

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Universitäres Herzzentrum, Klinik und Poliklinik für Gefäßmedizin

Klinikdirektor: Prof. Dr. med. E. Sebastian Debus

Atherosklerose-bedingte Veränderungen der Expression der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren in der humanen A. carotis und A. iliaca

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Steffen Greulich

aus Oldenburg

Hamburg 2016

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 12.07.2017**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Larena-Avellaneda

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Sydow

Für meine Eltern und meinen Bruder

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Atherosklerose	2
1.1.1	Anatomische Grundlagen	2
1.1.2	Risikofaktoren	4
1.1.3	Prädilektionsstellen der Plaqueformation	5
1.1.4	Pathogenese der Atherosklerose	6
1.2	Sphingosin-1-Phosphat und seine Rezeptoren	8
1.2.1	Sphingosin-1-Phosphat	8
1.2.2	Signalwege und Funktionen der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren	10
1.2.2.1	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor Typ 1	12
1.2.2.2	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor Typ 2	14
1.2.2.3	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor Typ 3	15
2	Zielsetzung	16
3	Material und Methoden	17
3.1	Material	17
3.1.1	Probenmaterial	17
3.1.2	Klassifikation des Gefäßstatus im Sektionsprotokoll	17
3.1.3	Definition und Einteilung der Gruppen	18
3.1.4	Auswahl der klinischen Parameter	19
3.1.5	Kits und Geräte	20
3.2	Methoden	21
3.2.1	RNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung	21
3.2.2	cDNA-Synthese mittels reverser Transkription	23
3.2.3	Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR)	23
3.2.3.1	Bestimmung der Expression der S1P-Rezeptoren mittels qPCR	23
3.2.3.2	Primer	24
3.2.3.3	Analyse der qPCR-Daten	25
3.2.4	Statistische Auswertung	26
4	Ergebnisse	27
4.1	Beschreibung der Studiengruppen	27
4.2	Analyse der S1P-Rezeptor-Expression in der A. carotis und A. iliaca	29
4.2.1	Analyse der S1P-Rezeptor-Expression in der Kontrollgruppe	30
4.2.1.1	Einfluss des Alters und des Geschlechts auf die S1P-Rezeptor-Expression	31
4.2.1.2	Untersuchung der Korrelation zwischen der Expression der S1P-Rezeptoren	33
4.3	Analyse der S1P-Rezeptor-Expression in Probanden mit Carotisplaque	36
4.4	Analyse der S1P-Rezeptor-Expression in Probanden mit pAVK	37
4.5	Veränderungen der S1P-Rezeptor-Expression in Abhängigkeit vom Atherosklerose-Score	38
4.6	Einfluss der Expression der S1P-Rezeptoren auf Carotisplaque, pAVK und Atherosklerose-Score unter Berücksichtigung klinischer Parameter und Komorbiditäten	39
4.6.1	Einflussvariablen auf die Entwicklung einer Carotisplaque	40
4.6.2	Einflussvariablen auf die Entwicklung einer pAVK	42
4.6.3	Einflussvariablen des Atherosklerose-Scores	43

5	Diskussion	45
5.1	Charakterisierung und Vergleich der Studiengruppen	46
5.2	Veränderungen der S1P-Rezeptor-Expression in der Kontrollgruppe	47
5.3	Einfluss der S1P-Rezeptor-Expression auf die Atherosklerose	49
5.4	Limitationen	54
6	Fazit und Ausblick	55
7	Zusammenfassung	56
8	Abbildungsverzeichnis	58
9	Tabellenverzeichnis	59
10	Literaturverzeichnis	60
11	Danksagung	67
12	Lebenslauf	68
13	Anhang	69
14	Eidesstattliche Erklärung	72

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatcyclase
Akt	Proteinkinase B
ApoM	Apolipoprotein M
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA
CP	Carotisplaque
CRP	C-Reaktives Protein
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ERK	extracellular-signal regulated kinase
EZM	Extrazelluläre Matrix
FTY720	Fingolimod
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gi	inhibitorisches G-Protein
GMZ	glatte Muskelzellen
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
HDL-C	High density lipoprotein-Cholesterin
IH	Intimahyperplasie
IL-1	Interleukin 1
KVK	Kardiovaskuläre Krankheiten
LDL-C	Low density lipoprotein-Cholesterin
MetS	Metabolisches Syndrom
mRNA	messenger RNA
MS	Multiple Sklerose
NO	Stickstoffmonoxid
oxLDL	oxidiertes Low density lipoprotein
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
Pi3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLC	Phospholipase C
Rac	Rac-Protein
Ras	Ras-Protein
Rho	Rho-Protein
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1PR	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor
SphK	Sphingosinkinase
TGF- β	Transforming Growth Factor Beta
TVP	Transplantatvaskulopathie
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Kardiovaskuläre Krankheiten (KVK) stellen weltweit die häufigste Todesursache dar (Nichols et al. 2014). Im Jahr 2012 starben laut Weltgesundheitsorganisation 17.5 Millionen Menschen an deren Folgen (WHO 2014). Auch in Deutschland wird die Todesursachenstatistik von den Erkrankungen des Herzkreislaufsystems angeführt. Ihr Anteil an den gesamten Todesursachen lag 2014 bei 39 Prozent (Statistisches Bundesamt 2014).

Zu den wichtigsten Formen der KVK zählen die koronare Herzkrankheit, die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) und die zerebrovaskuläre Krankheit, zu der auch die Karotisstenose gezählt wird (Debus und Gross-Fengels 2012). Der zugrundeliegende pathologische Prozess ist die Atherosklerose, eine altersabhängige Erkrankung, welche durch eine chronische Inflammation der großen und mittelgroßen Arterien gekennzeichnet ist (Hansson und Hermansson 2011). Im Verlauf ihrer Entstehung, der Atherogenese, bilden sich Plaques (Atherome) in der Arterienwand, welche das Gefäßlumen einengen.

Häufig wird die Atherosklerose erst klinisch manifest, wenn eine Plaqueruptur mit konsekutiver Thrombose bzw. Thrombembolie zum einem Verschluss einer Arterie führt. Auch können die Plaques flusslimitierende Stenosen verursachen. In beiden Fällen kommt es zu einer Gewebeischämie distal des Verschlusses bzw. der Stenose. Die klinischen Komplikationen der Atherosklerose sind von der Lage der Arterie im Gefäßsystem abhängig. Ein thromboembolischer Verschluss der A. carotis kann sich typischerweise in einem Schlaganfall äußern, während eine Thrombose bzw. Embolie der A. iliaca weiter distal zu einer Ischämie der unteren Extremität führen kann (Debus und Gross-Fengels 2012).

Die Atherosklerose ist eine systemische Erkrankung, deren klinische Manifestation von der Ausprägung und Beschaffenheit der Plaques im Gefäßsystem abhängt (Bentzon et al. 2014). Von besonderem klinischen Interesse sind Biomarker, welche die Ausprägung und die Progression der Atherosklerose anzeigen können, um eine Einschätzung über die Schwere der Erkrankung und das Risiko für die vaskulären Komplikationen zu ermöglichen. Ein potentieller Biomarker für die Atherosklerose ist das Sphingosin-1-Phosphat (S1P), ein bioaktives Lipid, das an der Regulation von diversen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen im Kreislaufsystem beteiligt ist (Rosen et al. 2007, Daum et al. 2009, Maceyka et al. 2012). S1P wird unter anderem im Blut synthetisiert und vermittelt seine intrazelluläre Wirkung über mehrere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, den S1P-Rezeptoren (S1PR). Studien an Mausmodellen haben Hinweise darauf geliefert, dass S1P bzw. die S1PR einen Einfluss auf die Atherosklerose und andere vaskuläre Pathologien haben können (Maceyka et al. 2012, Daum et al. 2009).

Im Menschen hingegen ist bislang weder die pathophysiologische Bedeutung von S1P für die Atherosklerose, noch die tatsächliche Expression der S1PR im Gefäßsystem ausreichend

untersucht. Die vorliegende Arbeit analysiert die Expression einzelner S1PR in einem Kollektiv verstorbener Probanden, das entsprechend der Ausprägung der Atherosklerose in verschiedenen Gefäßen klassifiziert wurde.

1.1 Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine chronisch-progressive Erkrankung, die sich über Jahrzehnte entwickelt und die durch eine Akkumulierung von Lipiden in der Arterienwand gekennzeichnet ist. Nach der Darstellung der anatomischen Grundlagen, wird im Folgenden auf die Risikofaktoren und die Prädilektionsstellen der Atherosklerose eingegangen und abschließend die Pathogenese erläutert.

1.1.1 Anatomische Grundlagen

Eine gesunde Arterie ist dreischichtig aufgebaut (Abbildung 1, S. 3). Die innerste, dem Blut zugewandte Schicht wird Intima genannt. Sie besteht aus einschichtigem Plattenepithel, dem Endothel, das die innere Oberfläche der Arterie auskleidet. Der subendotheliale Raum wird ebenfalls zur Intima gezählt und beinhaltet lockeres Bindegewebe, in das teilweise glatte Muskelzellen (GMZ) und Immunzellen eingebettet sein können. Die Grenze zur Media, der mittleren Gefäßschicht, bildet die Lamina elastica interna. Die Media besteht hauptsächlich aus GMZ und elastischen Fasern. Je nach Wandaufbau werden Arterien vom elastischen und vom muskulären Typ unterschieden. Bei Arterien vom muskulären Typ überwiegt, die Anzahl der GMZ. Die periphere Grenze der Media bildet die Lamina elastica externa. Die äußerste Gefäßschicht, die Adventitia, ist aus lockerem Bindegewebe aufgebaut und enthält Fibroblasten und GMZ neben Mastzellen, Nervenendigungen und kleinen Blutgefäßen (Lusis 2000, Libby et al. 2011).

