as a reservoir for cellular and extracellular sphingosine 1-phosphate. *Journal of cellular biochemistry* **109**(6), 1232–1243 (2010). doi: 10.1002/jcb.22507
107. Ohkawa, R., Nakamura, K., Okubo, S., Hosogaya, S., Ozaki, Y., Tozuka, M., Osima, N., Yokota, H., Ikeda, H., Yatomi, Y.: Plasma sphingosine-1-phosphate measurement in healthy subjects: close correlation with red blood cell parameters. *Annals of clinical biochemistry* **45**(Pt 4), 356–363 (2008). doi: 10.1258/acb.2007.007189
108. Venkataraman, K., Lee, Y.-M., Michaud, J., Thangada, S., Ai, Y., Bonkovsky, H.L., Parikh, N.S., Habrukowich, C., Hla, T.: Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate. *Circulation research* **102**(6), 669–676 (2008). doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.165845
109. Aoki, S., Yatomi, Y., Ohta, M., Osada, M., Kazama, F., Satoh, K., Nakahara, K., Ozaki, Y.: Sphingosine 1-phosphate-related metabolism in the blood vessel. *Journal of biochemistry* **138**(1), 47–55 (2005). doi: 10.1093/jb/mvi100
110. Murata, N., Sato, K., Kon, J., Tomura, H., Yanagita, M., Kuwabara, A., Ui, M., Okajima, F.: Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions. *The Biochemical journal* **352 Pt 3**, 809–815 (2000)
111. Christoffersen, C., Obinata, H., Kumaraswamy, S.B., Galvani, S., Ahnström, J., Sevana, M., Egerer-Sieber, C., Muller, Y.A., Hla, T., Nielsen, L.B., Dahlbäck, B.: Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**(23), 9613–9618 (2011). doi: 10.1073/pnas.1103187108
112. Zhang, B., Tomura, H., Kuwabara, A., Kimura, T., Miura, S.-I., Noda, K., Okajima, F., Saku, K.: Correlation of high density lipoprotein (HDL)-associated sphingosine 1-

- phosphate with serum levels of HDL-cholesterol and apolipoproteins. *Atherosclerosis* **178**(1), 199–205 (2005). doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2004.08.024
113. Pyne, S., Pyne, N.J.: Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. *The Biochemical journal* **349**(Pt 2), 385–402 (2000)
114. Thuy, A.V., Reimann, C.-M., Hemdan, N.Y.A., Gräler, M.H.: Sphingosine 1-phosphate in blood: function, metabolism, and fate. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **34**(1), 158–171 (2014). doi: 10.1159/000362992
115. Mandala, S.M.: Sphingosine-1-phosphate phosphatases. *Prostaglandins & other lipid mediators* **64**(1-4), 143–156 (2001)
116. Mandala, S.M., Thornton, R., Galve-Roperh, I., Poulton, S., Peterson, C., Olivera, A., Bergstrom, J., Kurtz, M.B., Spiegel, S.: Molecular cloning and characterization of a lipid phosphohydrolase that degrades sphingosine-1-phosphate and induces cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(14), 7859–7864 (2000). doi: 10.1073/pnas.120146897
117. Le Stunff, H., Peterson, C., Thornton, R., Milstien, S., Mandala, S.M., Spiegel, S.: Characterization of murine sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase. *The Journal of biological chemistry* **277**(11), 8920–8927 (2002). doi: 10.1074/jbc.M109968200
118. Ogawa, C., Kihara, A., Gokoh, M., Igarashi, Y.: Identification and characterization of a novel human sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase, hSPP2. *The Journal of biological chemistry* **278**(2), 1268–1272 (2003). doi: 10.1074/jbc.M209514200
119. Hannun, Y.A., Luberto, C., Argraves, K.M.: Enzymes of sphingolipid metabolism: from modular to integrative signaling. *Biochemistry* **40**(16), 4893–4903 (2001)
120. Hannun, Y.A., Obeid, L.M.: Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**(2), 139–150 (2008). doi: 10.1038/nrm2329
121. Ullman, M.D., Radin, N.S.: The enzymatic formation of sphingomyelin from ceramide and lecithin in mouse liver. *The Journal of biological chemistry* **249**(5), 1506–1512 (1974)
122. van Veldhoven, P.P., Mannaerts, G.P.: Subcellular localization and membrane topology of sphingosine-1-phosphate lyase in rat liver. *The Journal of biological chemistry* **266**(19), 12502–12507 (1991)
123. van Veldhoven, P.P., Mannaerts, G.P.: Sphingosine-phosphate lyase. *Advances in lipid research* **26**, 69–98 (1993)
124. Aguilar, A., Saba, J.D.: Truth and consequences of sphingosine-1-phosphate lyase. *Advances in biological regulation* **52**(1), 17–30 (2012). doi: 10.1016/j.advenzreg.2011.09.015

125. Yatomi, Y., Yamamura, S., Ruan, F., Igarashi, Y.: Sphingosine 1-phosphate induces platelet activation through an extracellular action and shares a platelet surface receptor with lysophosphatidic acid. *The Journal of biological chemistry* **272**(8), 5291–5297 (1997)
126. Stoffel, W., Heimann, G., Hellenbroich, B.: Sphingosine kinase in blood platelets. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* **354**(5), 562–566 (1973)
127. Ito, K., Anada, Y., Tani, M., Ikeda, M., Sano, T., Kihara, A., Igarashi, Y.: Lack of sphingosine 1-phosphate-degrading enzymes in erythrocytes. *Biochemical and biophysical research communications* **357**(1), 212–217 (2007). doi: 10.1016/j.bbrc.2007.03.123
128. van Koppen, C., Meyer zu Heringdorf, M., Laser, K.T., Zhang, C., Jakobs, K.H., Bünemann, M., Pott, L.: Activation of a high affinity G<sub>i</sub> protein-coupled plasma membrane receptor by sphingosine-1-phosphate. *The Journal of biological chemistry* **271**(4), 2082–2087 (1996)
129. Lee, M.J., van Brocklyn, J.R., Thangada, S., Liu, C.H., Hand, A.R., Menzeleev, R., Spiegel, S., Hla, T.: Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science (New York, N.Y.)* **279**(5356), 1552–1555 (1998)
130. Spiegel, S.: Sphingosine 1-phosphate: a ligand for the EDG-1 family of G-protein-coupled receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences* **905**, 54–60 (2000)
131. Kluk, M.J., Hla, T.: Signaling of sphingosine-1-phosphate via the S1P/EDG-family of G-protein-coupled receptors. *Biochimica et biophysica acta* **1582**(1-3), 72–80 (2002)
132. An, S., Goetzl, E.J., Lee, H.: Signaling mechanisms and molecular characteristics of G protein-coupled receptors for lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *Journal of cellular biochemistry. Supplement* **30-31**, 147–157 (1998)
133. Hla, T., Lee, M.J., Ancellin, N., Thangada, S., Liu, C.H., Kluk, M., Chae, S.S., Wu, M.T.: Sphingosine-1-phosphate signaling via the EDG-1 family of G-protein-coupled receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences* **905**, 16–24 (2000)
134. Spiegel, S., Milstien, S.: Functions of a new family of sphingosine-1-phosphate receptors. *Biochimica et biophysica acta* **1484**(2-3), 107–116 (2000)
135. Chun, J., Goetzl, E.J., Hla, T., Igarashi, Y., Lynch, K.R., Moolenaar, W., Pyne, S., Tigyi, G.: International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacological reviews* **54**(2), 265–269 (2002)
136. Sanchez, T., Hla, T.: Structural and functional characteristics of S1P receptors. *Journal of cellular biochemistry* **92**(5), 913–922 (2004). doi: 10.1002/jcb.20127
137. Mitra, P., Oskeritzian, C.A., Payne, S.G., Beaven, M.A., Milstien, S., Spiegel, S.: Role of ABCC1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(44), 16394–16399 (2006). doi: 10.1073/pnas.0603734103

138. Hla, T., Lee, M.J., Ancellin, N., Liu, C.H., Thangada, S., Thompson, B.D., Kluk, M.: Sphingosine-1-phosphate: extracellular mediator or intracellular second messenger? *Biochemical pharmacology* **58**(2), 201–207 (1999)
139. Strub, G.M., Maceyka, M., Hait, N.C., Milstien, S., Spiegel, S.: Extracellular and intracellular actions of sphingosine-1-phosphate. *Advances in experimental medicine and biology* **688**, 141–155 (2010)
140. Ghosh, T.K., Bian, J., Gill, D.L.: Intracellular calcium release mediated by sphingosine derivatives generated in cells. *Science (New York, N.Y.)* **248**(4963), 1653–1656 (1990)
141. Ghosh, T.K., Bian, J., Gill, D.L.: Sphingosine 1-phosphate generated in the endoplasmic reticulum membrane activates release of stored calcium. *The Journal of biological chemistry* **269**(36), 22628–22635 (1994)
142. Mattie, M., Brooker, G., Spiegel, S.: Sphingosine-1-phosphate, a putative second messenger, mobilizes calcium from internal stores via an inositol trisphosphate-independent pathway. *The Journal of biological chemistry* **269**(5), 3181–3188 (1994)
143. Pyne, S., Pyne, N.: Sphingosine 1-phosphate signalling via the endothelial differentiation gene family of G-protein-coupled receptors. *Pharmacology & therapeutics* **88**(2), 115–131 (2000)
144. Lee, M.J., Evans, M., Hla, T.: The inducible G protein-coupled receptor *edg-1* signals via the G(i)/mitogen-activated protein kinase pathway. *The Journal of biological chemistry* **271**(19), 11272–11279 (1996)
145. Windh, R.T., Lee, M.J., Hla, T., An, S., Barr, A.J., Manning, D.R.: Differential coupling of the sphingosine 1-phosphate receptors *Edg-1*, *Edg-3*, and *H218/Edg-5* to the G(i), G(q), and G(12) families of heterotrimeric G proteins. *The Journal of biological chemistry* **274**(39), 27351–27358 (1999)
146. Im, D.S., Heise, C.E., Ancellin, N., O'Dowd, B.F., Shei, G.J., Heavens, R.P., Rigby, M.R., Hla, T., Mandala, S., McAllister, G., George, S.R., Lynch, K.R.: Characterization of a novel sphingosine 1-phosphate receptor, *Edg-8*. *The Journal of biological chemistry* **275**(19), 14281–14286 (2000)
147. Yamazaki, Y., Kon, J., Sato, K., Tomura, H., Sato, M., Yoneya, T., Okazaki, H., Okajima, F., Ohta, H.: *Edg-6* as a putative sphingosine 1-phosphate receptor coupling to Ca(2+) signaling pathway. *Biochemical and biophysical research communications* **268**(2), 583–589 (2000). doi: 10.1006/bbrc.2000.2162
148. Ishii, I., Ye, X., Friedman, B., Kawamura, S., Contos, J.J.A., Kingsbury, M.A., Yang, A.H., Zhang, G., Brown, J.H., Chun, J.: Marked perinatal lethality and cellular signaling deficits in mice null for the two sphingosine 1-phosphate (S1P) receptors, S1P(2)/LP(B2)/EDG-5 and S1P(3)/LP(B3)/EDG-3. *The Journal of biological chemistry* **277**(28), 25152–25159 (2002). doi: 10.1074/jbc.M200137200

149. Siehler, S., Manning, D.R.: Pathways of transduction engaged by sphingosine 1-phosphate through G protein-coupled receptors. *Biochimica et biophysica acta* **1582**(1-3), 94–99 (2002)
150. An, S., Bleu, T., Zheng, Y.: Transduction of intracellular calcium signals through G protein-mediated activation of phospholipase C by recombinant sphingosine 1-phosphate receptors. *Molecular pharmacology* **55**(5), 787–794 (1999)
151. Okamoto, H., Takuwa, N., Yatomi, Y., Gonda, K., Shigematsu, H., Takuwa, Y.: EDG3 is a functional receptor specific for sphingosine 1-phosphate and sphingosylphosphorylcholine with signaling characteristics distinct from EDG1 and AGR16. *Biochemical and biophysical research communications* **260**(1), 203–208 (1999). doi: 10.1006/bbrc.1999.0886
152. Kon, J., Sato, K., Watanabe, T., Tomura, H., Kuwabara, A., Kimura, T., Tamama, K., Ishizuka, T., Murata, N., Kanda, T., Kobayashi, I., Ohta, H., Ui, M., Okajima, F.: Comparison of intrinsic activities of the putative sphingosine 1-phosphate receptor subtypes to regulate several signaling pathways in their cDNA-transfected Chinese hamster ovary cells. *The Journal of biological chemistry* **274**(34), 23940–23947 (1999)
153. Okamoto, H., Takuwa, N., Gonda, K., Okazaki, H., Chang, K., Yatomi, Y., Shigematsu, H., Takuwa, Y.: EDG1 is a functional sphingosine-1-phosphate receptor that is linked via a Gi/o to multiple signaling pathways, including phospholipase C activation, Ca<sup>2+</sup> mobilization, Ras-mitogen-activated protein kinase activation, and adenylate cyclase inhibition. *The Journal of biological chemistry* **273**(42), 27104–27110 (1998)
154. Zondag, G.C., Postma, F.R., Etten, I.V., Verlaan, I., Moolenaar, W.H.: Sphingosine 1-phosphate signalling through the G-protein-coupled receptor Edg-1. *The Biochemical journal* **330** (Pt 2), 605–609 (1998)
155. Crespo, P., Xu, N., Simonds, W.F., Gutkind, J.S.: Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. *Nature* **369**(6479), 418–420 (1994). doi: 10.1038/369418a0
156. Stephens, L., Smrcka, A., Cooke, F.T., Jackson, T.R., Sternweis, P.C., Hawkins, P.T.: A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein beta gamma subunits. *Cell* **77**(1), 83–93 (1994)
157. Wu, J., Spiegel, S., Sturgill, T.W.: Sphingosine 1-phosphate rapidly activates the mitogen-activated protein kinase pathway by a G protein-dependent mechanism. *The Journal of biological chemistry* **270**(19), 11484–11488 (1995)
158. Pyne, S., Pyne, N.J.: The differential regulation of cyclic AMP by sphingomyelin-derived lipids and the modulation of sphingolipid-stimulated extracellular signal regulated kinase-2 in airway smooth muscle. *The Biochemical journal* **315** (Pt 3), 917–923 (1996)

159. Safarian, F., Khallaghi, B., Ahmadiani, A., Dargahi, L.: Activation of S1P<sub>1</sub> receptor regulates PI3K/Akt/FoxO3a pathway in response to oxidative stress in PC12 cells. *Journal of molecular neuroscience* : MN **56**(1), 177–187 (2015). doi: 10.1007/s12031-014-0478-1
160. Takuwa, Y.: Subtype-specific differential regulation of Rho family G proteins and cell migration by the Edg family sphingosine-1-phosphate receptors. *Biochimica et biophysica acta* **1582**(1-3), 112–120 (2002)
161. Lepley, D., Paik, J.-H., Hla, T., Ferrer, F.: The G protein-coupled receptor S1P2 regulates Rho/Rho kinase pathway to inhibit tumor cell migration. *Cancer research* **65**(9), 3788–3795 (2005). doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2311
162. Sobel, K., Monnier, L., Menyhart, K., Bolinger, M., Studer, R., Nayler, O., Gatfield, J.: FTY720 Phosphate Activates Sphingosine-1-Phosphate Receptor 2 and Selectively Couples to G $\alpha$ 12/13/Rho/ROCK to Induce Myofibroblast Contraction. *Molecular pharmacology* **87**(6), 916–927 (2015). doi: 10.1124/mol.114.097261
163. Aarthi, J.J., Darendeliler, M.A., Pushparaj, P.N.: Dissecting the role of the S1P/S1PR axis in health and disease. *Journal of dental research* **90**(7), 841–854 (2011). doi: 10.1177/0022034510389178
164. Daum, G., Grabski, A., Reidy, M.A.: Sphingosine 1-phosphate: a regulator of arterial lesions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **29**(10), 1439–1443 (2009). doi: 10.1161/ATVBAHA.108.175240
165. Keul, P., Tölle, M., Lucke, S., Wnuck Lipinski, K. von, Heusch, G., Schuchardt, M., van der Giet, M., Levkau, B.: The sphingosine-1-phosphate analogue FTY720 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **27**(3), 607–613 (2007). doi: 10.1161/01.ATV.0000254679.42583.88
166. Nofer, J.-R., Bot, M., Brodde, M., Taylor, P.J., Salm, P., Brinkmann, V., van Berkel, T., Assmann, G., Biessen, E.A.L.: FTY720, a synthetic sphingosine 1 phosphate analogue, inhibits development of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* **115**(4), 501–508 (2007). doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.641407
167. Nofer, J.-R., van der Giet, M., Tölle, M., Wolinska, I., Wnuck Lipinski, K. von, Baba, H.A., Tietge, U.J., Gödecke, A., Ishii, I., Kleuser, B., Schäfers, M., Fobker, M., Zidek, W., Assmann, G., Chun, J., Levkau, B.: HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *The Journal of clinical investigation* **113**(4), 569–581 (2004). doi: 10.1172/JCI18004
168. Siess, W.: Athero- and thrombogenic actions of lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate. *Biochimica et biophysica acta* **1582**(1-3), 204–215 (2002)
169. Lee, H., Lin, C.I., Liao, J.-J., Lee, Y.-W., Yang, H.Y., Lee, C.-Y., Hsu, H.-Y., Wu, H.L.: Lysophospholipids increase ICAM-1 expression in HUVEC through a Gi- and NF-kappaB-

- dependent mechanism. *American journal of physiology. Cell physiology* **287**(6), C1657-66 (2004). doi: 10.1152/ajpcell.00172.2004
170. Lin, C.-I., Chen, C.-N., Lin, P.-W., Lee, H.: Sphingosine 1-phosphate regulates inflammation-related genes in human endothelial cells through S1P1 and S1P3. *Biochemical and biophysical research communications* **355**(4), 895–901 (2007). doi: 10.1016/j.bbrc.2007.02.043
171. Oyama, O., Sugimoto, N., Qi, X., Takuwa, N., Mizugishi, K., Koizumi, J., Takuwa, Y.: The lysophospholipid mediator sphingosine-1-phosphate promotes angiogenesis in vivo in ischaemic hindlimbs of mice. *Cardiovascular research* **78**(2), 301–307 (2008). doi: 10.1093/cvr/cvn002
172. Liu, Y., Wada, R., Yamashita, T., Mi, Y., Deng, C.X., Hobson, J.P., Rosenfeldt, H.M., Nava, V.E., Chae, S.S., Lee, M.J., Liu, C.H., Hla, T., Spiegel, S., Proia, R.L.: Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *The Journal of clinical investigation* **106**(8), 951–961 (2000). doi: 10.1172/JCI10905
173. Allende, M.L., Yamashita, T., Proia, R.L.: G-protein-coupled receptor S1P1 acts within endothelial cells to regulate vascular maturation. *Blood* **102**(10), 3665–3667 (2003). doi: 10.1182/blood-2003-02-0460
174. Hemmings, D.G.: Signal transduction underlying the vascular effects of sphingosine 1-phosphate and sphingosylphosphorylcholine. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **373**(1), 18–29 (2006). doi: 10.1007/s00210-006-0046-5
175. Levkau, B.: Sphingosine-1-phosphate in the regulation of vascular tone: a finely tuned integration system of S1P sources, receptors, and vascular responsiveness. *Circulation research* **103**(3), 231–233 (2008). doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.181610
176. Hsiao, S.-H., Constable, P.D., Smith, G.W., Haschek, W.M.: Effects of exogenous sphinganine, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate on relaxation and contraction of porcine thoracic aortic and pulmonary arterial rings. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **86**(1), 194–199 (2005). doi: 10.1093/toxsci/kfi167
177. Thomas, G.D., Snetkov, V.A., Patel, R., Leach, R.M., Aaronson, P.I., Ward, J.P.T.: Sphingosylphosphorylcholine-induced vasoconstriction of pulmonary artery: activation of non-store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Cardiovascular research* **68**(1), 56–64 (2005). doi: 10.1016/j.cardiores.2005.05.013
178. Lee, M.J., Thangada, S., Claffey, K.P., Ancellin, N., Liu, C.H., Kluk, M., Volpi, M., Sha'afi, R.I., Hla, T.: Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* **99**(3), 301–312 (1999)
179. Garcia, J.G., Liu, F., Verin, A.D., Birukova, A., Dechert, M.A., Gerthoffer, W.T., Bamberg, J.R., English, D.: Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by

- Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *The Journal of clinical investigation* **108**(5), 689–701 (2001). doi: 10.1172/JC112450
180. Schaphorst, K.L., Chiang, E., Jacobs, K.N., Zaiman, A., Natarajan, V., Wigley, F., Garcia, J.G.N.: Role of sphingosine-1 phosphate in the enhancement of endothelial barrier integrity by platelet-released products. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **285**(1), L258-67 (2003). doi: 10.1152/ajplung.00311.2002
181. Wang, F., van Brocklyn, J.R., Hobson, J.P., Movafagh, S., Zukowska-Grojec, Z., Milstien, S., Spiegel, S.: Sphingosine 1-phosphate stimulates cell migration through a G(i)-coupled cell surface receptor. Potential involvement in angiogenesis. *The Journal of biological chemistry* **274**(50), 35343–35350 (1999)
182. Kimura, T., Watanabe, T., Sato, K., Kon, J., Tomura, H., Tamama, K., Kuwabara, A., Kanda, T., Kobayashi, I., Ohta, H., Ui, M., Okajima, F.: Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of human endothelial cells possibly through the lipid receptors, Edg-1 and Edg-3. *The Biochemical journal* **348 Pt 1**, 71–76 (2000)
183. Kluk, M.J., Hla, T.: Role of the sphingosine 1-phosphate receptor EDG-1 in vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Circulation research* **89**(6), 496–502 (2001)
184. Tanimoto, T., Lungu, A.O., Berk, B.C.: Sphingosine 1-phosphate transactivates the platelet-derived growth factor beta receptor and epidermal growth factor receptor in vascular smooth muscle cells. *Circulation research* **94**(8), 1050–1058 (2004). doi: 10.1161/01.RES.0000126404.41421.BE
185. Shimizu, T., Nakazawa, T., Cho, A., Dastvan, F., Shilling, D., Daum, G., Reidy, M.A.: Sphingosine 1-phosphate receptor 2 negatively regulates neointimal formation in mouse arteries. *Circulation research* **101**(10), 995–1000 (2007). doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.159228
186. Shimizu, T., Wispelaere, A. de, Winkler, M., D'Souza, T., Caylor, J., Chen, L., Dastvan, F., Deou, J., Cho, A., Larena-Avellaneda, A., Reidy, M., Daum, G.: Sphingosine-1-phosphate receptor 3 promotes neointimal hyperplasia in mouse iliac-femoral arteries. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **32**(4), 955–961 (2012). doi: 10.1161/ATVBAHA.111.241034
187. Schwab, S.R., Pereira, J.P., Matloubian, M., Xu, Y., Huang, Y., Cyster, J.G.: Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. *Science (New York, N.Y.)* **309**(5741), 1735–1739 (2005). doi: 10.1126/science.11113640
188. Pappu, R., Schwab, S.R., Cornelissen, I., Pereira, J.P., Regard, J.B., Xu, Y., Camerer, E., Zheng, Y.-W., Huang, Y., Cyster, J.G., Coughlin, S.R.: Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science (New York, N.Y.)* **316**(5822), 295–298 (2007). doi: 10.1126/science.1139221