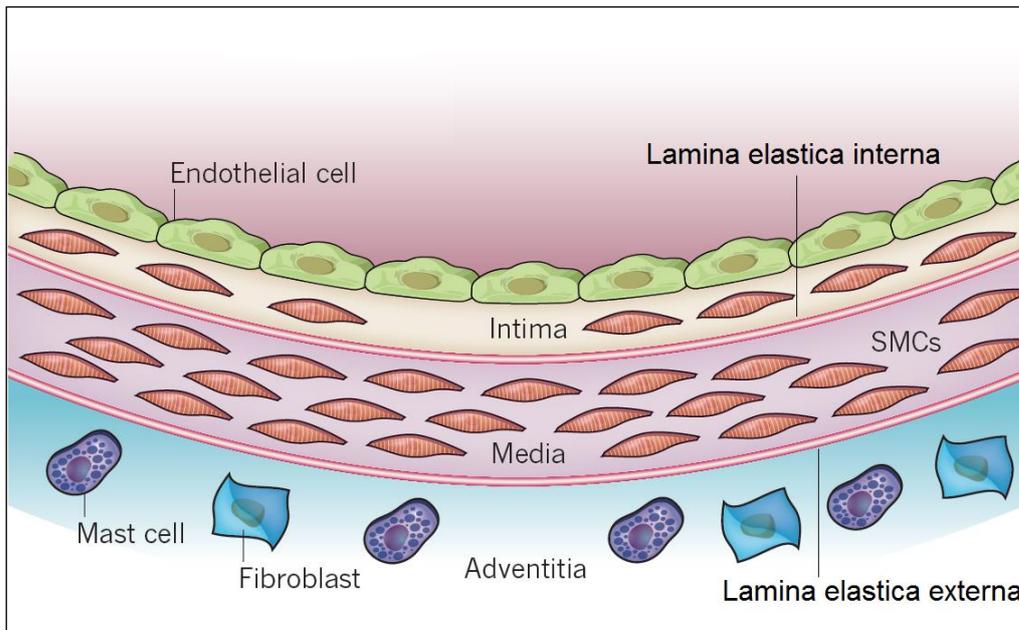


Abbildung 1: Anatomischer Aufbau einer gesunden Arterie vom muskulären Typ. SMCs, smooth muscle cells (GMZ); modifiziert nach Libby et al. 2011.

Die pathologischen Prozesse im Rahmen der Atherosklerose finden hauptsächlich in der Intima statt. Unter physiologischen Umständen ist die Intima im Verhältnis zu den anderen Schichten sehr dünn. Im Verlauf der Atherogenese kommt es jedoch zu einer deutlichen Zunahme der Intimadicke (Lusis 2000).

Im Zentrum des derzeitigen Verständnisses der Pathophysiologie der Atherosklerose steht das Endothel (Russell 1999, Gimbrone und García-Cardeña 2016). Unter physiologischen Bedingungen stellen die Endothelzellen eine selektiv permeable Barriere zwischen Blut und Gewebe dar. Neben der Regulation der Permeabilität und des Gefäßtonus, zählen die Kontrolle der Hämostase und Inflammation zu den endothelialen Hauptfunktionen. Das Endothel besitzt weiterhin antithrombogene Eigenschaften und verhindert die Adhäsion und Diapedese von Immunzellen (Aichner und Lang 2002). Nach der erstmals im Jahr 1973 von Russell aufgestellten „Response-to-injury“-Hypothese, stellt die Schädigung des Endothels die Initiierung der Atherogenese dar. Diese Schädigung geht mit einer endothelialen Dysfunktion einher, welche mit dem Verlust der oben beschriebenen physiologischen Funktionen des Endothels verbunden ist und die Adhäsion und Infiltration von Immunzellen ermöglicht (Russell 1999).

1.1.2 Risikofaktoren

Für die Atherosklerose konnten eine Reihe von Risikofaktoren identifiziert werden, die direkt oder indirekt die endotheliale Dysfunktion bzw. den Krankheitsprogress beeinflussen können (Fruchart 2004, Libby et al. 2011). Es gibt verschiedene Klassifikationen der Risikofaktoren (Liapis et al. 2009). Nachfolgend wird eine im Jahr 1999 von der American Heart Association und dem American Collage of Cardiology veröffentlichte Klassifikation dargestellt, welche die Risikofaktoren in drei Kategorien unterteilt (Tabelle 1) (Grundy et al. 1999, Liapis et al. 2009).

Hauptrisikofaktoren (Kategorie 1)	weitere Risikofaktoren
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Zigarettenrauchen ▪ arterielle Hypertonie (RR > 140/90 mmHg), ▪ erhöhtes Gesamtcholesterin ▪ LDL-Cholesterin-Erhöhung (>160 mg/dl) ▪ HDL-Cholesterin-Erniedrigung (♂ <40 mg/dl bzw. ♀ <50 mg/dl) ▪ Diabetes mellitus 	<p>prädisponierende Risikofaktoren (Kategorie 2)</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Lebensalter (m > 45 Jahre, w > 55 Jahre) ▪ männliches Geschlecht ▪ Adipositas ▪ körperliche Inaktivität ▪ familiäre bzw. genetische Belastung (erstgradige Familienangehörige mit KVK) ▪ ethnische und psychosoziale Faktoren
	<p>konditionelle Risikofaktoren (Kategorie 3)</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Hypertriglyzeridämie ▪ erhöhtes CRP ▪ prothrombotische Faktoren (z.B. Hyperfibrinogenämie) ▪ Hyperhomocysteinämie ▪ Lipoprotein(a)-Erhöhung

Tabelle 1: Risikofaktoren der Atherosklerose. RR; Blutdruckwert nach Riva-Rocci; CRP, C-reaktives Protein; HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; m, männlich; w, weiblich; aus Grundy et al. 1999, Liapis et al. 2009.

Die erste Kategorie beinhaltet die konventionellen Hauptrisikofaktoren, die unabhängig voneinander wirken und von denen angenommen wird, dass sie einen kausalen Einfluss auf die Atherogenese ausüben (Liapis et al. 2009).

Die übrigen Risikofaktoren werden in prädisponierende und konditionelle Risikofaktoren eingeteilt. Prädisponierende Risikofaktoren können über die Beeinflussung von konventionellen Faktoren wirken und besitzen möglicherweise darüber hinaus unabhängige Effekte (Liapis et al. 2009). Konditionelle Risikofaktoren können das Risiko in Gegenwart von konventionellen Faktoren erhöhen (Liapis et al. 2009, Grundy et al. 1999).

Ein zunehmendes Problem in westlichen Industrienationen stellt das metabolische Syndrom (MetS) dar, welches eine Reihe von Risikofaktoren einschließt. Hierzu zählen eine arterielle Hypertonie, erhöhte LDL-Cholesterin-Werte, niedrige HDL-Cholesterin-Spiegel, sowie eine abdominelle Adipositas und eine Glukosetoleranzstörung (Alberti et al. 2009). Patienten mit MetS haben ein doppelt so hohes Risiko innerhalb von fünf Jahren an KVK zu erkranken, als Patienten ohne MetS. Auch geht das MetS mit einem fünffach erhöhten Risiko für Typ-2-

Diabetes einher, einem Hauptrisikofaktor für die Atherosklerose. Das MetS erhöht also drastisch das Risiko für das Auftreten von Atherosklerose bzw. KVK (Grundy 2008).

Weitere Hauptrisikofaktoren sind die Lipoproteinspiegel von LDL-C und HDL-C im Serum, die eine zentrale Rolle im Cholesterinstoffwechsel einnehmen (Libby et al. 2011). Das LDL transportiert Cholesterin von der Leber in die Peripherie und scheint kausal an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt zu sein, bei welcher es zu einer Akkumulierung von LDL-C in der Arterienwand kommt (siehe Abschnitt 1.1.4, S. 6) (Russell 1999, Libby 2012). Im Gegensatz hierzu können HDL-Partikel, neben dem Abtransport von Cholesterin von peripheren Geweben zur Leber, eine Vielzahl weiterer atheroprotektiver Effekte vermitteln. Hierzu zählen unter anderem antiinflammatorische, vasodilatative und endothelprotektive Effekte (Badimon und Santos-Gallego 2015, Levkau 2015). In den letzten Jahren haben verschiedene Studien gezeigt, dass S1P für einen Teil der atheroprotektiven Eigenschaften des HDL verantwortlich sein könnte (siehe Abschnitt 1.2.1, S. 8) (Levkau 2015, Sattler et al. 2015).

1.1.3 Prädilektionsstellen der Plaqueformation

Obwohl die genannten Risikofaktoren systemisch wirken, bilden sich Atherome bevorzugt an spezifischen Prädilektionsstellen im Gefäßsystem, beispielsweise in der Aorta, der A. carotis, der A. iliaca und der A. femoralis (Aichner und Lang 2002). Ursächlich für dieses fokale Verteilungsmuster könnten die regionalen Strömungsverhältnisse sein, die zusätzlich zu den systemischen Faktoren auf das Gefäß wirken. Als Atherosklerose-anfällige Regionen im Gefäßsystem gelten unter anderem Bifurkationen (z.B. die Karotisbifurkation) und große Biegungen von Arterien (z.B. der Aortenbogen). Der Blutstrom in diesen Bereichen ist durch turbulente Flussmuster und relativ geringen Scherspannungen am Endothel gekennzeichnet. Das Endothel in diesen Regionen weist im Vergleich zu Atherosklerose-resistenten Regionen unter anderem eine verstärkte Expression von proinflammatorischen Genen, eine erhöhte Leukozytenadhäsion und Permeabilität auf (Zhou et al. 2014, Baeyens und Schwartz 2016). Im Gegensatz hierzu zeigten gerade und unverzweigte Arterien in Ratten Flussmuster, die durch relativ hohe Scherspannung am Endothel und uniformen, laminaren Flussverhältnissen charakterisiert waren. Diese Bereiche zeigten sich in den Tieren relativ resistent gegenüber der Atherosklerose (Ku et al. 1985, Gimbrone 1999). Diese Ergebnisse sind allerdings konträr zu der häufigen klinischen Manifestation der Atherosklerose in der A. femoralis superficialis, welche einen relativ geraden Verlauf aufweist (Mohler 2003). Wie im Menschen die Scherspannungen und lokale Flussverhältnisse einen Einfluss auf das Endothel, dessen Genexpression und auf die Plaqueentwicklung ausüben können, ist noch Bestandteil aktueller Forschungsbemühungen.

1.1.4 Pathogenese der Atherosklerose

Der Beginn der Atherogenese ist durch die Dysfunktion des Endothels gekennzeichnet, die eine Akkumulierung von LDL im subendothelialen Raum ermöglicht. Bei der Akkumulierung des LDL in der Intima wird dieses oxidativ modifiziert und oxidiertes LDL (oxLDL) entsteht, welches das Endothel weiter schädigen kann (Russell 1999). Monozyten aus dem Blut, auf die das oxLDL chemotaktisch wirkt, infiltrieren den subendothelialen Raum und entwickeln sich zu Makrophagen. Mit ihren Skavanger-Rezeptoren können die Makrophagen und auch GMZ das oxLDL phagozytieren und sich zu Schaumzellen („foam cells“) entwickeln, welche vermehrt inflammatorische Zytokine ausschütten. Zusätzlich werden T-Lymphozyten in den subendothelialen Raum rekrutiert. Für diese Zellen und auch für andere Bestandteile des angeborenen und des adaptiven Immunsystems konnte ein Einfluss auf die Atherogenese nachgewiesen werden (Hansson und Hermansson 2011).