189. Cyster, J.G., Schwab, S.R.: Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annual review of immunology* **30**, 69–94 (2012). doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075011
190. Halin, C., Scimone, M.L., Bonasio, R., Gauguet, J.-M., Mempel, T.R., Quackenbush, E., Proia, R.L., Mandala, S., Andrian, U.H. von: The S1P-analog FTY720 differentially modulates T-cell homing via HEV: T-cell-expressed S1P1 amplifies integrin activation in peripheral lymph nodes but not in Peyer patches. *Blood* **106**(4), 1314–1322 (2005). doi: 10.1182/blood-2004-09-3687
191. Pabst, O., Herbrand, H., Willenzon, S., Worbs, T., Schippers, A., Müller, W., Bernhardt, G., Förster, R.: Enhanced FTY720-mediated lymphocyte homing requires G alpha i signaling and depends on beta 2 and beta 7 integrin. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **176**(3), 1474–1480 (2006)
192. Rauch, B.H.: Sphingosine 1-phosphate as a link between blood coagulation and inflammation. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **34**(1), 185–196 (2014). doi: 10.1159/000362994
193. Mahajan-Thakur, S., Böhm, A., Jedlitschky, G., Schrör, K., Rauch, B.H.: Sphingosine-1-Phosphate and Its Receptors: A Mutual Link between Blood Coagulation and Inflammation. *Mediators of inflammation* **2015**, 831059 (2015). doi: 10.1155/2015/831059
194. DiVito, C., Hadi, L.A., Navone, S.E., Marfia, G., Campanella, R., Mancuso, M.E., Riboni, L.: Platelet-derived sphingosine-1-phosphate and inflammation: from basic mechanisms to clinical implications. *Platelets*, 1–9 (2016). doi: 10.3109/09537104.2016.1144179
195. Xu, C.-b., Hansen-Schwartz, J., Edvinsson, L.: Sphingosine signaling and atherogenesis. *Acta pharmacologica Sinica* **25**(7), 849–854 (2004)
196. Argraves, K.M., Sethi, A.A., Gazzolo, P.J., Wilkerson, B.A., Remaley, A.T., Tybjaerg-Hansen, A., Nordestgaard, B.G., Yeatts, S.D., Nicholas, K.S., Barth, J.L., Argraves, W.S.: S1P, dihydro-S1P and C24:1-ceramide levels in the HDL-containing fraction of serum inversely correlate with occurrence of ischemic heart disease. *Lipids in health and disease* **10**, 70 (2011). doi: 10.1186/1476-511X-10-70
197. Levkau, B.: HDL-S1P: cardiovascular functions, disease-associated alterations, and therapeutic applications. *Frontiers in pharmacology* **6**, 243 (2015). doi: 10.3389/fphar.2015.00243
198. Sattler, K., Gräler, M., Keul, P., Weske, S., Reimann, C.-M., Jindrová, H., Kleinbongard, P., Sabbadini, R., Bröcker-Preuss, M., Erbel, R., Heusch, G., Levkau, B.: Defects of High-Density Lipoproteins in Coronary Artery Disease Caused by Low Sphingosine-1-Phosphate Content: Correction by Sphingosine-1-Phosphate-Loading. *Journal of the*

- American College of Cardiology **66**(13), 1470–1485 (2015). doi: 10.1016/j.jacc.2015.07.057
199. Rodríguez, C., González-Díez, M., Badimon, L., Martínez-González, J.: Sphingosine-1-phosphate: A bioactive lipid that confers high-density lipoprotein with vasculoprotection mediated by nitric oxide and prostacyclin. *Thrombosis and haemostasis* **101**(4), 665–673 (2009)
200. Egom, E.E., Mamas, M.A., Chacko, S., Stringer, S.E., Charlton-Menys, V., El-Omar, M., Chirico, D., Clarke, B., Neyses, L., Cruickshank, J.K., Lei, M., Fath-Ordoubadi, F.: Serum sphingolipids level as a novel potential marker for early detection of human myocardial ischaemic injury. *Frontiers in physiology* **4**, 130 (2013). doi: 10.3389/fphys.2013.00130
201. Zhang, F., Xia, Y., Yan, W., Zhang, H., Zhou, F., Zhao, S., Wang, W., Di Zhu, Xin, C., Lee, Y., Zhang, L., He, Y., Gao, E., Tao, L.: Sphingosine 1-phosphate signaling contributes to cardiac inflammation, dysfunction, and remodeling following myocardial infarction. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **310**(2), H250-61 (2016). doi: 10.1152/ajpheart.00372.2015
202. Knapp, M., Baranowski, M., Czarnowski, D., Lisowska, A., Zabielski, P., Górski, J., Musiał, W.: Plasma sphingosine-1-phosphate concentration is reduced in patients with myocardial infarction. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* **15**(9), CR490-3 (2009)
203. Sutter, I., Klingenberg, R., Othman, A., Rohrer, L., Landmesser, U., Heg, D., Rodondi, N., Mach, F., Windecker, S., Matter, C.M., Lüscher, T.F., Eckardstein, A. von, Hornemann, T.: Decreased phosphatidylcholine plasmalogens - A putative novel lipid signature in patients with stable coronary artery disease and acute myocardial infarction. *Atherosclerosis* **246**, 130–140 (2016). doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.01.003
204. Jing, X.-D., Wei, X.-M., Deng, S.-B., Du, J.-L., Liu, Y.-J., She, Q.: The relationship between the high-density lipoprotein (HDL)-associated sphingosine-1-phosphate (S1P) and coronary in-stent restenosis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **446**, 248–252 (2015). doi: 10.1016/j.cca.2015.04.038
205. Polzin, A., Rassaf, T., Böhm, A., Lüth, A., Kleuser, B., Zeus, T., Kelm, M., Kroemer, H.K., Schrör, K., Rauch, B.H.: Aspirin inhibits release of platelet-derived sphingosine-1-phosphate in acute myocardial infarction. *International journal of cardiology* **170**(2), e23-4 (2013). doi: 10.1016/j.ijcard.2013.10.050
206. Mann, D.L.: Sphingosine 1-phosphate as a therapeutic target in heart failure: more questions than answers. *Circulation* **125**(22), 2692–2694 (2012). doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.107797
207. Meissner, A., Yang, J., Kroetsch, J.T., Sauv e, M., Dax, H., Momen, A., Noyan-Ashraf, M.H., Heximer, S., Husain, M., Lidington, D., Bolz, S.-S.: Tumor necrosis factor- $\alpha$

- mediated downregulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator drives pathological sphingosine-1-phosphate signaling in a mouse model of heart failure. *Circulation* **125**(22), 2739–2750 (2012). doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.047316
208. Knapp, M., Baranowski, M., Lisowska, A., Musiał, W.: Decreased free sphingoid base concentration in the plasma of patients with chronic systolic heart failure. *Advances in medical sciences* **57**(1), 100–105 (2012). doi: 10.2478/v10039-011-0057-4
209. Szczepaniak, W.S., Pitt, B.R., McVerry, B.J.: S1P2 receptor-dependent Rho-kinase activation mediates vasoconstriction in the murine pulmonary circulation induced by sphingosine 1-phosphate. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **299**(1), L137-45 (2010). doi: 10.1152/ajplung.00233.2009
210. Ota, H., Beutz, M.A., Ito, M., Abe, K., Oka, M., McMurtry, I.F.: S1P(4) receptor mediates S1P-induced vasoconstriction in normotensive and hypertensive rat lungs. *Pulmonary circulation* **1**(3), 399–404 (2011). doi: 10.4103/2045-8932.87309
211. Machida, T., Hamaya, Y., Izumi, S., Hamaya, Y., Iizuka, K., Igarashi, Y., Minami, M., Levi, R., Hirafuji, M.: Sphingosine 1-phosphate inhibits nitric oxide production induced by interleukin-1beta in rat vascular smooth muscle cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **325**(1), 200–209 (2008). doi: 10.1124/jpet.107.127290
212. Wamhoff, B.R., Lynch, K.R., Macdonald, T.L., Owens, G.K.: Sphingosine-1-phosphate receptor subtypes differentially regulate smooth muscle cell phenotype. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **28**(8), 1454–1461 (2008). doi: 10.1161/ATVBAHA.107.159392
213. Yun, J.K., Kester, M.: Regulatory role of sphingomyelin metabolites in hypoxia-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *Archives of biochemistry and biophysics* **408**(1), 78–86 (2002)
214. Ahmad, M., Long, J.S., Pyne, N.J., Pyne, S.: The effect of hypoxia on lipid phosphate receptor and sphingosine kinase expression and mitogen-activated protein kinase signaling in human pulmonary smooth muscle cells. *Prostaglandins & other lipid mediators* **79**(3-4), 278–286 (2006). doi: 10.1016/j.prostaglandins.2006.03.001
215. Chen, J., Tang, H., Sysol, J.R., Moreno-Vinasco, L., Shioura, K.M., Chen, T., Gorshkova, I., Wang, L., Huang, L.S., Usatyuk, P.V., Sammani, S., Zhou, G., Raj, J.U., Garcia, J.G.N., Berdyshev, E., Yuan, J.X.-J., Natarajan, V., Machado, R.F.: The sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate pathway in pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* **190**(9), 1032–1043 (2014). doi: 10.1164/rccm.201401-0121OC
216. Zhao, Y.D., Chu, L., Lin, K., Granton, E., Yin, L., Peng, J., Hsin, M., Wu, L., Yu, A., Waddell, T., Keshavjee, S., Granton, J., Perrot, M. de: A Biochemical Approach to Understand the Pathogenesis of Advanced Pulmonary Arterial Hypertension:

- Metabolomic Profiles of Arginine, Sphingosine-1-Phosphate, and Heme of Human Lung. *PloS one* **10**(8), e0134958 (2015). doi: 10.1371/journal.pone.0134958
217. Xing, X.-Q., Li, Y.-L., Zhang, Y.-X., Xiao, Y., Li, Z.-D., Liu, L.-Q., Zhou, Y.-S., Zhang, H.-Y., Liu, Y.-H., Zhang, L.-H., Zhuang, M., Chen, Y.-P., Ouyang, S.-R., Wu, X.-W., Yang, J.: Sphingosine kinase 1/sphingosine 1-phosphate signalling pathway as a potential therapeutic target of pulmonary hypertension. *International journal of clinical and experimental medicine* **8**(8), 11930–11935 (2015)
218. Maceyka, M., Milstien, S., Spiegel, S.: Shooting the messenger: oxidative stress regulates sphingosine-1-phosphate. *Circulation research* **100**(1), 7–9 (2007). doi: 10.1161/01.RES.0000255895.19868.a3
219. Tsikas, D., Schwedhelm, E., Fauler, J., Gutzki, F.M., Mayatepek, E., Frölich, J.C.: Specific and rapid quantification of 8-iso-prostaglandin F2alpha in urine of healthy humans and patients with Zellweger syndrome by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications* **716**(1-2), 7–17 (1998)
220. Schwedhelm, E., Tsikas, D., Durand, T., Gutzki, F.M., Guy, A., Rossi, J.C., Frölich, J.C.: Tandem mass spectrometric quantification of 8-iso-prostaglandin F2alpha and its metabolite 2,3-dinor-5,6-dihydro-8-iso-prostaglandin F2alpha in human urine. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications* **744**(1), 99–112 (2000)
221. Mullis, K.B., Faloona, F.A.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology* **155**, 335–350 (1987)
222. Spiegelman, S., Watson, K.F., Kacian, D.L.: Synthesis of DNA complements of natural RNAs: a general approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **68**(11), 2843–2845 (1971)
223. Livak, K.J., Schmittgen, T.D.: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods (San Diego, Calif.)* **25**(4), 402–408 (2001). doi: 10.1006/meth.2001.1262
224. Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248–254 (1976)
225. Compton, S.J., Jones, C.G.: Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical biochemistry* **151**(2), 369–374 (1985)
226. Schlaeger, T.M., Qin, Y., Fujiwara, Y., Magram, J., Sato, T.N.: Vascular endothelial cell lineage-specific promoter in transgenic mice. *Development (Cambridge, England)* **121**(4), 1089–1098 (1995)