Die endotheliale Schädigung mit der resultierenden Dysfunktion ist mit weiteren funktionellen Veränderungen verbunden. In dem dysfunktionalem Endothel ist die Aktivität der endothelialen NO-Synthase (eNOS) vermindert, die das antiatherogen wirkende NO synthetisiert. NO vermittelt unter physiologischen Umständen die Relaxation von vaskulären GMZ und damit die Vasodilatation. Des Weiteren wirkt das endotheliale NO inhibierend auf die Thrombozytenaggregation und die Leukozytenadhäsion (Gimbrone und García-Cardena 2016). Zusätzlich exprimiert das dysfunktionale Endothel verstärkt Adhäsionsmoleküle, welche die vermehrte Adhäsion und Infiltration von Monozyten und Lymphozyten fördern. Diese Zellen sezernieren ihrerseits inflammatorische Zytokine und verstärken so die vaskuläre Inflammation.

Im Zuge dieser Veränderungen entsteht eine sogenannte „fatty streak“-Läsion (fettiger Streifen), die sich makroskopisch abgrenzen lässt. Interessanterweise können derartige Läsionen bereits im ersten Lebensjahrzehnt in der humanen Aorta nachgewiesen werden (Russell 1999, Libby et al. 2011). Fettige Streifen sind per se nicht von klinischer Bedeutung, allerdings gelten sie als Vorstufen für kompliziertere, fortgeschrittene Atherome, die zu den bekannten klinischen Manifestationen der Atherosklerose führen können (Lusis 2000).

Unter dem Einfluss der inflammatorischen Mediatoren werden auch GMZ in der Media aktiviert, welche in die Intima migrieren und proliferieren. Dort produzieren die GMZ vermehrt extrazelluläre Matrix (EZM), die vor allem Kollagen, Elastin und Proteoglykane enthält (Libby et al. 2011). Im weiteren Verlauf entsteht eine fortgeschrittene, komplizierte Läsion. In diesen Läsionen sind die GMZ maßgeblich an der Bildung der sogenannten fibrotischen Kappe beteiligt sind, die das Atherom vom Gefäßlumen abgrenzt. Die weitere Progression der Atheromformation ist durch die Ausbildung eines nekrotischen Kerns gekennzeichnet: Schaumzellen im Inneren der Plaque können die Intima nicht mehr verlassen. Teilweise gehen

diese Zellen durch Apoptose zu Grunde und setzen Lipide (oxLDL, Cholesterolkristalle) frei, die extrazellulär akkumulieren. Gleichzeitig ist der Abtransport von abgestorbenen Zellen limitiert, was die Ablagerung von zellulärem Debris fördert. Der entstehende lipidreiche, nekrotische Kern ist hoch thrombogen und wird durch die fibrotische Kappe, welche eine wichtige Barrierefunktion besitzt, vom Blutstrom abgegrenzt (Abbildung 2) (Russell 1999, Libby et al. 2011).

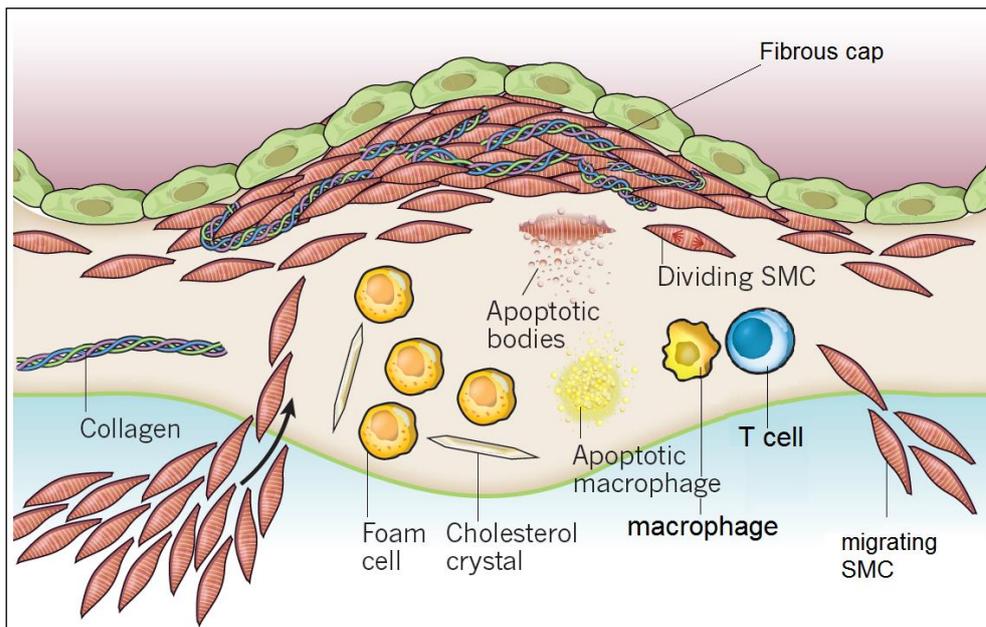


Abbildung 2: Schematische Darstellung einer fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsion. SMC, smooth muscle cell (GMZ); modifiziert nach Libby et al. 2011.

Bei einer Ruptur der fibrotischen Kappe kommt der thrombogene nekrotische Kern der Läsion in Kontakt mit dem Blut und die Gerinnungskaskade wird aktiviert. Dies führt zu einer Thrombusbildung, die den lokalen Blutfluss einschränken kann. Paradoxerweise entstehen die thrombotischen Komplikationen nicht immer in den Arealen mit der größten Lumeneinengung. Vielmehr hängt das Risiko für eine Plaqueruptur von der Stabilität der fibrotischen Kappe ab. Instabile, rupturanfällige Plaques haben typischerweise eine dünne, kollagenarme fibrotische Kappe mit nur wenigen GMZ und einer großen Anzahl an Makrophagen (Lusis 2000). Makrophagen, GMZ und Lymphozyten innerhalb der Läsion produzieren unter der Stimulation von inflammatorischen Zytokinen Matrixmetalloproteasen, welche Bestandteile der EZM degradieren und die fibrotische Kappe ausdünnen und schwächen können (Lusis 2000, Libby et al. 2011). Stabile, weniger rupturgefährdete Plaques hingegen sind durch eine dicke fibrotische Kappe mit einem geringeren Anteil an Lipiden und inflammatorischen Zellen gekennzeichnet (Libby 2013). Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass S1P die dargestellten zellulären Prozesse der Atherogenese beeinflussen kann. Im Folgenden wird die Rolle von S1P und seinen Rezeptoren für die Atherosklerose erläutert.

1.2 Sphingosin-1-Phosphat und seine Rezeptoren

1.2.1 Sphingosin-1-Phosphat

Sphingosin-1-Phosphat ist ein bioaktives Lipid, das sich der Gruppe der Sphingolipide zuordnen lässt. Sphingolipide leiten sich von dem Aminoalkohol Sphingosin ab. Ein Vertreter der Sphingolipide ist das Sphingomyelin, welches einen wichtigen strukturellen Bestandteil eukaryotischer Zellmembranen darstellt (Spiegel und Milstien 2003). S1P ist an der Regulation einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt, die wahrscheinlich ebenfalls für die Atherogenese eine wichtige Rolle spielen. So wird beispielsweise die Migration von Lymphozyten und vaskulären GMZ (in vitro) unter anderem von S1P gesteuert (Chun und Hartung 2010). Weiterhin reguliert S1P wichtige physiologische Funktionen im Gefäßsystem, wie den Gefäßtonus und die Gefäßpermeabilität (endotheliale Barrierefunktion) (Lucke und Levkau 2010, Szczepaniak et al. 2010). Darüber hinaus steuert S1P diverse zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung sowie Zellüberleben und Inflammation (Spiegel und Milstien 2003, Hla und Brinkmann 2011).

Die Synthese von S1P kann auf zwei Wegen erfolgen (Olivera et al. 2003). Zum einen kann S1P de novo aus Serin und Palmitoyl CoA synthetisiert werden. Zum anderen wird S1P aus Sphingomyelin, welches durch die sequentiellen Reaktionen der Sphingomyelinase und der Ceramidase zu Ceramid und schließlich zu Sphingosin umgewandelt wird, synthetisiert. Das Schlüsselenzym der S1P-Synthese ist die Sphingosinkinase (SphK), welche die Phosphorylierung von Sphingosin zu S1P katalysiert. Die SphK kommt im menschlichen Körper in zwei Isoformen vor (SphK1 und SphK2) (Spiegel und Milstien 2003). Die SphK1 ist die Hauptquelle von zirkulierendem S1P im Blut und wird ubiquitär exprimiert, vor allem in Erythrozyten. Der Abbau von S1P kann auf zwei Wegen erfolgen. Zum einen durch die Reaktion der S1P-Phosphatase, wobei Sphingosin entsteht. Zum anderen katalysiert die S1P-Lyase, die Spaltung von S1P in Phosphoethanolamin und Hexadecanal (Spiegel und Milstien 2003, Olivera et al. 2013). Abbildung 3 (S. 9) gibt einen Überblick über die Synthese und den Abbau von S1P.

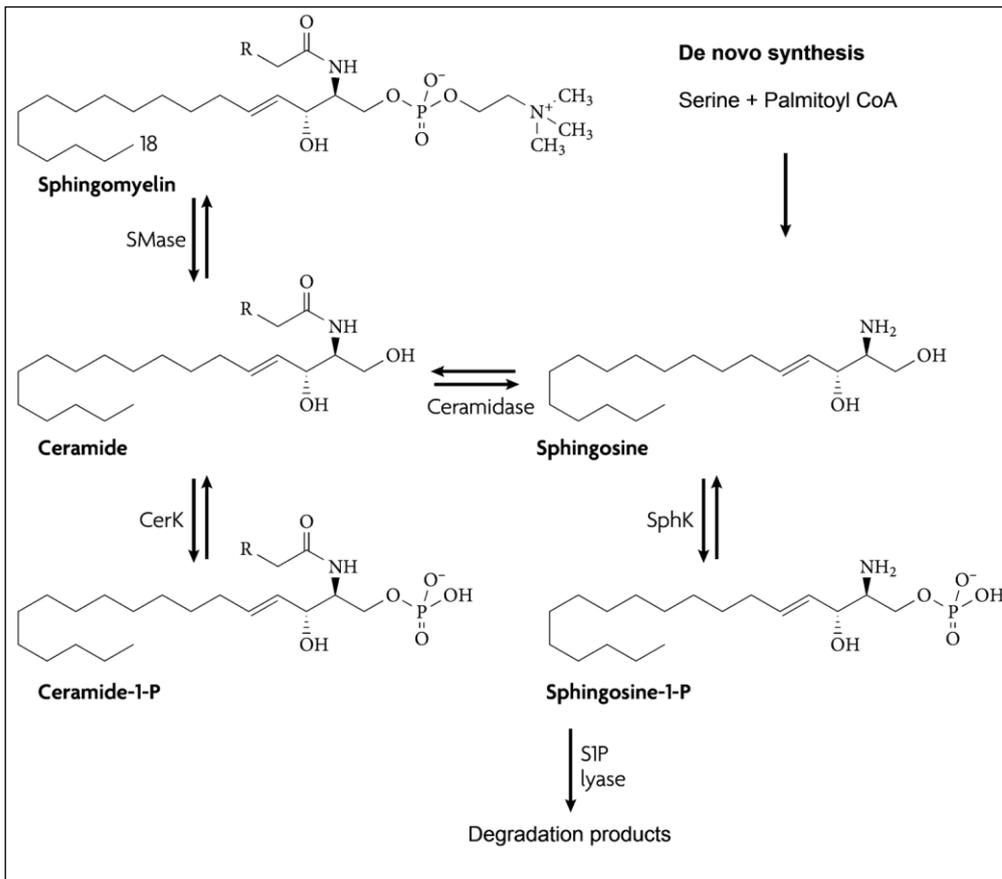


Abbildung 3: Synthese und Abbau von S1P. modifiziert nach Wymann und Schneiter 2008.

Im humanen Blutplasma herrschen hohe nanomolare S1P-Konzentrationen (200-1000 nM), wobei die gemessenen Werte je nach Analysemethode großen Schwankungen unterliegen können (Deutschman et al. 2003, Winkler et al. 2015). Gewebe weist im Vergleich zum Plasma eine um zwei bis drei Potenzen geringere Konzentration auf (Schwab et al. 2005, Olivera et al. 2013). Es besteht folglich ein deutlicher Konzentrationsunterschied zwischen Blut und Gewebe, der wichtig für biologische Funktionen von S1P ist (Olivera et al. 2013): Die Migration von Lymphozyten ist maßgeblich von diesem Gradienten abhängig (siehe Abschnitt 1.2.2.1, S. 12) (Schwab et al. 2005, Chun und Hartung 2010).

Hauptquelle von S1P im Blut sind Erythrozyten und Thrombozyten (Spiegel und Milstien 2003, Hanel et al. 2007, Pappu et al. 2007). Unter physiologischen Umständen sind vor allem Erythrozyten für die Plasmakonzentrationen von S1P verantwortlich (Olivera et al. 2013), während Thrombozyten insbesondere in Assoziation mit vaskulären Pathologien, wie der Atherosklerose oder nach Endothelschädigung S1P zu sezernieren scheinen (Lucke und Levkau 2010, Olivera et al. 2013, Badimon und Santos-Gallego 2015).

Im Blut ist S1P überwiegend an Albumin und HDL gebunden (Marsolais und Rosen 2009). Der Hauptbindungspartner für S1P im HDL-Partikel ist das Apolipoprotein M (ApoM) (Christoffersen et al. 2011). Es gibt zunehmende Evidenz, dass ein Teil der atheroprotektiven

Eigenschaften des HDL unter anderem von S1P vermittelt werden könnte (Sattler et al. 2015). HDL-gebundenes S1P (HDL-S1P) scheint über verschiedene Wege in die pathophysiologischen Prozesse der Atherosklerose eingreifen zu können. Zu den vom HDL-S1P beeinflussten antiatherogenen Reaktionen zählen unter anderem die Förderung der Integrität der endothelialen Barriere (Wilkerson et al. 2012), die Stimulation der NO-Produktion durch die eNOS (Nofer et al. 2004) sowie die Inhibierung der Expression von Adhäsionsmolekülen (Kimura et al. 2006, Levkau 2015). Wieviel Einfluss das HDL-gebundene S1P auf dessen antiatherogenen Funktionen hat, ist Gegenstand aktueller Forschung (Levkau 2015, Badimon und Santos-Gallego 2015).

Ein Großteil der Daten zu der Funktion von S1P und seinen Rezeptoren in der Atherosklerose stammt aus Studien an Tiermodellen, die sich nicht direkt auf den Menschen übertragen lassen (Libby et al. 2011).

1.2.2 Signalwege und Funktionen der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren

S1P bindet mit hoher Affinität (Dissoziationskonstante, $K_d \approx 8-20$ nM) an fünf G-Proteingekoppelte Rezeptoren, die Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren S1PR1-5, und aktiviert eine Vielzahl intrazellulärer Signalwege (Rivera und Chun 2008, Lucke und Levkau 2010). Die meisten Funktionen von S1P scheinen über die S1PR vermittelt zu werden, wobei auch Rezeptor-unabhängige, intrazelluläre Funktionen beschrieben wurden (Olivera et al. 2003).

Die S1PR vermitteln ihre unterschiedlichen zellulären Wirkungen durch nachgeschaltete Signalkaskaden, die an heterotrimere G-Proteine wie G_i/o , G_q und $G_{12/13}$ gekoppelt sind (Abbildung 4 A, S. 11). Die Funktion von S1P auf eine bestimmte Zelle hängt demnach von dem Expressionsmuster der S1P-Rezeptoren ab. Der S1PR1 koppelt ausschließlich an G_i/o , der S1PR2 und der S1PR3 an G_i/o , G_q und $G_{12/13}$, der S1PR4 und der S1PR5 an G_i/o und $G_{12/13}$. Zu den aktivierten Signalwegen (Abbildung 4 B) zählen unter anderem der Ras/ERK-Signalweg (Zellproliferation), der PI3K/Rac-Weg (Förderung von Migration und endothelialer Barrierefunktion; Vasodilatation) und der Rho-Weg (Inhibition von Migration und endothelialer Barrierefunktion; Vasokonstriktion). Für eine detaillierte Darstellung siehe Brinkmann 2007.

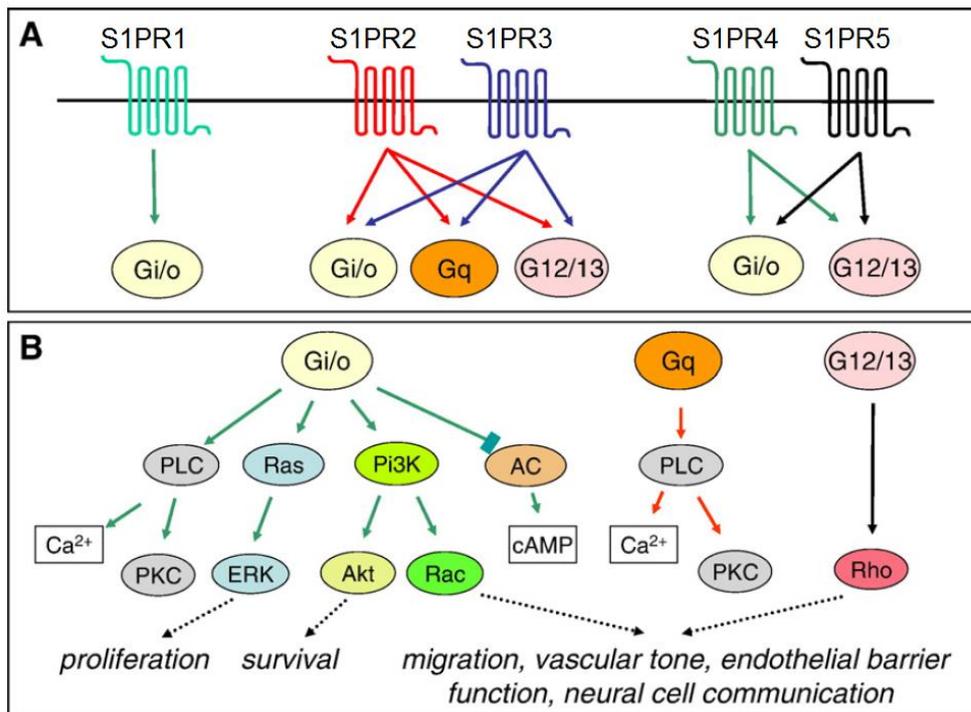


Abbildung 4: S1P-Rezeptoren: Gekoppelte G-Proteine und aktivierte Signalwege. PLC, Phospholipase; PKC, Proteinkinase C; Ras, Ras-Protein; ERK, extracellular-signal regulated kinases; Pi3K, Phosphatidylinositol-3-Kinase; Akt, Proteinkinase B; Rac, Rac-Protein; AC, Adenylatzyklase; cAMP, zyklisches Adenosinmonophosphat; Rho, Rho-Protein; modifiziert nach Brinkmann 2007.

Die S1P-Rezeptoren S1PR1, S1PR2 und S1PR3 werden ubiquitär exprimiert, wohingegen der S1PR4 und der S1PR5 vor allem in Immunzellen und im Nervensystem vorkommen (Sanchez und Hla 2004). Eine Vielzahl physiologischer Funktionen konnten für die S1PR nachgewiesen werden (Tabelle 2, S. 12). Der S1PR1 ist unter anderem für die Lymphozytenmigration, die endotheliale Barrierefunktion und für die embryologische Entwicklung des Gefäßsystems von Bedeutung. Der S1PR2 ist an der Regulation des Gefäßtonus und der Innenohrfunktion beteiligt. Zu den physiologischen Funktionen des S1PR3 zählen unter anderem die Steuerung der endothelialen Barrierefunktion und die Neuralzellmigration (Camm et al. 2014). Auf ausgewählte Funktionen wird detaillierter bei der Erläuterung der S1PR eingegangen. Diese Arbeit fokussiert sich auf die Expressionen der S1P-Rezeptoren S1PR1, S1PR2, S1PR3 im Gefäßsystem.

Rezeptor	mRNA-Verteilung	bekannte physiologische Funktionen
S1PR1	Ubiquitär (hohe Level in Lymphozyten, Astrozyten, Oligodendrozyten und in Gefäßen)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Lymphozyten-Egress von sekundären lymphatischen Organen ▪ Neuralzellmigration und -funktion ▪ Embryologische Entwicklung des Herzkreislauf - und des Nervensystems ▪ Gefäßbildung ▪ Endotheliale Barrierefunktion
S1PR2	Ubiquitär (hauptsächlich im Nervensystem, Immunsystem und Herzkreislaufsystem)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vasotonus ▪ Endotheliale Barrierefunktion ▪ Innenohrfunktion (Hör- und Gleichgewichtssinn)
S1PR3	Ubiquitär (hauptsächlich im Nervensystem, Immunsystem und Herzkreislaufsystem)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Endotheliale Barrierefunktion ▪ Neuralzellmigration und -funktion
S1PR4	Lymphozyten (geringe Level)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Expression in lymphatischen Geweben ▪ Moduliert Funktion von dendritischen Zellen und Th17-Zellen sowie Vasokonstriktion
S1PR5	Gehirn / weiße Substanz, Oligodendrozyten	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Oligodendrozytenfunktion ▪ Migration von Natürlichen-Killer-Zellen

Tabelle 2: Überblick über die Funktionen und mRNA-Verteilung der S1PR-Subtypen. mRNA, messenger RNA; Th17, T-Helferzelle 17; nach Camm et al. 2014.