227. Gossen, M., Bujard, H.: Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**(12), 5547–5551 (1992)
228. Pecha, S., Mudersbach, E., Sohren, K.D., Hakmi, S., Reichenspurner, H., Eschenhagen, T., Christ, T.: Prostaglandin E2 does not attenuate adrenergic-induced cardiac contractile response. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **387**(10), 963–968 (2014). doi: 10.1007/s00210-014-1012-2
229. Baez, S.: An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. *Microvascular research* **5**(3), 384–394 (1973)
230. Kregel, J.H., Hodgjin, J.B., Hagaman, JR, Smithies, O.: A noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice. *Hypertension* **25**(5), 1111–1115 (1995)
231. Diebold, I., Petry, A., Hess, J., Görlach, A.: The NADPH oxidase subunit NOX4 is a new target gene of the hypoxia-inducible factor-1. *Molecular biology of the cell* **21**(12), 2087–2096 (2010). doi: 10.1091/mbc.E09-12-1003
232. Rzymiski, T., Petry, A., Kračun, D., Rieß, F., Pike, L., Harris, A.L., Görlach, A.: The unfolded protein response controls induction and activation of ADAM17/TACE by severe hypoxia and ER stress. *Oncogene* **31**(31), 3621–3634 (2012). doi: 10.1038/onc.2011.522
233. Kastenmüller, G., Römisch-Margl, W., Wägele, B., Altmaier, E., Suhre, K.: metaP-server: a web-based metabolomics data analysis tool. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2011** (2011). doi: 10.1155/2011/839862
234. Körbelin, J., Sieber, T., Michelfelder, S., Lunding, L., Spies, E., Hunger, A., Alawi, M., Rapti, K., Indenbirken, D., Müller, O.J., Pasqualini, R., Arap, W., Kleinschmidt, J.A., Trepel, M.: Pulmonary targeting of adeno-associated viral vectors by next-generation sequencing-guided screening of random capsid displayed peptide libraries. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* (2016). doi: 10.1038/mt.2016.62
235. Winkler, M.S., Nierhaus, A., Holzmann, M., Mudersbach, E., Bauer, A., Robbe, L., Zahrte, C., Geffken, M., Peine, S., Schwedhelm, E., Daum, G., Kluge, S., Zoellner, C.: Decreased serum concentrations of sphingosine-1-phosphate in sepsis. *Critical care (London, England)* **19**, 372 (2015). doi: 10.1186/s13054-015-1089-0
236. Baker, M.: Reproducibility crisis: Blame it on the antibodies. *Nature* **521**(7552), 274–276 (2015). doi: 10.1038/521274a
237. Fukunaga, M., Takahashi, K., Badr, K.F.: Vascular smooth muscle actions and receptor interactions of 8-iso-prostaglandin E2, an E2-isoprostane. *Biochemical and biophysical research communications* **195**(2), 507–515 (1993). doi: 10.1006/bbrc.1993.2075
238. van den Branden, C., Roels, F.: Thioridazine: a selective inhibitor of peroxisomal beta-oxidation in vivo. *FEBS letters* **187**(2), 331–333 (1985)

239. Shi, R., Zhang, Y., Shi, Y., Shi, S., Jiang, L.: Inhibition of peroxisomal  $\beta$ -oxidation by thioridazine increases the amount of VLCFAs and A $\beta$  generation in the rat brain. *Neuroscience letters* **528**(1), 6–10 (2012). doi: 10.1016/j.neulet.2012.08.086
240. Xiao, C.Y., Hara, A., Yuhki, K., Fujino, T., Ma, H., Okada, Y., Takahata, O., Yamada, T., Murata, T., Narumiya, S., Ushikubi, F.: Roles of prostaglandin I(2) and thromboxane A(2) in cardiac ischemia-reperfusion injury: a study using mice lacking their respective receptors. *Circulation* **104**(18), 2210–2215 (2001)
241. Richter, M., Iwata, A., Nyhuis, J., Nitta, Y., Miller, A.D., Halbert, C.L., Allen, M.D.: Adeno-associated virus vector transduction of vascular smooth muscle cells in vivo. *Physiological genomics* **2**(3), 117–127 (2000)
242. Penttilä, I., Penttilä, K., Rantanen, T.: Laboratory diagnosis of patients with acute chest pain. *Clinical chemistry and laboratory medicine* **38**(3), 187–197 (2000). doi: 10.1515/CCLM.2000.027
243. Wang, J.A., Qin, Y., Lv, J., Tian, Y.F., Dong, Y.J.: Clinical application of high-sensitivity cardiac troponin T test in acute myocardial infarction diagnosis. *Genetics and molecular research : GMR* **14**(4), 17959–17965 (2015). doi: 10.4238/2015.December.22.21
244. Lloyd-Jones, D.M., Camargo, C.A., Giugliano, R.P., Walsh, C.R., O'Donnell, C.J.: Characteristics and prognosis of patients with suspected acute myocardial infarction and elevated MB relative index but normal total creatine kinase. *The American journal of cardiology* **84**(9), 957–962 (1999)
245. McCord, J., Nowak, R.M., Hudson, M.P., McCullough, P.A., Tomlanovich, M.C., Jacobsen, G., Tokarski, G., Khoury, N., Weaver, W.D.: The prognostic significance of serial myoglobin, troponin I, and creatine kinase-MB measurements in patients evaluated in the emergency department for acute coronary syndrome. *Annals of emergency medicine* **42**(3), 343–350 (2003). doi: 10.1067/mem.2003.284
246. Jaffery, Z., Nowak, R., Khoury, N., Tokarski, G., Lanfear, D.E., Jacobsen, G., McCord, J.: Myoglobin and troponin I elevation predict 5-year mortality in patients with undifferentiated chest pain in the emergency department. *American heart journal* **156**(5), 939–945 (2008). doi: 10.1016/j.ahj.2008.06.020
247. Aldous, S.J., Richards, M., Cullen, L., Troughton, R., Than, M.: Diagnostic and prognostic utility of early measurement with high-sensitivity troponin T assay in patients presenting with chest pain. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* **184**(5), E260-8 (2012). doi: 10.1503/cmaj.110773
248. Kharel, Y., Raje, M., Gao, M., Gellett, A.M., Tomsig, J.L., Lynch, K.R., Santos, W.L.: Sphingosine kinase type 2 inhibition elevates circulating sphingosine 1-phosphate. *The Biochemical journal* **447**(1), 149–157 (2012). doi: 10.1042/BJ20120609

249. Bode, C., Gräler, M.H.: Quantification of sphingosine-1-phosphate and related sphingolipids by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) **874**, 33–44 (2012). doi: 10.1007/978-1-61779-800-9\_3
250. Völzke, H.: Study of Health in Pomerania (SHIP). *Bundesgesundheitsbl.* **55**(6-7), 790–794 (2012). doi: 10.1007/s00103-012-1483-6
251. Maceyka, M., Harikumar, K.B., Milstien, S., Spiegel, S.: Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends in cell biology* **22**(1), 50–60 (2012). doi: 10.1016/j.tcb.2011.09.003
252. Rosen, H., Stevens, R.C., Hanson, M., Roberts, E., Oldstone, M.B.: Sphingosine-1-phosphate and its receptors: structure, signaling, and influence. *Annual review of biochemistry* **82**, 637–662 (2013). doi: 10.1146/annurev-biochem-062411-130916
253. Olivera, A., Allende, M.L., Proia, R.L.: Shaping the landscape: metabolic regulation of S1P gradients. *Biochimica et biophysica acta* **1831**(1), 193–202 (2013). doi: 10.1016/j.bbalip.2012.06.007



## 8 Anhang

### 8.1 Materialien

#### 8.1.1 Substanzen

Substanzname	Warnhinweise nach GHS (H- und P-Sätze)	Hersteller
8-iso-PGE <sub>2</sub>	H: 302, 360 P: 201, 202, 264, 281, 301+312, 308+313, 330	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
8-iso-PGF <sub>2α</sub>	H: 302, 360 P: 201, 202, 264, 280, 301+312, 308+313, 330	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
β-Mercaptoethanol	H: 301, 310, 315, 317, 318, 331, 373, 410 P: 273, 280, 302+352, 304+340, 305+351+338, 308+310	Merck KGaA, Darmstadt
Acetonitril (AcN)	H: 225, 332, 302, 312, 319 P: 210, 305+351+338, 403+235	Merck KGaA, Darmstadt
Agarose, Ultrapure™		Invitrogen, Karlsruhe
Ameisensäure	H: 226, 302, 314, 331 P: 210, 280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338, 403+233	Fluka Chemie, Steinheim
Ammoniumpersulfat (APS)	H: 272, 302, 315, 319, 335, 334, 317 P: 280, 305+351+338, 302+352, 304+341, 342+311	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Aqua ad injectabilia		Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Betaisodona®-Lösung (Povidon-Iod)		Mundipharma GmbH, Limburg (Lahn)
bis-Acrylamid-Lösung 40%	H: 350, 340, 361f, 301, 372, 332, 312, 319, 315, 317 P: 201, 280, 301+310, 305+351+338, 308+313	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bradford-Reagenz, Bio-Rad Protein Assay	H: 226, 332, 314, 318, 370 P: 210, 303+361+353, 305+351+338, 310, 405, 501	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bromphenolblau		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
BSTFA (N,O-Bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid)	H: 226, 314 P: 280, 305+351+338, 310	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
C17-S1P	H: 315, 319, 335 P: 261, 305+351+338	Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama
Calciumchlorid x 2 H <sub>2</sub> O	H: 319 P: 305+351+338	Merck KGaA, Darmstadt
Chloroform (≥99%)	H: 302, 315, 351, 373 P: 302+352, 314	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Cutasept®		Bode Chemie, Hamburg
D(+)-Glucose x H <sub>2</sub> O		Merck KGaA, Darmstadt
Essigsäure (100%)	H: 226, 314 P: 280, 301+330+331, 307+310, 305+351+338	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol (≥99,9%)	H: 225 P: 210	Merck KGaA, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FCS)		Invitrogen, Karlsruhe
Firefly-D-Luciferin	H: 320 P: 261, 262	PerkinElmer, Waltham, Massachusetts

Formaldehydlösung 4%	H: 302, 317, 341, 350 P: 201, 280, 302 + 352, 308 + 313	Merck KGaA, Darmstadt
GeneRuler 1kb DNA Ladder, inkl. 6xDNA Loading Dye		Thermo Scientific GmbH, Schwerte
Glycerol		Merck KGaA, Darmstadt
Glycin		Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
HBSS		Invitrogen, Karlsruhe
Hünigbase (N,N- Diisopropylethylamin)	H: 225, 302, 318, 331, 335 P: 210, 261, 280, 304+340+312, 305+351+338+310, 403+233	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Indomethacin	H: 300 P: 264, 301+310	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Isopropanol (≥99,8%)	H: 225, 319, 336 P: 210, 261, 305+351+338	Merck KGaA, Darmstadt
Isot. Kochsalzlösung, 0,9%		B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Kaliumchlorid		Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogen- phosphat		Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumsulfat x 7 H <sub>2</sub> O		Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	H: 225, 331, 311, 301, 370 P: 210, 233, 280, 302+352	Merck KGaA, Darmstadt
Milchpulver		Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Natriumchlorid		J.T. Baker Deutschland, Griesheim
Natriumdodecylsulfat (SDS Pellets)	H: 228, 311, 302, 335, 315, 319 P: 210, 280, 304+340, 305+351+338, 309+310	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe

Natriumhydrogencarbonat		Merck KGaA, Darmstadt
PBS, Dulbecco, 1x Lösung (+Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> )		Invitrogen, Karlsruhe
<i>Peroxidase Chromogen/ Substrate Solution</i>		Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan
PFB (2,3,4,5,6- Pentafluorobenzyl)-Bromid	H: 314 P: 280, 305+351+338, 310	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
PGE <sub>2</sub>	H: 302, 360 P: 201, 202, 264, 280, 301+312, 308+313, 330	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
PGF <sub>2α</sub>	H: 302, 360 P: 201, 202, 264, 280, 301+312, 308+313, 330	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Ponceau S	H: 315, 319, 335 P: 261, 305+351+338	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Precision Plus Protein Standard		Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten (Sigmafast®)	H: 314 P: 280, 305+351+338, 310	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
RNAzol® B	H: 301, 311, 314 P: 302+352	WAK-Chemie Medical, Steinbach/Ts.
Roti®-GelStain		Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
S1P	H: 315, 319, 335 P: 261, 305+351+338	Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama
S1P-d7	H: 315, 319, 335 P: 261, 305+351+338	Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama
Sigmacote®	H: 225, 304, 315, 319, 336, 410 P: 210, 261, 273, 301, 305+351+338, 331	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
TEMED	H: 225, 332, 302, 314 P: 210, 233, 280, 301+330+331, 305+351+338, 309+310	Merck KgaA, Darmstadt

Tris/Trizma® Base	H: 315, 319, 335 P: 261, 305+351+338	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Triton X-100	H: 302, 319, 411 P: 273, 280, 301+312+330, 337+313, 391, 501	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Tween 20		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
U-46619	H: 225, 316, 319, 336 P: 210, 280, 264, 261, 303+361+353, 332+313, 305+351+338, 337+313, 309+311, 304+340	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Wasser für HPLC		Merck KgaA, Darmstadt

### 8.1.2 Primer, Antikörper, AAV-Vektor

Produktbezeichnung	Katalog-Nr./Sequenz	Hersteller
<b>Primer</b>		
Forward ML136	aagcctggggttcagggacctg	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
Reverse ML139	actttgttcagacaccacctgtc	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
Reverse Neo2	tgatattgctgaagagcttgccggc gaa	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
Forward TBXA2R F	gtgttgctgccccttctg	Tib Molbiol, Berlin
Reverse TBXA2R Var1R/β	tgggccacagagtgagactc	Tib Molbiol, Berlin
GAPDH, murin	Mm99999915_g1	Applied Biosystems, Darmstadt
Tbxa2r, murin	Mm00436917_m1	Applied Biosystems, Darmstadt
TBXA2R, human	Hs00169054_m1	Applied Biosystems, Darmstadt

**Antikörper**

Anti-Goat IgG (HRP-konjugiert)	ab6885	abcam, Cambridge, UK
Anti-Rabbit IgG (HRP-konjugiert)	111-035-45	Jackson ImmunoResearch Laboratories West Grove, USA
Anti-Thromboxane A2 receptor antibody	ab92883	abcam, Cambridge, UK
GAPDH, FL-335	sc-25778	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas
Histofine® Simple Stain Mouse MAX PO (G)	414351F	Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan
TXA2R, T-20	sc-18377	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas

**AAV-Vektor**

AAV2-L1-CMV-LUC-2A- mTBXA2R	Dr. Jakob Körbelin, Hamburg
--------------------------------	--------------------------------

**8.1.3 Puffer und Lösungen****LC/MS-MS**

AcN 80%	80% (v/v) Acetonitril
	in Wasser für HPLC
Fließmittel A	0,1% (v/v) Ameisensäure
	in Wasser für HPLC
Fließmittel B	0,1% (v/v) Ameisensäure
	in Acetonitril/Methanol (50/50, v/v)

**Isolierung genomischer DNA***Digestion Buffer*

250 mmol/L NaCl  
0,2 % (m/v) SDS  
5 mmol/L EDTA  
100 mmol/L Tris-HCl

---

in Dest.-Wasser

Ethanol 70%

70% (v/v) Ethanol

---

in Dest.-Wasser

*Low TE Buffer*

0,5 mmol/L EDTA  
5 mmol/L Tris-HCl

---

in Dest.-Wasser

**Agarosegelelektrophorese**

Agarosegel 1%

1,0% (m/v) Agarose  
0,05‰ (v/v) Roti Stain

---

in 1x TBE

10x TBE-Puffer

0,9 M Tris  
0,89 M Borsäure  
4% (v/v) 0,5 M EDTA

---

in Dest.-Wasser

**SDS-PAGE, Western Blot, Immunodetektion**

Ponceau S-Lösung

0,1% (m/v) Ponceau S  
5% (v/v) Essigsäure

---

in Dest.-Wasser

Trenngel 10%

3,1 mL 50% Glycerin/H<sub>2</sub>O  
1,55 mL Acrylamid 40%  
1,58 mL Lower Tris-Puffer  
3 µL TEMED  
32 µL APS 10% (m/v)

Sammelgel 4%	1,285 mL Dest.-Wasser 200 µL Acrylamid 40% 0,5 mL Upper Tris-Puffer 2 µL TEMED 15 µL APS 10% (m/v)
0,2%-SDS-Puffer	0,2% (m/v) SDS 1 Tablette Proteaseinhibitor
	<hr/> ad 50 mL Dest.-Wasser
<i>Sample Buffer</i>	20% (v/v) 50% Glycerin/H <sub>2</sub> O 15% (v/v) 20% SDS 12,5% (v/v) Upper Tris-Puffer 5% (v/v) Mercaptoethanol
	<hr/> ad 10 mL Dest.-Wasser
<i>Load Mix</i>	50% (v/v) 50% Glycerin/H <sub>2</sub> O 0,05% (m/v) Bromphenolblau
	<hr/> ad 40 mL Dest.-Wasser
Lower Tris-Puffer, pH 8,8	18,17 g Tris (1,5 M) 2% (v/v) 20% SDS
	<hr/> ad 100 mL Dest.-Wasser
Upper Tris-Puffer, pH 6,8	6,06 g Tris (0,5 M) 2% (v/v) 20% SDS
	<hr/> ad 100 mL Dest.-Wasser
10x Tris-Glycin-Puffer	30 g Tris (25 mM) 144 g Glycin (0,2 M)
	<hr/> ad 1 L Dest.-Wasser

---

SDS-PAGE-Laufpuffer	10% (v/v) 10x Tris-Glycin-Puffer 0,5% (v/v) 20% SDS
	ad 1 L Dest.-Wasser
Transferpuffer	10% (v/v) 10x Tris-Glycin-Puffer 20% (v/v) Methanol
	ad 1 L Dest.-Wasser
10 x TBS, pH 7,6	24,2 g Tris (0,2 M) 80 g NaCl (1,37 M)
	ad 1 L Dest.-Wasser
TBS-Tween (TBS-T)	0,1% (v/v) Tween 20
	ad 1 L 1x TBS
Blockierlösung	5% (m/v) Milchpulver
	in TBS-T

**Vasokonstriktorische Messungen am Myographen**

Krebs-Henseleit-Puffer	118 mmol/L NaCl 4,8 mmol/L KCl 1,2 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1,2 mmol/L $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 25 mmol/L $\text{NaHCO}_3$ 2,5 mmol/L $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 11 mmol/L Glucose 10 $\mu\text{mol/L}$ Indomethacin
	in Dest.-Wasser

**Intravitalmikroskopie**

Salzlösung („Krebslösung“)

118 mmol/L NaCl  
 3,8 mmol/L KCl  
 1,2 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 1,2 mmol/L MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
 20 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>  
 2,5 mmol/L CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O

---

 in Dest.-Wasser
**Elektronenspinresonanz- Spektroskopie**

Krebs-HEPES-Puffer

99 mmol/L NaCl  
 4,7 mmol/L KCl  
 1,0 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 1,2 mmol/L MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
 25 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>  
 2,5 mmol/L CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
 5,6 mmol/L Glucose  
 20 µmol/L Na-HEPES

---

 in Dest.-Wasser
*Spin Trap*-Puffer

25 µmol/L Deferoxamin  
 5 µmol/L Diethyldithiocarbamat  
 100 µmol/L 1-Hydroxy-3-methoxy-  
 carbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin

---

 in Krebs-HEPES-Puffer
**8.1.4 Verbrauchsmaterialien und Kits**

<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<i>8-Isoprostane Affinity Purification Kit</i>	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
96- <i>well</i> -Polypropylenplatte (U-Boden + F-Boden)	Greiner bio-one, Frickenhausen
384- <i>well</i> Multiply® PCR-Platte	Sarstedt, Nümbrecht
Abdeckmatte	Sarstedt, Nümbrecht

Absolute/IDQ® p180 Kit	Biocrates, Innsbruck, Österreich
Alzet®-Pumpen, Modell 1004	DURECT Corporation, Cupertino, USA
Bio-Rad Protein Assay Kit II	Bio-Rad, München
Eppendorfgefäße, 0,5, 1,5, 2 mL	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon-Röhrchen, 15, 50 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Filterpapier	Whatman, Dassel
<i>High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit</i>	Applied Biosystems, Darmstadt
<i>KOD Hot Start DNA Polymerase Kit</i>	Merck, Darmstadt
<i>Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix</i>	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
MultiPLY®-µStripPro 8er-Ketten	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrocellulose-Membran	Whatman, Dassel
Omnifix® 1, 2, 5, 10, 20 mL	Braun, Melsungen
Pasteur Pipetten	Brand, Wertheim
PCR-Klebefolien optisch klar	Sarstedt, Nümbrecht
Pipetten 10, 100, 1000 µL	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten 1, 2, 5, 10, 25 mL	Sarstedt, Nümbrecht
S-Monovetten® Citrat	Sarstedt, Nümbrecht
S-Monovetten® EDTA	Sarstedt, Nümbrecht
S-Monovetten® Li-Heparin	Sarstedt, Nümbrecht
S-Monovetten® Serum-Gel	Sarstedt, Nümbrecht
Sterican® Kanülen	Braun, Melsungen
<i>Super Signal WestDura Extended Duration Substrate</i>	Thermo Scientific, Rockford, USA
Zorbax SB-C8	Agilent Technologies, Santa Clara, USA

### 8.1.5 Laborgeräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
ABI Prism® 7900 HT Sequence Detection System	Applied Biosystems, Foster City, USA
Agarose Gel Electrophoresis Systems Sub-Cell® GT	Bio-Rad, München
Analysenwaage, CP 225 D	Sartorius, Göttingen
Blotkammer	Bio-Rad, München
ChemiGenius <sup>2</sup> Bio Imaging System	Syngene, Cambridge, UK
GC-MS/MS (CP-3800; 1200 Quadrupole MS)	Varian, Darmstadt
Hatteras Instruments SC1000	Hatteras Instruments, Cary, USA
<i>In Vivo Imaging System (IVIS) 200</i>	Xenogen, Alameda, USA
LC-MS/MS (1200L Triple Quadrupole MS)	Varian, Darmstadt
Magnetrührer MR 3002	Heidolph Instruments, Schwabach
Mastercycler® ep gradient	Eppendorf AG, Hamburg
Milli-Q plus, Wasseraufbereitungssystem	Millipore, Schwalbach
NanoDrop® ND-1000	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
Orbital-Schüttler Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach
pH-Meter, FiveEasy™ FE20	Mettler-Toledo, Gießen
Pipettus Accu-Jet	Brand, Wertheim
Power Supply	Bio-Rad, München
Präzisionswaage, BP 3100 S	Sartorius, Göttingen
Prostar Autosampler	Varian, Darmstadt
Scotsman® Eismaschine AF103	Scotsman Ice Systems, Mailand, Italien

Taumelmischer RM5V 30	Cat, Staufen
Tecan Safire II Basic	Tecan, Grödig, Österreich
Thermomixer Compact	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge MC6	Sarstedt, Nümbrecht
TissueLyzer	Quiagen, Hilden
Trockenschrank	Memmert, Schwabach
Vortex Reax Control	Heidolph Instruments, Schwabach
Zentrifuge, Rotina 35 R	Andreas Hettich, Tuttlingen
Zentrifugen, Centrifuge 5415 D, 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg

### 8.1.6 Software

Software	Anwendung
Agilent Literature Search 3.1.1 in CytoScape 3.3.0	Netzwerkanalyse
Chart 4.0, ADInstruments GmbH	Aufzeichnung und Auswertung der Spannung am Myographen
Citavi 5	Literaturverwaltung
GraphPad Prism 5	Abbildungen und Statistik
IBM SPSS Statistics 22	Abbildungen und Statistik der klinischen Studien
ImageJ	Bestimmung der Intima-Media-Dicke
Microsoft 2013 (Word, PowerPoint)	Textverarbeitung und Abbildungen
SC1000 Comm for Windows®, Hatteras Instruments	Aufzeichnung und Auswertung der <i>Tail-</i> <i>cuff</i> -Blutdruckmessungen
SDS Version 2.4, Applied Biosystems	Auswertung qPCR
Varian MS Workstation, Version 6.9	Auswertung GC- und LC-MS/MS

## 8.2 H- und P-Sätze

### H-Sätze (*Hazard Statements*) nach GHS

- 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.
- H228 Entzündbarer Feststoff.
- 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.
- 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.
- H304 Kann bei Verschlucken und Eindringen in die Atemwege tödlich sein.
- H310 Lebensgefahr bei Hautkontakt.
- H311 Giftig bei Hautkontakt.
- H312 Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.
- H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
- H315 Verursacht Hautreizungen.
- H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
- H318 Verursacht schwere Augenschäden.
- H319 Verursacht schwere Augenreizung.
- H330 Lebensgefahr bei Einatmen.
- H331 Giftig bei Einatmen.
- H332 Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
- 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 (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H341 Kann vermutlich genetische Defekte verursachen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H350 Kann Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H350 i Kann bei Einatmen Krebs erzeugen.
- H351 Kann vermutlich Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H360 Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen (konkrete Wirkung angeben, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass die Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H360 F Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
- H360 D Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
- H360 FD Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
- H360 Fd Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
- H360 Df Kann das Kind im Mutterleib schädigen. Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
- H361 Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen (konkrete Wirkung angeben, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass die Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht)

H361 f Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.