1.2.2.1 Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor Typ 1

Der endotheliale S1PR1 ist für die physiologische Bildung von Blutgefäßen in der murinen Entwicklung notwendig. S1PR1-Knockout-Mäuse weisen einen besonderen Phänotyp auf, da die Tiere bereits in utero sterben. In diesen Mäusen erfolgte die Rekrutierung von Wandzellen in den Arterien nicht in ausreichendem Maße (Liu et al. 2000). Dies führte zu massiven, letalen inneren Blutungen. Endothelzellen exprimieren den S1PR1 (Blaho und Hla 2014). Der postnatale endothelspezifische Knockout des S1PR1 ergab den gleichen Phänotyp wie der globale Knockout. Dies lässt darauf schließen, dass die Rekrutierung von Wandzellen und die vaskuläre Integrität von der S1PR1-Expression in den Endothelzellen abhängig sein könnte (Allende et al. 2003, Daum et al. 2009).

Lymphozyten exprimieren ebenfalls den S1PR1 auf ihrer Zelloberfläche. Über den S1PR1 sind diese Zellen in der Lage, den bestehenden Blut-Gewebe-Gradienten für S1P zu erkennen und in Richtung hoher S1P-Konzentrationen zu migrieren (Schwab et al. 2005). Intrazellulär kann der S1PR1 über Gi/o den PI3K/Rac-Signalweg stimulieren und so die zelluläre Migration fördern (Zhang et al. 2013, Baeyens et al. 2015). Dies ist insbesondere für den Egress von Lymphozyten aus sekundären lymphatischen Organen (z.B. Lymphknoten) von Bedeutung (Schwab et al. 2005, Chun und Hartung 2010). Durch die pharmakologische Blockade des S1PR1 im Menschen können Lymphozyten den Blut-Gewebe-Gradienten für S1P nicht mehr erkennen und können infolgedessen sekundäre lymphatische Organe nicht mehr verlassen. Über die so induzierte Lymphopenie hat die Blockade des S1PR1 eine Immunsuppression zur Folge (Chun und Hartung 2010). Ein bereits klinisch eingesetztes Medikament mit

entsprechender Wirkung ist das Fingolimod (FTY720). FTY720 ist ein S1P-Analogon, das nach Phosphorylierung durch endogene Sphingosinkinasen den S1PR1 und den S1PR3 aktiviert. Die andauernde Applikation von FTY720 bewirkt jedoch aufgrund dessen hoher Rezeptoraffinität eine Internalisierung und den intrazellulären Abbau des S1PR1 mit einer konsekutiv verringerten Expression des Rezeptors. Demnach ist FTY720 bei kontinuierlicher Applikation als ein funktioneller S1PR1-Antagonist anzusehen. Fingolimod (Gilenya®) wird bereits klinisch zur Behandlung der Multiplen Sklerose (MS) eingesetzt. Die MS ist durch eine chronische Inflammation mit konsekutiver Destruktion der Myelinscheiden im Zentralen Nerven System (ZNS) gekennzeichnet (Frohman et al. 2006). Obwohl die genaue Ursache der MS bis dato noch nicht bekannt ist, wird davon ausgegangen, dass autoimmune Lymphozyten aus der Peripherie, welche die Blut-Hirn-Schranke überwinden, maßgeblich zu der Inflammation im ZNS beitragen (Chun und Hartung 2010, Blaho und Hla 2014).

Aufgrund der zentralen Rolle des S1PR1 für die Lymphozytenfunktion könnte der Rezeptor nicht nur für die Multiple Sklerose, sondern auch für andere chronisch inflammatorische Erkrankungen, wie der Atherosklerose von Bedeutung sein. Die Wirkung von FTY720 auf die Ausprägung der Atherosklerose wurde in Studien an LDL-Rezeptor-Knockout- und ApoE-Knockout-Mäusen untersucht (Keul et al. 2007, Nofer et al. 2007). Die Ergebnisse der Studien zeigen, dass eine Behandlung mit FTY720 die Ausbildung atherosklerotischer Läsionen vermindern konnte. Eine mögliche Erklärung für diese Effekte ist, dass FTY720-vermittelt der S1PR1 auf Lymphozyten herunterreguliert wird, was eine Lymphopenie zur Folge hat. So könnte eine verringerte Lymphozytenzahl in den Läsionen mit entsprechend verringerter Sekretion inflammatorischer Zytokine zu der beobachteten Plaquereduktion beitragen (Keul et al. 2007, Nofer et al. 2007, Maceyka et al. 2012).

Im Endothel scheint der S1PR1 ebenfalls für die Aufrechterhaltung der endothelialen Barriere notwendig zu sein, deren Dysfunktion eine zentrale Rolle in der Atherogenese einnimmt (Blaho und Hla 2014). Mäuse mit einem endothelspezifischen Knockout des S1PR1 wiesen eine erhöhte vaskuläre Permeabilität auf, welche durch eine veränderte Lokalisation von E-Cadherin, einem strukturell wichtigen Bestandteil von endothelialen Zell-Zellverbindungen (Adherens junctions) hervorgerufen wurde. Weiterhin kann S1P über den S1PR1 die Funktion der endothelialen Barriere unterstützen, indem es die Proliferation und Ausbreitung von Endothelzellen fördert (Wilkerson und Argraves 2014).

Zusammenfassend beeinflusst der S1PR1 wesentliche zelluläre Funktionen unter anderem von GMZ, Lymphozyten und Endothelzellen, die eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose spielen.

1.2.2.2 Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor Typ 2

S1PR2-Knockout-Mäuse sind aufgrund einer Fehlbildung des Innenohrs taub. Die Ursache für diese Malformation wird in der Stria vaskularis vermutet, deren Kapillaren in den Tieren stark dilatiert waren (Daum et al. 2009). Eine Erklärung hierfür könne sein, dass der S1PR2 an der Regulation der Vasokonstriktion beteiligt ist. Diese Hypothese wird durch eine weitere Studie an pulmonalen Gefäßen von S1PR2-Knockout-Mäusen unterstützt. In den Tieren war die S1P-vermittelte Vasokonstriktion um mehr als 50 Prozent im Vergleich zum Wildtyp vermindert (Szczepaniak et al. 2010). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der S1PR2, neben der Regulation des Gefäßtonus, eine wichtige Rolle für die Entwicklung des Innenohrs in der Embryogenese spielen könnte.

Bezüglich der endothelialen Barriere scheint der S1PR2 eine gegensätzlich Funktion im Vergleich zum S1PR1 zu besitzen. In vitro ging die Expression des S1PR2 mit einer Dysfunktion der endothelialen Zell-Zellverbindungen einher. Diese beruhte auf einer Inhibition der Translokation von E-Cadherin in die Adhärensjunktionen (Spiegel und Milstien 2011). Weiterhin konnte eine Studie an Gefäßen des M. cremaster von Ratten zeigen, dass durch die Applikation eines spezifischen S1PR2-Antagonisten (JTE-013) und S1P die Histamin-induzierte Gefäßleckage gehemmt werden konnte (Lee et al. 2009). Auch in einem murinen Modell mit Lipopolysaccharid-induzierter Endotoxämie wiesen die S1PR2-Knockout-Mäuse eine deutlich verminderte vaskuläre Permeabilität im Vergleich zum Wildtyp auf (Zhang et al. 2013). Diese Daten sprechen für eine inhibitorische Rolle des S1PR2 für die endotheliale Barriere.

Der S1PR2 scheint ebenfalls bezüglich der Migration von Lymphozyten gegensätzliche intrazelluläre Prozesse im Vergleich zum S1PR1 zu stimulieren. Der S1PR2 koppelt unter anderem an G12/13 und kann über den Rho-Signalweg die zelluläre Migration inhibieren (Skoura und Hla 2009, Baeyens et al. 2015).

Neben den oben genannten Funktionen haben Studien an S1PR2-Knockout-Mäusen Hinweise darauf geliefert, dass der Rezeptor auch für andere vaskuläre Pathologien, wie der Intimahyperplasie (IH) von Bedeutung sein könnte (Shimizu et al. 2007). Charakteristisch für die IH ist eine starke Proliferation und Migration von GMZ in der Intima als Reaktion auf ein beliebiges vaskuläres Trauma (Larena-Avellaneda und Franke 2004). Shimizu et al. konnten zeigen, dass S1PR2-Knockout-Arterien nach Ligatur der Karotisarterie deutlich größere neointimale Läsionen als die Wildtyp-Arterien entwickelten (Shimizu et al. 2007). In diesen Mäusen konnte nach der Gefäßverletzung (Ligatur) eine starke Proliferation und Migration von GMZ in den neointimalen Läsionen nachgewiesen werden. Eine Erklärung für diesen Phänotyp liegt darin, dass der S1PR2, welcher auch von GMZ exprimiert wird, eine inhibitorische Wirkung auf die GMZ-Proliferation und Migration haben könnte (Daum et al.

2009). In GMZ fördert der S1PR2 die RhoA-abhängige Differenzierung. Differenzierte GMZ weisen im Vergleich zum dedifferenzierten Phänotyp eine verminderte Proliferation und Migration auf. Die von Shimizu et al. beschriebene Wirkung des S1PR2 lässt sich demnach möglicherweise durch die Beeinflussung der Zelldifferenzierung durch den S1PR2 erklären (Mack 2011).

1.2.2.3 Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor Typ 3

Um die Rolle des S1PR3 für die Intimahyperplasie zu bestimmen, untersuchten Shimizu et al. die Entwicklung neointimaler Läsionen anhand eines Denudationsmodells in S1PR3-Knockout-Mäusen (Shimizu et al. 2012). Bei der Denudation wurde hierbei mittels eines Katheters die Endothelschicht der Arterie größtenteils entfernt. Die ilio-femorale Arterie der S1PR3-defizienten Tiere wies nach der Denudation deutlich reduzierte neointimale Läsionen im Vergleich zum Wildtyp auf. Der S1PR3 kann in vaskulären GMZ über die Aktivierung der ERK-, Rac- und Akt-Signalwege die zelluläre Migration und Proliferation fördern (Shimizu et al. 2012). Dementsprechend könnte eine verminderte Migration und Proliferation der GMZ in den S1PR3-Knockout-Mäusen für die reduzierten neointimalen Läsionen verantwortlich sein.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen entwickeln S1PR3-defiziente Mäuse in einem Ligationsmodell der A. carotis deutlich größere neointimale Läsionen im Vergleich zum Wildtyp (Shimizu et al. 2012). Wieso der Knockout des Rezeptors in den verschiedenen Gefäßabschnitten diese gegensätzlichen Reaktionen auf Denudation bzw. Ligatur zur Folge hat, wird noch untersucht (Indolfi et al. 1997, Shimizu et al. 2012).

Der S1PR3 kann also über verschiedene Signalwege Funktionen von vaskulären GMZ beeinflussen, die von pathophysiologischer Bedeutung für die Atherogenese sind (siehe Abschnitt 1.1.4, S. 6). Um die Rolle des S1PR3 für die Atherosklerose zu bestimmen, wurde in einer Studie von Keul et al. die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen in S1PR3- / ApoE-doppel-Knockout-Mäusen analysiert (Keul et al. 2011). Die S1PR3-Defizienz hatte in diesem Modell keine Veränderung der Plaquegröße zur Folge. Interessanterweise konnte jedoch in den Läsionen eine deutliche Reduktion der Monozyten- / Makrophagenzahl im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden. Auch in einem Peritonitismodell mit S1PR3-Knockout-Mäusen war die Rekrutierung von Makrophagen in das entzündete Peritoneum vermindert (Keul et al. 2011). Gleichzeitig wiesen die Makrophagen dieser Mäuse eine niedrigere Expression von inflammatorischen Zytokinen (Tumornekrosefaktor-alpha und Monozyten-chemotaktisches Protein-1) im Vergleich zum Wildtyp auf. Während S1P in vitro auf Wildtyp-Makrophagen chemotaktisch wirkt, konnte dieser Effekt nicht in S1PR3-defizienten Makrophagen gezeigt

werden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der S1PR3 die Rekrutierung von inflammatorischen Monozyten/ Makrophagen fördert (Keul et al. 2011).

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Funktionen, scheint der S1PR3 auch antiinflammatorische und antiatherogene Reaktionen beeinflussen zu können (Nofer et al. 2004, Tölle et al. 2005, Keul et al. 2007). In einer Studie an einem murinen Aortenmodell konnte gezeigt werden, dass der S1PR3 in der Lage ist, über die Aktivierung der eNOS, die NO-abhängige Vasodilatation zu stimulieren (Tölle et al. 2005). Während die Applikation von Fingolimod (siehe Abschnitt 1.2.2.1, S. 12), einem S1PR1/3-Agonisten (bei kurzzeitiger Applikation), in dieser Studie die arterielle Vasodilatation in durch Phenylephrin vorkontrahierte Mauseorten fördern konnte, war dieser Effekt nicht in S1PR3-Knockout-Mäusen zu beobachten (Tölle et al. 2005). Dementsprechend scheint FTY720 über den S1PR3 die NO-Produktion fördern zu können.

2 Zielsetzung

S1P spielt eine wichtige Rolle für diverse physiologische und pathophysiologische Prozesse im Herzkreislaufsystem. S1P vermittelt seine Effekte über verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, den S1P-Rezeptoren. Im humanen Gefäßsystem werden vor allem der S1PR1, der S1PR2 und der S1PR3 exprimiert. Nach Kenntnis des Autors wurde bis dato die Expression der S1P-Rezeptoren im menschlichen Gefäßen nicht in einer größeren Stichprobe untersucht. Weiterhin ist nicht bekannt, ob in Assoziation mit der Atherosklerose sich die Expression der S1PR verändert. Daher werden in dieser Arbeit humane Vollwandproben der A. carotis und der A. iliaca untersucht. Ziel ist es herauszufinden, ob sich die Expressionen der S1PR zwischen der A. carotis und der A. iliaca unterscheiden und ob sich Atherosklerose-spezifische Veränderungen der Expressionen identifizieren lassen. Aus den gewonnenen Erkenntnissen sollen schließlich Rückschlüsse auf mögliche Funktionen der S1P-Rezeptoren in der Atherosklerose gezogen werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Probenmaterial

Die analysierten Gefäßproben der A. carotis und der A. iliaca stammen aus Obduktionen Verstorbener in Zusammenarbeit mit dem Institut für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München. Der Ethikantrag wurde vor Ort genehmigt. Die Obduktionen erfolgten im Zeitraum vom 01.01.2014 – 01.08.2014. Brandleichen, Minderjährige und Verstorbene, deren Tod länger als vier Tage vor der Obduktion eingetreten ist, wurden von der Studie ausgeschlossen.

Im Anschluss an die Entnahme wurden die Proben in Gefäße mit RNAlater (Ambion) überführt und bei 4°C gelagert. Im Labor in Hamburg wurden die Proben bis zur RNA-Isolation bei -80°C gelagert. Aus den Sektionsprotokollen sind Charakteristika der Obduzierten, wie Alter, Geschlecht, Größe, Gewicht und zumeist auch Angaben zu Vorerkrankungen (u.a. Diabetes, Hypertonus, pAVK) bekannt. Insgesamt wurden jeweils Proben der A. carotis communis und der A. iliaca communis aus 101 Probanden aufgearbeitet. Von welcher Körperhälfte die Gefäßproben stammen und ob beispielsweise stenotische Abschnitte mit entnommen wurden, ist nicht bekannt.

3.1.2 Klassifikation des Gefäßstatus im Sektionsprotokoll

Im Sektionsprotokoll wurde der Gefäßstatus jeder Probe der A. carotis und der A. iliaca bezüglich des Gefäßlumens und des Plaquestatus klassifiziert (Tabelle 3). Weiterhin war für jede Probe als anamnestische Angabe der pAVK-Status (Ja / Nein) vorhanden.

Ausprägung	Gefäßlumen	Plaquestatus
0	keine Lumeneinengung	Keine Plaque (makroskopisch)
1	leichte Lumeneinengung	weiche Plaque
2	starke Lumeneinengung	harte Plaque

Tabelle 3: Klassifikation des Gefäßlumens und des Plaquestatus im Sektionsprotokoll

Nach dieser Klassifikation kann jede Probe entsprechend der Ausprägung der Atherosklerose in dem jeweiligen Gefäß eingeteilt werden.

Die Verteilung der Proben entsprechend dieser Einteilung zeigt die Tabelle 4 (S. 18). Hierbei wurden von den 101 analysierten Proben, insgesamt 10 ausgeschlossen, sodass die Gesamtkohorte 91 Proben einschließt (siehe Abschnitt 4.1, S. 27).

Ausprägung	Probenanzahl (in %)			
	A. carotis		A. iliaca	
	Gefäßlumen	Plaquestatus	Gefäßlumen	Plaquestatus
0	76 (83,5)	14 (15,4)	87 (95,6)	81 (89)
1	9 (9,9)	47 (51,6)	0 (0)	2 (2,2)
2	6 (6,6)	30 (33)	4 (4,4)	8 (8,8)

Tabelle 4: Lumen- und Plaquestatus der Gesamtkohorte. „0“, keine Lumeneinengung bzw. makroskopisch keine Plaque; „1“, leichte Lumeneinengung bzw. weiche Plaque; „2“, starke Lumeneinengung bzw. harte Plaque.

3.1.3 Definition und Einteilung der Gruppen

Anhand der oben beschriebenen Klassifikation wurden zwei Gruppen (Carotisplaque- (CP) und pAVK-Gruppe) gebildet.

Einteilung der Carotisplaque-Gruppe

Die Tabelle 5 zeigt die Kriterien für die Einteilung der CP-Gruppe.

	CP(-)	CP(+)
Gefäßstatus der A. carotis	Lumen = 0 Plaques = 0 oder 1	Lumen \geq 1 oder Plaques = 2
<i>Anzahl Proben (in %)</i>	60 (66)	31 (34)

Tabelle 5: Kriterien für die Einteilung der CP-Gruppe

Die CP(+)-Gruppe schließt demnach im Gegensatz zur CP(-)-Gruppe Probanden ein, deren Gefäßstatus der A. carotis eher einem späten Stadium der Atherosklerose mit entsprechend stärkerer Plaqueformation und Lumeneinengung entspricht. Von den 76 Proben der A. carotis ohne Lumeneinengung wiesen 16 harte Plaques auf, so dass diese der CP(+)-Gruppe zugeordnet wurden. Die CP(+)-Gruppe beinhaltet 30 Proben mit einem Plaquestatus=2 (davon 6 Proben mit Lumen=2) und eine Probe mit einem Lumenstatus=1 (und Plaques=1) (Tabelle 4 und Tabelle 5).

Wird im Ergebniskapitel oder in der Diskussion dieser Arbeit von einer Carotisplaque gesprochen, so bezieht sich dies immer auf die gebildete Carotisplaque-Gruppe, nicht auf den makroskopischen Plaquestatus entsprechend des Sektionsprotokolls.

Einteilung der pAVK-Gruppe

Entsprechend der anamnestischen Angabe aus den Unterlagen (z.B. Arztbriefe, Krankenhausdaten etc.) bezüglich des pAVK-Status erfolgte die Einteilung der pAVK-Gruppe: pAVK(-)- (pAVK=nein) und pAVK(+)-Gruppe (pAVK=ja).

Im Gegensatz zur CP-Gruppe, konnte der Gefäßstatus der A. iliaca nicht als Grundlage für die Bildung einer entsprechenden Gruppe für die A. iliaca herangezogen werden: Lediglich 11 Prozent der Proben der A. iliaca wiesen einen veränderten Plaquestatus (1 oder 2) und 4,4 Prozent eine Veränderung des Lumens (1 oder 2) auf.

Definition der Atherosklerose-Score

Die beiden gebildeten Gruppen (CP und pAVK) wurden in einer Atherosklerose-Score zusammengefasst. Hierbei wurde jeder Probe der Gesamtkohorte eine Zahl zugeteilt, die sich aus der Summe der vorhandenen Pathologien ergibt: „0“ für keine Carotisplaque und keine pAVK, „1“ für eine pAVK oder eine Carotisplaque sowie „2“ für eine pAVK und Carotisplaque. Je höher die Ausprägung in dem Score, desto größer ist die Krankheitslast. Die drei beschriebenen Ausprägungen des Atherosklerose-Scores besitzen folgende Verteilung (Tabelle 6):

Score	Probenanzahl (in %)
0	38 (41,8)
1	24 (26,4)
2	29 (31,9)
Gesamt	91 (100)

Tabelle 6: Verteilung der Atherosklerose-Score

Kontrollgruppe

Für Analyse der Assoziationen der S1P-Rezeptoren und möglicher Expressionsunterschiede der S1P-Rezeptoren zwischen der A. carotis und der A. iliaca (Abschnitt 0) wurde die „0“-Gruppe als Kontrollgruppe ausgewählt.

Hierbei ist zu beachten, dass die Probanden der Kontrollgruppe lediglich als CP- und pAVK-negativ klassifiziert wurden und mögliche Komorbiditäten durchaus vorhanden sein können.

3.1.4 Auswahl der klinischen Parameter

Im Sektionsprotokoll wurde jeder Proband durch verschiedene Parameter charakterisiert, wobei folgende Parameter aufgrund ihrer klinischen Signifikanz für diese Arbeit betrachtet wurden: Alter, Geschlecht, BMI, Hypertonus, Diabetes und Nierenstatus (Fruchart 2004, Schiffrin et al. 2007). Dabei handelte es sich beim Hypertonus und Diabetes um anamnestische Angaben entsprechend der Unterlagen. Als auffälliger Nierenstatus wurde

jegliche, in dem Sektionsprotokoll bzw. den Unterlagen beschriebene, Abweichung von der Norm (z.B. Zysten, Schrumpfniere, Niereninsuffizienz) gewertet.