H361 d Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.

H361 fd Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.

H362 Kann Säuglinge über die Muttermilch schädigen.

H370 Schädigt die Organe (oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

H371 Kann die Organe schädigen (oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

H372 Schädigt die Organe (alle betroffenen Organe nennen) bei längerer oder wiederholter Exposition (Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

H373 Kann die Organe schädigen (alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) bei längerer oder wiederholter Exposition (Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

H400 Sehr giftig 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.

#### **EUH-Sätze**

EUH 001 In trockenem Zustand explosiv.

EUH 006 Mit und ohne Luft explosionsfähig.

EUH 014 Reagiert heftig mit Wasser.

EUH 018 Kann bei Verwendung explosionsfähige/ entzündbare Dampf/ Luft-Gemische bilden.

EUH 019 Kann explosionsfähige Peroxide bilden.

EUH 044 Explosionsgefahr bei Erhitzen unter Einschluss.

EUH 029 Entwickelt bei Berührung mit Wasser giftige Gase.

EUH 031 Entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase.

EUH 032 Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.

EUH 066 Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen.

EUH 070 Giftig bei Berührung mit den Augen.

EUH 071 Wirkt ätzend auf die Atemwege.

EUH 059 Die Ozonschicht schädigend.

EUH 201 Enthält Blei. Nicht für den Anstrich von Gegenständen verwenden, die von Kindern gekaut oder gelutscht werden könnten.

- EUH 201 A Achtung! Enthält Blei.
- EUH 202 Cyanacrylat. Gefahr. Klebt innerhalb von Sekunden Haut und Augenlider zusammen. Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.
- EUH 203 Enthält Chrom(VI). Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
- EUH 204 Enthält Isocyanate. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
- EUH 205 Enthält epoxidhaltige Verbindungen. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
- EUH 206 Achtung! Nicht zusammen mit anderen Produkten verwenden, da gefährliche Gase (Chlor) freigesetzt werden können.
- EUH 207 Achtung! Enthält Cadmium. Bei der Verwendung entstehen gefährliche Dämpfe. Hinweise des Herstellers beachten. Sicherheitsanweisungen einhalten.
- EUH 208 Enthält (Name des sensibilisierenden Stoffes). Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
- EUH 209 Kann bei Verwendung leicht entzündbar werden.
- EUH 209 A Kann bei Verwendung entzündbar werden.
- EUH 210 Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.
- EUH 401 Zur Vermeidung von Risiken für Mensch und Umwelt die Gebrauchsanleitung einhalten.

### **P-Sätze (*Precautionary Statements*) nach GHS**

- 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 / Funken / offener Flamme / heißen Oberflächen fernhalten nicht rauchen.
- P211 Nicht gegen offene Flamme oder andere Zündquelle sprühen.
- P220 Von Kleidung /.../ brennbaren Materialien fernhalten/entfernt aufbewahren.
- P221 Mischen mit brennbaren Stoffen /... unbedingt verhindern.
- P222 Kontakt mit Luft nicht zulassen.
- P223 Kontakt mit Wasser wegen heftiger Reaktion und möglichem Aufflammen unbedingt verhindern.
- P230 Feucht halten mit ...
- P231 Unter inertem Gas handhaben.
- P232 Vor Feuchtigkeit schützen.
- P233 Behälter dicht verschlossen halten.
- P234 Nur im Originalbehälter aufbewahren.
- P235 Kühl halten.
- P240 Behälter und zu befüllende Anlage erden.

- P241 Explosionsgeschützte elektrische Betriebsmittel / Lüftungsanlagen / Beleuchtung / ... verwenden.
- P242 Nur funkenfreies Werkzeug verwenden.
- P243 Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen.
- P244 Druckminderer frei von Fett und Öl halten.
- P250 Nicht schleifen / stoßen /.../ reiben.
- P251 Behälter steht unter Druck: Nicht durchstechen oder verbrennen, auch nicht nach der Verwendung.
- 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 Kontakt während der Schwangerschaft / und der Stillzeit vermeiden.
- P264 Nach Gebrauch ... gründlich waschen.
- 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 / Gesichtsschild / Augenschutz mit Kälteisolierung tragen.
- P283 Schwer entflammbare / flammhemmende Kleidung tragen.
- P284 Atemschutz tragen.
- P285 Bei unzureichender Belüftung Atemschutz tragen.
- P231 + P232 Unter inertem Gas handhaben. 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 KONTAMINIERTER KLEIDUNG:
- P307 BEI EXPOSITION:
- P308 BEI EXPOSITION ODER FALLS BETROFFEN:
- P309 BEI EXPOSITION ODER UNWOHLSEIN:
- P310 Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.

- P311 GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
- P312 Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder 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:
- P333 Bei Hautreizung oder -ausschlag:
- P334 In kaltes Wasser tauchen / 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 betroffene Person an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
- 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 und Seife waschen.
- P353 Haut mit Wasser abwaschen / 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 und vor erneutem Tragen waschen.
- P363 Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen.
- P370 Bei Brand:
- P371 Bei Großbrand und großen Mengen:
- P372 Explosionsgefahr bei Brand.

- 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 Alle Zündquellen entfernen, wenn gefahrlos möglich.
- P390 Verschüttete Mengen aufnehmen, um Materialschäden zu vermeiden.
- P391 Verschüttete Mengen aufnehmen.
- P301 + P310 BEI VERSCHLUCKEN: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
- P301 + P312 BEI VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
- P301 + P330 + P331 BEI VERSCHLUCKEN: Mund ausspülen. KEIN Erbrechen herbeiführen.
- P302 + P334 BEI KONTAKT MIT DER HAUT: In kaltes Wasser tauchen / nassen Verband anlegen.
- P302 + P350 BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen.
- P302 + P352 BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen.
- P303 + P361 + P353 BEI KONTAKT MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle beschmutzten, getränkten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen.
- P304 + P340 BEI EINATMEN: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
- 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. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
- 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 + 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 + 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 oder Arzt anrufen.

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.

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 korrosionsbeständiger Auskleidung aufbewahren.

P407 Luftspalt zwischen Stapeln / Paletten lassen.

P410 Vor Sonnenbestrahlung schützen.

P411 Bei Temperaturen von nicht mehr als ... °C / ... aufbewahren.

P412 Nicht Temperaturen von mehr als 50 °C aussetzen.

P413 Schüttgut in Mengen von mehr als ... kg bei Temperaturen von nicht mehr als ... °C aufbewahren.

P420 Von anderen Materialien entfernt aufbewahren.

P422 Inhalt in / unter ... aufbewahren.

P402 + P404 In einem geschlossenen Behälter an einem trockenen Ort aufbewahren.

P403 + P233 Behälter dicht verschlossen an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.

P403 + P235 Kühl an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.

P410 + P403 Vor Sonnenbestrahlung geschützt an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.

P410 + P412 Vor Sonnenbestrahlung schützen und nicht Temperaturen von mehr als 50 °C aussetzen.

P411 + P235 Kühl und bei Temperaturen von nicht mehr als ... °C aufbewahren.

P501 Inhalt / Behälter ... zuführen.

## 8.3 Abkürzungen

### A

AAV	Adeno assoziierter Virus
ABC	<i>ATP-binding cassette transporter</i>
ABCC	ABC Subfamilie C
AC	Adenylatcyclase
AcN	Acetonitril
ACS	<i>acute coronary syndrome</i>
Akt	Proteinkinase B
ApoE	Apolipoprotein E
ApoM	Apolipoprotein M
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>area under the curve</i>

### B

BLI	Biolumineszenz- <i>Imaging</i>
BMI	<i>Body-Mass-Index</i>
BNP	<i>brain natriuretic peptide</i>
BSTFAN	O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid

### C

Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ion
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CBBG	Coomassie-Brilliant-Blau G-250
CK-MB	<i>creatine kinase muscle brain type</i>
CMH	1-Hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin
CMV	Cytomegalievirus
COX	Cyclooxygenase

---

CREB	<i>cAMP-response element binding protein</i>
CRP	C-reaktives Protein
CTEPH	Chronisch Thrombo-embolische Pulmonale Hypertonie
CVD	<i>cardiovascular disease</i>
<b>D</b>	
DG	Diacylglycerol
D <sub>Kap</sub>	Dilatationskapazität
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<b>E</b>	
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Konzentration
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDG	<i>endothelial differentiation gene</i>
eNOS	endothelialen NO-Synthase
Epacs	<i>exchange proteins directly activated by cAMP</i>
EPR	Elektronenspinresonanz
ERKs	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
<b>F</b>	
FCS	fetales Kälberserum
FIA	Fließinjektionsanalyse
<b>G</b>	
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC	Gaschromatographie
GC-MS/MS	Gaschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	GTP-bindendes Protein

GTP Guanosintriphosphat

## H

HBSS *Hank's Balanced Salt Solution*

HDL *high-density lipoprotein*

HRP *horseradish peroxidase*

## I

ICAM-1 *Intercellular Adhesion Molecule-1*

iNOS induzierbare NO-Synthase

IP<sub>3</sub> Inositoltrisphosphat

IPA Ingenuity<sup>®</sup> Pathway-Analyse

iPAH idiopathische Pulmonale Arterielle Hypertonie

IVIS *In Vivo Imaging System*

## K

KG Körpergewicht

KHK Koronare Herzkrankheit

KO Knockout

## L

LC Flüssigkeitschromatographie

LC-MS/MS Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie

LDL *low-density lipoprotein*

LUC Luciferase

lyso-PC lyso-Phosphatidylcholin

## M

MAP mittlerer arterieller Blutdruck

*M. cremaster* *Musculus cremaster*

MRM *Multiple Reaction Monitoring*

---

MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
mTBXA2R	muriner Thromboxan-Rezeptor
MW	Mittelwert
<b>N</b>	
NO	Stickstoffmonoxid
NSTEMI	Myokardinfarkte ohne ST-Streckenhebung
NT-proBNP	N-terminales Propeptid BNP
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
<b>P</b>	
PAH	Pulmonale Arterielle Hypertonie
PAR-1-AP	<i>protease-activated receptor-1activating peptide</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PC	Phosphatidylcholin
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFB	Pentafluorobenzyl-Rest
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandin F <sub>2α</sub>
PH	Pulmonale Hypertonie
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PITC	Phenylisothiocyanat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase K
PLC	Phospholipase C
PPP	<i>platelet-poor plasma</i>

PRP	<i>platelet-rich plasma</i>
PTCA	Perkutane Transluminale Koronarangioplastie
PVOD	<i>pulmonary veno-occlusive disease</i>
<b>Q</b>	
qcH	<i>quality control high</i>
qcL	<i>quality control low (qcL)</i>
qPCR	quantitative <i>real-time</i> -PCR
<b>R</b>	
Rho	<i>Ras homologue</i> -Familie
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
<b>S</b>	
S1P	Sphingosin-1-phosphat
S1PR	S1P-Rezeptor
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEM	Standardfehler
SHIP	<i>Study of Health in Pomerania</i>
SphK	Sphingosinkinase
STEMI	Myokardinfarkt mit ST-Streckenhebung
<b>T</b>	
TP	Thromboxan-Rezeptor
TP-KO	Thromboxan-Rezeptor-Knockout-Mäuse
TP-MUT	mutierte Variante des Thromboxan-Rezeptors
TP-WT	Wildtyp-Variante des Thromboxan-Rezeptors
TRE	<i>tetracyclin responsive element</i>
tTA	<i>tetracycline transactivator</i>

TxA<sub>2</sub>      Thromboxan A<sub>2</sub>

**U**

USP      *United States Pharmacopeia*

**V**

VEGF      *Vascular Endothelial Growth Factor*

**W**

WT      Wildtyp

**Sonstige**

8-iso-PGE<sub>2</sub>      8-iso-Prostaglandin E<sub>2</sub>

8-iso-PGF<sub>2α</sub>      8-iso-Prostaglandin F<sub>2α</sub>

## 8.4 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Biosynthese und Struktur von Prostaglandinen und Isoprostanen .....	2
Abb. 2: Metabolismus und renale Elimination von 8-iso-PGF <sub>2α</sub> .....	4
Abb. 3: Schematische Darstellung der heptahelikalen Struktur des TP .....	5
Abb. 4: Schematische Darstellung des TP in der Zellmembran .....	5
Abb. 5: Signaltransduktion des TP.....	7
Abb. 6: Biologische Aktivität von 8-iso-PGF <sub>2α</sub> .....	8
Abb. 7: Biosynthese und Struktur von S1P .....	14
Abb. 8: Katabolismus von S1P .....	16
Abb. 9: Signaltransduktion der S1PRs.....	18
Abb. 10: Biologische Aktivität von S1P .....	19
Abb. 11: Mechanismus der S1P-induzierten Monozyten-Migration nach S1P-Freisetzung aus Thrombozyten .....	24
Abb. 12: Beispielhafte Belegung einer 96- <i>well</i> -Mikrotiterplatte .....	29
Abb. 13: Beispielhafte Kalibriergerade zur Bestimmung der S1P-Konzentration.....	32
Abb. 14: Beispielhafte Aufnahme einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve für PGE <sub>2</sub> .....	44
Abb. 15: Originalaufnahme einer beispielhaften <i>Tail-cuff</i> -Messung .....	49
Abb. 16: Schematische Darstellung des AAV2-L1-CMV-LUC-2A-mTBXA2R-Vektors .....	51
Abb. 17: 1%iges Agarosegel der PCR-Amplifikate zur Genotypisierung von TP-KO-, TP-WT- und heterozygoten Mäusen .....	55
Abb. 18: Relative Expression des murinen TP in explantierten Herzen und Nieren .....	56
Abb. 19: Detektion des TP auf Proteinebene mittels Western Blot.....	57
Abb. 20: Histologische Querschnitte der murinen Aorta thoracalis .....	59

---

Abb. 21: Superoxid-Produktion in mazeriertem Lungengewebe .....	60
Abb. 22: Superoxid-Produktion in mazeriertem Gewebe des linken und rechten Ventrikels ..	61
Abb. 23: Superoxid-Produktion in isolierten Leukozyten .....	62
Abb. 24: Gesamtkonzentration von Phosphatidylcholinen und Lyso-Phosphatidylcholinen ..	62
Abb. 25: Relativer Anteil von Dilignoceryl-Phosphatidylcholin an der Diacyl-Phosphatidyl- cholin-Gesamtkonzentration und Cerotyl-Lyso-Phosphatidylcholin an der Lyso-Phosphatidyl- cholin-Gesamtkonzentration .....	65
Abb. 26: Enzym-katalysierte Hydrolyse von Phosphatidylcholinen .....	66
Abb. 27: Netzwerk der Metaboliten mit signifikanten Veränderungen im TP-KO-Plasma.....	66
Abb. 28: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von U-46619, 8-iso-PGE <sub>2</sub> , 8-iso-PGF <sub>2α</sub> , PGF <sub>2α</sub> und PGE <sub>2</sub> am Myographen mit Aorten.....	68
Abb. 29: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von U-46619, 8-iso-PGF <sub>2α</sub> und PGF <sub>2α</sub> am Myographen mit Pulmonalarterien.....	70
Abb. 30: Maximale Änderung des Gefäßdurchmessers von Arteriolen im <i>M. cremaster</i> unter Zugabe von 8-iso-PGF <sub>2α</sub> , PGF <sub>2α</sub> , 8-iso-PGE <sub>2</sub> , PGE <sub>2</sub> und U-46619 .....	72
Abb. 31: 8-iso-PGF <sub>2α</sub> -Konzentrationen im 24-Stunden-Sammelurin nach Implantation von osmotischen Minipumpen, gefüllt mit Vehikel-Lösung.....	73
Abb. 32: 8-iso-PGF <sub>2α</sub> -Konzentrationen im 24-Stunden-Sammelurin und Plasma nach Implantation von osmotischen Minipumpen, gefüllt mit 8-iso-PGF <sub>2α</sub> .....	74
Abb. 33: 8-iso-PGF <sub>2α</sub> -Konzentration im 24-Stunden-Sammelurin nach Implantation von osmotischen Minipumpen, gefüllt mit 8-iso-PGF <sub>2α</sub> und i.p.-Injektion von Thioridazin .....	75
Abb. 34: Systolischer Blutdruck nach der Implantation von osmotischen Minipumpen, gefüllt mit 8-iso-PGF <sub>2α</sub> oder Vehikel-Lösung .....	77
Abb. 35: <i>In vivo</i> -Biolumineszenz-Aufnahmen nach Injektion des AAV-Vektors mit Luciferase- Gen .....	79
Abb. 36: Biolumineszenz-Aufnahmen von explantierten Pulmonalarterien, Aorten und Lungen nach Injektion des AAV-Vektors mit Luciferase-Gen .....	80

Abb. 37: <i>In vivo</i> -Biolumineszenz-Aufnahmen nach Injektion des AAV-Vektors AAV2-L1-CMV-LUC-2A-mTBXA2R .....	81
Abb. 38: Biolumineszenz-Aufnahmen von explantierten Lungen, Aorten und Herzen nach Injektion des AAV-Vektors AAV2-L1-CMV-LUC-2A-mTBXA2R.....	82
Abb. 39: Relative Expression des murinen TP in explantieren Lungen nach Injektion des AAV-Vektors AAV2-L1-CMV-LUC-2A-mTBXA2R.....	83
Abb. 40: Relative Expression des murinen TP in explantieren Lungen und Herzen nach Injektion des AAV-Vektors AAV2-L1-CMV-LUC-2A-mTBXA2R.....	84
Abb. 41: Konzentration von 8-iso-PGF <sub>2α</sub> im Urin von Teilnehmern der ACS-Studie .....	86
Abb. 42: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse mit der 8-iso-PGF <sub>2α</sub> -Konzentration im Urin in der ACS-Studie .....	88
Abb. 43: Netzwerk der mit S1PR <sub>1-5</sub> - und TP-assozierten Gene.....	89
Abb. 44: S1P-Konzentrationen im Serum von TP-WT- und TP-KO-Mäusen.....	90
Abb. 45: S1P-Konzentrationen im Serum vor und nach Ligation der linken <i>Arteria carotis</i> sowie Intima-Media-Quotient nach Ligation .....	91
Abb. 46: Histologische Querschnitte der <i>Arteria carotis</i> nach Ligation .....	92
Abb. 47: MS-Spektrum und MS/MS-Spektrum von C17-S1P.....	94
Abb. 48: MS-Spektrum und MS/MS-Spektrum von S1P .....	95
Abb. 49: LC-MS/MS-Chromatogramm von C17-S1P, S1P bzw. C17-S1P und S1P .....	96
Abb. 50: MS-Spektrum und MS/MS-Spektrum von S1P- <i>d</i> <sub>7</sub> .....	98
Abb. 51: LC-MS/MS-Chromatogramm von S1P- <i>d</i> <sub>7</sub> , S1P bzw. S1P- <i>d</i> <sub>7</sub> und S1P .....	99
Abb. 52: S1P-Konzentrationen in Serum, EDTA-, Heparin- und Citrat-Plasma nach sofortiger Probenaufbereitung und -messung.....	102
Abb. 53: S1P-Konzentrationen in Serum und EDTA-Plasma unter verschiedenen Lagerungsbedingungen .....	104
Abb. 54: S1P-Konzentrationen in Heparin- und Citrat-Plasma unter verschiedenen Lagerungsbedingungen .....	105

---

Abb. 55: S1P-Konzentrationen im Serum von gesunden Männern und Frauen .....	106
Abb. 56: S1P-Konzentrationen im Serum von Gesunden im Alter von 19 - 71 .....	107
Abb. 57: S1P-Konzentrationen im Serum von gesunden Kontrollprobanden und Patienten mit Gefäßerkrankungen .....	109
Abb. 58: Konzentrationen von S1P im Serum von Teilnehmern der ACS-Studie .....	112
Abb. 59: Korrelationsanalyse der S1P- und 8-iso-PGF <sub>2α</sub> Konzentration in der ACS-Studie	114
Abb. 60: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse mit der S1P-Konzentration im Serum in der ACS-Studie .....	115
Abb. 61: Konzentrationen von S1P im Plasma von PAH-Patienten der iP4-Studie .....	117
Abb. 62: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse mit der S1P-Konzentration im Plasma von PAH-Patienten der iP4-Studie.....	118

## 8.5 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Gemeinsamkeiten von 8-iso-PGF <sub>2α</sub> und S1P.....	24
Tab. 2: Chromatographische Parameter zur Bestimmung von S1P.....	30
Tab. 3: Massenspektrometrische Parameter zur Bestimmung von S1P .....	31
Tab. 4: <i>Master Mix</i> für Genotypisierungs-PCR der TP-Mäuse .....	33
Tab. 5: Primer für klassische PCR zur Genotypisierung von TP-KO- und -WT-Mäusen .....	34
Tab. 6: Primer für klassische PCR zur Genotypisierung von TP-transgenen Mäusen.....	34
Tab. 7: Temperaturprogramm für Genotypisierungs-PCR der TP-Mäuse .....	34
Tab. 8: <i>Master Mix</i> zur Reversen Transkription .....	36
Tab. 9: Temperaturprogramm zur Reversen Transkription .....	37
Tab. 10: <i>Master Mix</i> für qPCR .....	38
Tab. 11: Temperaturprogramm für qPCR .....	38
Tab. 12: Primärantikörper zur TP- und GAPDH-Detektion mittels Western Blot.....	41
Tab. 13 Sekundärantikörper zur TP- und GAPDH-Detektion mittels Western Blot.....	41
Tab. 14: Primärantikörper zur TP-Detektion mittels Immunhistochemie.....	42
Tab. 15: Sekundärantikörper zur TP-Detektion mittels Immunhistochemie .....	42
Tab. 16: Bereich der zugegebenen Konzentrationen zur Erstellung von Konzentrations- Wirkungs-Kurven für 8-iso-PGF <sub>2α</sub> , 8-iso-PGE <sub>2</sub> , PGF <sub>2α</sub> , PGE <sub>2</sub> und U-46619 am Myographen.	45
Tab. 17: Bereich der zugegebenen Konzentrationen für 8-iso-PGF <sub>2α</sub> , 8-iso-PGE <sub>2</sub> , PGF <sub>2α</sub> , PGE <sub>2</sub> und U-46619 für intravitalmikroskopische Untersuchungen der Arteriolen im <i>M. cremaster</i> ..	47
Tab. 18: Diacyl-Phosphatidylcholine mit entsprechenden p-Werten aus Varianzanalysen....	63
Tab. 19: Lyso-Phosphatidylcholine mit entsprechenden p-Werten aus Varianzanalysen.....	64
Tab. 20: Baseline-Charakteristika der ACS-Studienteilnehmer.....	85