3.1.5 Kits und Geräte

Tabelle 7 gibt eine Übersicht über die Kits, welche für die RNA-Isolation, die cDNA-Synthese und die pPCR verwendet wurden. Auf einzelne Komponenten der Kits und Geräte wird bei der Beschreibung der jeweiligen Methodik eingegangen (siehe Abschnitt 3.2, S. 21).

Name	Komponenten	Hersteller
RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit (50)	RNeasy mini spin columns Collection tubes (1,5 ml) Collection tubes (2 ml) Proteinase K RLT Puffer RW1 Puffer RPE Puffer RNase freies Wasser	Qiagen
RNase-Free DNase Set	DNase I, RNase frei RDD Puffer RNase freies Wasser	Qiagen
Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR	5X Reaction Mix: Reaktionspuffer, dNTPs, oligo (dT) ₁₈ und randomisierte Hexamer-Primer Maxima Enzyme Mix: Maxima Reverse Transkriptase und RiboLock RNase Inhibitor RNase freies Wasser	Thermo Scientific
Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (400)	2x Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix: HotStarTaq®Plus DNA Polymerase Rotor-Gene SYBR Green PCR Buffer dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Qiagen

Tabelle 7: Kits

Die in Tabelle 8 aufgeführten Geräte wurden für die Aufarbeitung und Analyse der Proben verwendet.

Name	Hersteller
TissueLyser® LT	Qiagen
Zentrifuge 5810	Eppendorf
Thermomixer comfort	Eppendorf
Epoch™ Spektralphotometer	BioTek
Thermal Cycler T100™	BioRad
qPCR: Rotor-Gene Q-System	Qiagen

Tabelle 8: Geräte

3.2 Methoden

Für die Analyse der RNA-Expression der S1PR wurde zunächst die RNA aus den Gewebeproben isoliert (siehe Abschnitt 3.2.1) Daraufhin wurde die RNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben (siehe Abschnitt 3.2.2, S. 23), welche schließlich in der qPCR analysiert werden konnte (siehe Abschnitt 3.2.3, S. 23).

3.2.1 RNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung

Für die RNA-Isolation wurde das „RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit“ (Qiagen) verwendet (Tabelle 7, S. 20). Entsprechend des Herstellerprotokolls wurde zunächst ein Teil der Probe (ca. 30 mg) mit einem Mörser unter Zugabe von Flüssigstickstoff zerkleinert (Tabelle 9). Alternativ wurden Proben mit einem TissueLyser® LT (Qiagen) aufgeschlossen.

Name	Hersteller
Flüssiger Stickstoff	TMG Technische und Medizinische Gase GmbH
Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
Ethanol 99 %	Walter CMP GmbH & Co.

Tabelle 9: Reagenzien für die RNA-Isolation

Daraufhin wurden 300 µL Lysepuffer (RLT, Qiagen) und 3 µL β-Mercaptoethanol (β-ME, Verdünnung 1:100) hinzugegeben. Nach einem 30-minütigen Proteinase-K-Verdau des Gewebes bei 56°C wurde die Probe für drei Minuten zentrifugiert. Alle durchgeführten Zentrifugationsschritte erfolgten bei 10.000 g.

Der Überstand (ca. 900 µL) wurde nun in ein neues Gefäß überführt, mit 450 µL 99%-Ethanol versetzt und 700 µL auf eine Silica-Gel-Membran-Säule (RNeasy Mini column, Qiagen) gegeben. Sodann wurde die Säule für eine Minute zentrifugiert. Dieser Zentrifugationsschritt wurde mit dem verbleibenden Überstand (ca. 650 µL) wiederholt. Nun wurden 350 µL eines Waschpuffers (RW1, Qiagen) auf die Säule gegeben und erneut für 60 Sekunden zentrifugiert. Daraufhin erfolgte ein 30-minütiger DNase-Verdau zum Entfernen anhaftender genomischer DNA. Anschließend wurden erneut 350 µL des RW1-Puffers auf die Säule pipettiert und für 60 Sekunden zentrifugiert. Entsprechend folgten zwei weitere Zentrifugationen (60 bzw. 120 Sekunden) mit jeweils 500 µL eines weiteren Waschpuffers (RPE, Qiagen). Zusätzlich wurde eine Leerzentrifugation mit einem neuen Sammelröhrchen (collection tube) durchgeführt. Im letzten Schritt wurde die an der Membran der Säule gebundene RNA mit 50 µL RNase-freiem Wasser eluiert. Bis zur cDNA-Synthese wurde das RNA-Isolat bei -80°C gelagert.

Die Messung der Konzentration und der Reinheit der isolierten RNA erfolgte mit einem Epoch™ Spektralphotometer (BioTek). Auf eine Mikroplatte wurde jeweils 2 µL des isolierten RNA-Eluats gegeben. Bei jeder Messung wurde die Extinktion des Lichts bei 260 nm, 280 nm und 320 nm (interne Referenz des Photometers) Wellenlänge, der 260/280-Quotient sowie die Konzentration (in ng/µL) bestimmt. Hierbei lässt sich die RNA-Konzentration mittels der Extinktion bei 260 nm und dem Lambert-Beerschen Gesetz errechnen (Richter 2003):

$$E = \varepsilon \times c \times d$$

mit:

E = gemessene Extinktion,

ε = substratspezifischer Extinktionskoeffizient,

c = Konzentration der absorbierenden Substanz,

d = Schichtdicke der Küvette (hier 1 cm).

Für den Extinktionskoeffizienten der Einzelstrang-RNA gilt: Eine Extinktion bei 260 nm von 1 entspricht der RNA-Konzentration von 40 µg/ml ($1 E_{260\text{nm}} = 40 \mu\text{g RNA/ml}$) (Carson et al. 2012). Daraus ergibt sich für die Konzentration:

$$c = \frac{E}{\varepsilon \times d}$$

RNA-Qualitätskriterien

Proben, die folgende Kriterien nicht erfüllen, wurden ausgeschlossen: RNA-Konzentration < 5 ng/µL oder 260/280-Quotient zwischen 1,8 und 2,8.

Bei der Konzentrationsbestimmung der RNA-Eluate im Spektralphotometer wurde neben der Konzentration (ng/µL) und der Messung bei 320 nm (interne Referenz) ebenfalls der 260/280-Quotient bestimmt. Bei 260 nm besitzen Nukleinsäuren, bei 280 nm Proteine ihr Absorptionsmaximum. Das Verhältnis der Extinktion bei 260 nm und der Extinktion bei 280 nm dient der Beurteilung der Reinheit der RNA. Ein Verhältnis von $\approx 2,0$ spricht für eine reine RNA-Isolierung, wohingegen ein Quotient von $\approx 1,8$ eine reine DNA-Isolierung anzeigt. Abnormale 260/280-Quotienten können unter anderem durch Kontamination mit Proteinen, Phenolen oder Guanidin Isothiocyanat (Bestandteil des RLT-Puffers) verursacht werden. Sehr niedrige RNA-Konzentrationen (<10 ng/µL) können ebenfalls zu abweichenden Werten führen (Chomczynski und Sacchi 2006).

3.2.2 cDNA-Synthese mittels reverser Transkription

Für die cDNA-Synthese wurde das „Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR“ (Thermo Scientific) verwendet. Entsprechend des Herstellerprotokolls wurde folgender Reaktionsansatz verwendet (Tabelle 10).

Reagenz	Volumen
5X Reaction Mix (Reaktionspuffer, dNTPs, oligo (dT) und randomisierte Hexamer-Primer)	4 μ L
Maxima Enzyme Mix (Maxima Reverse Transkriptase und RiboLock RNase Inhibitor)	2 μ L
RNA-Matrize	1 pg - 5 μ g
RNase-freies Wasser	auf 20 μ L
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>20 μL</i>

Tabelle 10: Pipettierschema der cDNA-Synthese für die qPCR

Für die Synthese wurde 200 ng RNA eingesetzt. Bei zu geringer RNA-Konzentration der Probe (<200 ng) wurden 14 μ L des RNA-Isolats verwendet. Die Inkubation des Ansatzes und die Synthese der cDNA erfolgte mittels Thermal Cycler T100™ (Bio Rad). Die Probe wurde zunächst für 10 min bei 25°C inkubiert und für 30 min auf 50°C erhitzt. Anschließend erfolgte die Termination der Reaktion für 5 min bei 85°C. Bis zur qPCR-Analyse wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

3.2.3 Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR)

3.2.3.1 Bestimmung der Expression der S1P-Rezeptoren mittels qPCR

Die mRNA-Expression der S1P-Rezeptoren S1PR1, S1PR2 und S1PR3 wurden durch qPCR-Analysen der generierten cDNA aus den entsprechenden arteriellen Geweben bestimmt, wobei die Expression der GAPDH als interner Standard verwendet wurde. Die verwendeten Primer sind im Abschnitt „Primer“ aufgelistet. Nach der Messung wurde für jeden Reaktionsansatz eine Dissoziationskurve aufgenommen. Die qPCR-Analysen erfolgten mit dem Rotor-Gene Q-System (Qiagen).

Der Schwellenwert wurde jeweils in den linearen Bereich der exponentiellen Funktion im Fluoreszenz-CT-Diagramm gesetzt. Die Primerkonzentration von 0,5 μ M wurde so gewählt, dass eine Verdopplung der Konzentration, bei definierter Template-Menge, zu keiner Veränderung der CT-Werte führt. Die Verdopplung der eingesetzten Template-Menge führt unter diesen Bedingungen zu einer Verringerung um einen CT-Wert.

Für jede qPCR wurden zunächst je vier Ansätze (Mastermix) mit den entsprechenden Primern der zu analysierenden Gene (GAPDH, S1PR1, S1PR2, S1PR3) nach folgendem Pipettierschema hergestellt (Tabelle 11):

Reagenz	Volumen
RNase-freies Wasser	3 μ L
qPCR-Primer (Konzentration: 0,5 μ M): GAPDH, S1PR1, S1PR2 oder S1PR3	1 μ L
Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix	5 μ L
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>9 μL</i>

Tabelle 11: Pipettierschema eines Mastermix für eine Probe

Alle Ansätze wurden in Triplikaten pipettiert. Bei jeder Messreihe wurden sowohl eine Negativkontrolle als auch eine Positivkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle wurde eine Mischung der vier PCR-Fragmente (Endkonzentration jeweils 80 pg/ml) verwendet. Als Negativkontrolle erfolgte zusätzlich ein Ansatz mit RNase-freiem Wasser.