---

Tab. 21: Korrelationsanalysen mit der 8-iso-PGF <sub>2α</sub> -Konzentration in der ACS-Studie.....	87
Tab. 22: Massenübergänge der Analyten S1P und C17-S1P .....	93
Tab. 23: Massenübergänge der Analyten S1P und S1P- <i>d</i> <sub>7</sub> .....	97
Tab. 24: Intra-Assay-Validierung der LC-MS/MS-Methode mit S1P- <i>d</i> <sub>7</sub> .....	100
Tab. 25: Inter-Assay-Validierung der LC-MS/MS-Methode mit S1P- <i>d</i> <sub>7</sub> .....	101
Tab. 26: Baseline-Charakteristika der Kontrollgruppe aus 174 gesunden Blutspendern und der Patientenkohorte mit Gefäßkrankungen .....	108
Tab. 27: Korrelationsanalysen mit der S1P-Konzentration in Gesunden.....	110
Tab. 28: Korrelationsanalysen mit der S1P-Konzentration in der Patientenkohorte mit Gefäßkrankungen .....	111
Tab. 29: Korrelationsanalysen mit der S1P-Konzentration in der ACS-Studie .....	113
Tab. 30: Baseline-Charakteristika der iP4-Studienteilnehmer .....	116
Tab. 31: Korrelationsanalysen mit der S1P-Konzentration in der iP4-Studie.....	117
Tab. 32: Rangliste der Prostaglandine PGF <sub>2α</sub> und PGE <sub>2</sub> , Isoprostane 8-iso-PGF <sub>2α</sub> und 8-iso-PGE <sub>2</sub> sowie U-46619 nach Potenz der vasokonstriktorisches Eigenschaften in Aorten.....	121
Tab. 33: Rangliste des Prostaglandins PGF <sub>2α</sub> , Isoprostans 8-iso-PGF <sub>2α</sub> sowie U-46619 nach Potenz der vasokonstriktorisches Eigenschaften in Pulmonalarterien .....	122
Tab. 34: Zusammenfassung der nachgewiesenen TP-vermittelten vasokonstriktorisches Eigenschaften von 8-iso-PGF <sub>2α</sub> , 8-iso-PGE <sub>2</sub> , PGF <sub>2α</sub> , PGE <sub>2</sub> und U-46619, jeweils <i>ex vivo</i> am Myographen sowie <i>in vivo</i> mittels Intravitalmikroskopie .....	124
Tab. 35: Vergleich von S1P-Referenzwerten unterschiedlicher Studien .....	134



## 9 Lebenslauf

Name Eileen Moritz  
 Geburtstag 24. März 1988  
 Geburtsort Kirchen/Sieg

### Ausbildung

2013 – 2015 Aufbaustudium Molekularbiologie, Zentrum für Molekulare Neurobiologie, Universität Hamburg  
 07/2012 Approbation als Apothekerin  
 2007 – 2011 Studium der Pharmazie, Philipps-Universität Marburg und Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
 1998 – 2007 Freiherr-vom-Stein-Gymnasium Betzdorf-Kirchen

### Berufserfahrung

seit 08/2012 Dissertation am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (AG Schwedhelm)  
 seit 08/2012 Medio-Apotheke Hamburg, Apothekerin  
 11/2015 – 03/2016 St. Jacobi-Apotheke Greifswald, Apothekerin  
 10/2015 – 03/2016 Forschungsaufenthalt am Institut für Allgemeine Pharmakologie, Universitätsmedizin Greifswald (AG Rauch)  
 12/2011 – 05/2012 Krankenhausapotheke, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Praktisches Jahr  
 06/2011 – 11/2011 Europa Apotheke Hamburg, Praktisches Jahr

### Stipendium

10/2012 – 09/2014 Promotionsstipendium der Universität Hamburg



## 10 Veröffentlichungen

### Originalarbeiten

Winkler, M.S., Nierhaus, A., Holzmann, M., **Mudersbach, E.**, Bauer, A., Robbe, L., Zahrte, C., Geffken, M., Peine, S., Schwedhelm, E., Daum, G., Kluge, S., Zoellner, C.: Decreased serum concentrations of sphingosine-1-phosphate in sepsis. *Critical care (London, England)* 19, 372 (2015). doi: 10.1186/s13054-015-1089-0

Pecha, S., **Mudersbach, E.**, Sohren, K.D., Hakmi, S., Reichenspurner, H., Eschenhagen, T., Christ, T.: Prostaglandin E2 does not attenuate adrenergic-induced cardiac contractile response. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 387(10), 963–968 (2014). doi: 10.1007/s00210-014-1012-2

### Kongressbeiträge

**Mudersbach E.**, Prehn C., Atzler D., Benndorf R., Böger R.H., Nüsing R., Furuyashiki T., Narumiya S., Schwedhelm E., Adamski J.: Metabolomic investigation in TP receptor deficient mice. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie*, Halle/Saale, März 2013.

**Mudersbach E.**, Soltau I., Norzaad S., Schwedhelm E., Peine S., Geissen M., Daum G., Debus S., Larena-Avellaneda A.: Sphingosine-1-phosphate levels are altered in vascular patients and change with treatment. *Jahrestagung des Young-DZHK (Deutsches Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung)*, Braunlage/Harz, September 2014.



## 11 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die an der Universität Hamburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

**Die Bedeutung der vasoaktiven  
Signallipide 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und S1P  
für kardiovaskuläre Erkrankungen**

im Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Rainer H. Böger und der Betreuung durch PD Dr. Edzard Schwedhelm und Prof. Dr. Elke Oetjen ohne sonstige Hilfe durchgeführt und die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium.

Ferner versichere ich, dass ich bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt habe.

Hamburg, Mai 2016

.....  
Eileen Moritz



## 12 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rainer H. Böger für die Aufnahme im Institut für Klinische Pharmakologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, für die Möglichkeit, dort meine Promotion durchzuführen und die Finanzierung im Anschluss an mein Stipendium.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Thomas Eschenhagen für die Zusammenarbeit mit dem Institut für Experimentelle Pharmakologie, sowohl für die Nutzung der gemeinsamen Labore als auch für die Leitung einer einzigartigen Institutskombination.

Frau Prof. Dr. Elke Oetjen danke ich herzlich für die Übernahme der Betreuung im Fachbereich Chemie und Begutachtung der Arbeit, sowie für die jederzeit selbstverständliche Hilfestellung und freundliche Unterstützung.

Frau PD Dr. Sabine Hoffmeister-Ullerich und Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein danke ich für die freundliche Zusage, als Prüfer an meiner Disputation teilzunehmen.

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Edzard Schwedhelm. Einen besseren Doktorvater hätte ich mir nicht vorstellen können. Ich danke ihm für die ausgezeichnete wissenschaftliche und persönliche Betreuung sowie seine uneingeschränkte Erreichbarkeit und Unterstützung in den letzten vier Jahren, in denen ich viel von ihm und durch ihn lernen konnte. Ihm verdanke ich zahlreiche neue Fähigkeiten und Sichtweisen. Nicht zuletzt freue ich mich über die geteilte Freude am Segeln.

Ganz herzlich danke ich allen Mitarbeitern der Institute für Klinische und Experimentelle Pharmakologie für die wundervolle Atmosphäre, die ich immer sehr genossen habe, und die grandiosen Betriebsausflüge und Weihnachtsfeiern. In diesem Rahmen habe ich viele tolle Menschen ins Herz geschlossen und Freundschaften aufgebaut. Beim Gang durch die Institutsflure verspürte ich immer eine Art Glücksgefühl.

Ich danke besonders Anna Steenpaß und Mariola Kastner für ihre liebevolle Unterstützung, sowohl im Labor als auch in allen aktuellen Lebensfragen. Durch die gute Zusammenarbeit und amüsanten sowie tiefgehenden Gespräche mit ihnen war ich immer gerne im Labor.

Weiterhin danke ich den derzeitigen und ehemaligen Doktoranden und Mitarbeitern Dr. Matthias Werner, Mintje Bohné und Marta Kazimir für die Arbeit am TP-Projekt, Sandra Maak, Dr. Isabel Bernges, Antonia Glatzel, Anika Laing, Mirjam Schönhoff und Moritz Manderscheid für die über das Labor hinausgehende Gemeinschaft, Jennifer Radwitz und Ann-Cathrin Kunze für schöne Sommer in HH sowie Kathrin Cordts für die guten Zeiten *in old freshness* im Raum 111b.

Von Herzen danke ich Dr. Dorothee Atzler und Dr. Justus Stenzig, die mich durch schwere Zeiten getragen haben. Doro danke ich für den starken Rückhalt und viele schöne gemeinsame Unternehmungen. Justus danke ich für seinen wertvollen Beistand und die unbeschwerten Zeiten.

Für fruchtbare Kooperationen danke ich Dr. Jakob Körbelin, Agnes Hunger, Prof. Dr. Cor de Wit, Jakob Speiser, Dr. Thomas Lemke und Stefan Weber.

Für die gute Zusammenarbeit möchte ich besonders meinen S1P-Freunden Dr. Günter Daum, Dr. Markus Geißen und Astrid Becker danken. Dr. Martin Sebastian Winkler und Dr. Annika Poppe danke ich für den wissenschaftlichen und persönlichen Kontakt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Bernhard H. Rauch für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe im Institut für Allgemeine Pharmakologie der Universitätsmedizin Greifswald und die vielversprechenden gemeinsamen Projekte.

Ich danke meinen Büropartnern Dr. Andreas Böhm und Dr. Christy Joseph sowie Sarah Polster, Carolin Seifert, Maximilian Splittstöhser und Susanne Brigitte Brück für die schönen Zeiten im Labor in HGW. Andreas danke ich für die Namensgebung und Max für seine coole Art der Aufmunterung. Susa habe ich einfach viel zu spät kennengelernt. Ihr danke ich für die Seelenverwandtschaft und Begleitung auf der Zielgeraden.

Meinen Hamburger Freunden Linda und Jesse Brunkhorst, Annette Sommer, Carolin Schöller, Hanna und Matthias Jäger, Tobias Nixdorf und Annekathrin Bombien danke ich für die langjährige Begleitung, Unterstützung und Ablenkung. Tobi und Anne danke ich besonders für die vielen gelebten Hashtags (#deluxe).

Ich danke meinem Segelpartner Andreas Frey und Johanna Charlotte Buro für die ständige Ermutigung und langjährige Freundschaft. Ohne Andis Allround Support wäre ich verzweifelt.

Mein Dank richtet sich auch an meine Studienfreundinnen Marina Stähn, Johanna Lehmann, Daniela Sonner, Doreen Hölzel, Barbara Hinrichs und Katja Salzig aus Marburg, sowie Lena Schmüser, Silke Stamer, Tomke Schlag und Tina Woischnick aus Kiel.

Nadine Zingelmann danke ich für Dreamteam-mäßige Zeiten in der Apotheke, Rebekka Höfer, Annette Schmidt und Tabea Schulz für ihr Mitfiebern aus der Ferne.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern Svenja und Jürgen Moritz sowie meiner Schwester Viola Moritz, die immer an mich geglaubt und nie an mir gezweifelt haben. Ohne sie wäre ich nie an diesem Punkt angekommen.

Insgesamt hatte ich eine unvergessliche Promotionszeit, an die ich mich immer gerne zurück erinnern werde und danke allen, die auf unterschiedliche Art dazu beigetragen haben.