Jedes Reaktionsgefäß (10 μ L) des 72-Well-Rotors wurde wie folgt angesetzt (Tabelle 12):

Probe (in Triplikaten)	Standard (in Duplikaten)	H ₂ O
Je 9 μ L Mastermix + 1 μ L cDNA	Je 9 μ L Mastermix + 1 μ L cDNA	Je 9 μ L Mastermix + 1 μ L H ₂ O

Tabelle 12: Pipettierschema des qPCR-Ansatzes

Die qPCR-Reaktion erfolgte in den nachstehenden Schritten (Tabelle 13):

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklus
Initiale Denaturierung	95°C	100 s	} 40 Wiederholungen
Denaturierung	95°C	10 s	
Annealing	60°C	15 s	
Elongation	72°C	20 s	
Schmelzkurve	72°C – 95°C		

Tabelle 13: Reaktionsprofil für die qPCR

3.2.3.2 Primer

Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
S1PR1	ATCATGGGCTGGAAGTGCATCA, 5'M-S1PR1-535	CGAGTCCTGACCAAGGAGTAGAT, 3'M-S1PR1-672
S1PR2	CAGACGCTAGCCCTGCTCAAGA, 5'M-S1PR2-708	TAGTGGGCTTTGTAGAGGA, 3'M-S1PR2-826
S1PR3	ACAACCGCATGTACTTTTTTCAT, 5'M-S1PR3-215	TACTGCCCTCCCTGAGGAACCA, 3'M-S1PR3-334
GAPDH	5'-TCCTGCACCACCAACTGCTT-488	3'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-592

Tabelle 14: Sequenzen der verwendeten Primerpaare für die qPCR

3.2.3.3 Analyse der qPCR-Daten

Die Auswertung der qPCR-Messungen erfolgte mit der Δ Ct-Methode (Livak und Schmittgen 2001), wobei die GAPDH-Messungen als interner Standard verwendet wurden.

Der Mittelwert der CT-Werte der Triplikate wurde gebildet und in die folgende Formel eingesetzt:

$$\text{S1P-Rezeptor-Expression (in \% GAPDH)} = 2^{-\text{CT (Zielgen)} - \text{CT (GAPDH)}} * 100$$

Die Verdopplung der eingesetzten Template-Menge (mRNA) führt zu einer Verringerung um einen CT-Wert. So kann über die relative Menge an mRNA auf die Expression des jeweiligen Gens geschlossen werden.

Für jede durchgeführte Messung wurden ebenfalls Dissoziationskurven aufgezeichnet. Hierbei misst das Gerät die Schmelztemperatur, bei der die Primer wieder vom Template dissoziieren. Bindet ein Primer ein nicht exakt komplementäres Amplifikationsprodukt, so ist die Bindung weniger fest als bei einem komplementären Template. Unspezifisch gebundene Primer besitzen eine niedrigere Dissoziationstemperatur. Daher wurden die Dissoziationskurven auf einzelne Peaks kontrolliert, um eventuelle unspezifische Amplifikate zu erkennen. Alle Reaktionen mit mehreren Peaks wurden ausgeschlossen.

Die Auswertung der qPCR-Messungen wurde mit der Software Rotor-Gene, Version 2.1.0.9 (Qiagen) und Microsoft Excel 2013 durchgeführt.

qPCR-Qualitätskriterien

Die nachfolgenden Kriterien wurden für die Qualität der qPCR-Messungen festgelegt.

Die Ansätze der analysierten Gene in der qPCR wurden in Triplikaten pipettiert. Für jedes Triplikat wurden, aus den gemessenen CT-Werten, der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt. Proben, deren Triplikate, trotz wiederholter Messung, eine Standardabweichung von $> 0,5$ zeigten, wurden nicht für die Auswertung berücksichtigt.

Bei Standardabweichungen der Positivkontrollen (PCR-Fragment-Mix, in Duplikaten) von $> 0,5$ in mehr als einem Ansatz wurde die Messung wiederholt. Bei positiven Negativkontrollen (H_2O) in mehr als einem Ansatz wurde die Messung ebenfalls erneut durchgeführt.

3.2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und das Erstellen der Abbildungen erfolgten mit Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA). Für die Vergleiche der Gruppen wurde der t-Test (zweiseitig, gepaart, sofern möglich) durchgeführt. Ein P-Wert von $P < 0,05$ wurde als signifikant angesehen. Bei einem Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde eine einfaktorier ANOVA und ggf. post-hoc-Test (Tukey, $\alpha = 0,5$) durchgeführt.

Die Regressionsanalyse erfolgte mit dem Programm R (R Core Team 2015) durch Gerhard Schön (Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf). Als abhängige Variablen wurden die CP- und pAVK-Gruppe sowie die Atherosklerose-Score definiert. Da es sich bei CP und pAVK um dichotome Variablen handelt, wurde diese mittels logistischer Regression analysiert. Die Atherosklerose-Score hingegen ist eine metrische Variable, die durch lineare Regression analysiert wurde. Für die unabhängigen Variablen wurden mittels t-Test die klinischen Parameter zwischen der pAVK(-)- und die pAVK(+)-Gruppe bzw. der CP(-)- und die CP(+)-Gruppe verglichen und diejenigen Parameter, welche keine signifikanten Unterschiede zeigten nicht für die weitere Analyse betrachtet. Folgenden Parameter wurden als unabhängige Variablen für die Regressionsanalysen gewählt: Alter, Geschlecht, Hypertonus, Diabetes, pathologischer Nierenstatus, logarithmierte Expression des S1PR1, des S1PR2 und des S1PR3 in der A. iliaca und in der A. carotis.

Für alle untersuchten Gruppen erfolgte die Regressionsanalyse in folgenden Schritten: Zunächst wurde in einem Gesamtmodell, welches alle unabhängigen Variablen einschließt, die Regressionsanalyse durchgeführt und die Parameter nach den P-Werten sortiert. Anschließend wurden schrittweise diejenigen Variablen mit dem höchsten P-Wert aus dem Modell entfernt (Rückwärtselimination) und das Modell erneut berechnet. Dies geschah so lange, bis alle nicht signifikanten Variablen eliminiert wurden und das finale Modell somit nur signifikante Variablen beinhaltete.

4 Ergebnisse

4.1 Beschreibung der Studiengruppen

Für diese Arbeit wurden Gewebeproben der A. carotis und der A. iliaca von 101 verstorbenen Probanden untersucht. Aufgrund der angelegten Qualitätskriterien (siehe Abschnitt 3.2.1, S. 22 und 3.2.3.3 S. 25) wurden 10 Proben von der Untersuchung ausgeschlossen. Für die weitere Analyse der Expression von S1PR1, S1PR2 und S1PR3 in der A. carotis und A. iliaca wurden daher die Proben von 91 Probanden berücksichtigt.

Charakteristika der Carotisplaque- und der pAVK-Gruppe

51 Patienten wurden der pAVK(+)-Gruppe zugeordnet, 31 der CP(+)-Gruppe, wobei sich die Gruppen überschneiden (siehe unten). Die gebildeten Gruppen wurden anhand der folgenden klinischen Parameter charakterisiert: Alter, männliches Geschlecht, Body-Mass-Index (BMI), Hypertonus, Diabetes und pathologischer Nierenstatus. Um zu überprüfen, inwiefern sich diese Parameter mit dem jeweiligen Krankheitsbild verändern, wurde die CP(+)- bzw. die pAVK(+)-Gruppe mit der entsprechenden Referenzgruppe (CP(-) bzw. pAVK(-)) verglichen (Tabelle 15).

	Gesamtkohorte	pAVK(+)	pAVK(-)	CP(+)	CP(-)
Probenanzahl	91	51	40	31	60
Alter (Jahre)					
Min-Max	19-101	46-101	19-82	53-101	19-86
Mittelwert ± SD	61 ± 17,9	70 ± 11,7***	49 ± 17	73 ± 10,6***	54 ± 17,6
Männl. Geschlecht	54/91 (59,3%)	31/51 (60,8%)	23/40 (57,5%)	16/31 (51,6%)	38/60 (63,3%)
BMI (kg/m²)					
Mittelwert ± SD	26,8 ± 7,1	27,6 ± 7,8	25,7 ± 5,9	26,9 ± 8,0	26,7 ± 6,6
Hypertonus	20/91 (22%)	18/51 (35,3%)*	2/40 (5%)	13/31 (41,9%)*	7/60 (11,7%)
Diabetes	11/91 (12,1%)	11/51 (21,6%)*	0/40 (0%)	7/31 (22,6%)*	4/60 (6,7%)
pathologischer Nierenstatus	45/91 (49,5%)	34/51 (66,7%)*	11/40 (27,5%)	21/31 (67,7%)*	24/60 (40%)

Tabelle 15: Charakterisierung der gebildeten Gruppen anhand ausgewählter klinischer Parameter. Die Analyse der Gruppenunterschiede erfolgte mittels zweiseitigem, nicht gepaarten t-Test jeweils im Vergleich zur nebenstehenden Referenzgruppe. BMI, Body-Mass-Index; SD, Standardabweichung; *P<0,05;**P<0,01;***P<0,001.

Probanden mit einer pAVK bzw. einer CP waren signifikant älter als die jeweilige Referenzgruppe. Ebenso wiesen Patienten mit pAVK bzw. CP signifikant häufiger eine Hypertonie, einen Diabetes und einen pathologischen Nierenstatus auf. Bezüglich des Geschlechts und des BMI gab es keine Unterschiede in Probanden mit CP und pAVK.

Da die Carotisplaque (CP+)- und die pAVK-Gruppe (pAVK+) nicht unabhängig voneinander sind, wurde untersucht, inwiefern sich diese Gruppen überschneiden. Es zeigte sich, dass der überwiegende Teil der Probanden mit einer Carotisplaque ebenfalls eine pAVK aufwies (29 von 31, 93 Prozent). Umgekehrt wiesen 57 Prozent der Probanden (29 von 51) mit pAVK eine Carotisplaque auf (Tabelle 16).

Bei der Analyse der einzelnen Gruppen muss demnach die hohe Komorbidität mit der jeweilig anderen Pathologie in Betracht gezogen werden. So ist in dieser Studie die Interpretation von Effekten eines Carotisplaques auf die Expression der S1P-Rezeptoren quasi nur mit dem Hintergrund einer pAVK möglich (Tabelle 16).

pAVK-Gruppe	Probenanzahl (%)		
	CP-Gruppe		Gesamt
	CP(-)	CP(+)	
pAVK(-)	38 (41,8)	2 (2,2)	40 (44)
pAVK(+)	22 (24,2)	29 (31,9)	51 (56)
<i>Gesamt</i>	<i>60 (65,9)</i>	<i>31 (34,1)</i>	<i>91 (100)</i>

Tabelle 16: Überschneidungen der Carotisplaque- und der pAVK-Gruppe

Auf Grund dieser Beobachtung wurde ein Atherosklerose-Score eingeführt (siehe Abschnitt 3.1.3, S. 18). Ein Vergleich der drei Gruppen der Atherosklerose-Score hinsichtlich klinisch relevanter Parameter zeigt, dass der prozentuale Anteil von Probanden mit den bekannten Risikofaktoren Alter, Hypertonus, Diabetes und Nierenstatus mit dem Atherosklerose-Score ansteigt. Nur für das männliche Geschlecht gilt dieses nicht, hier sank der Anteil von Männern in Gruppe „1“ von 62,5 Prozent auf 55,2 Prozent in Gruppe „2“. Für die Parameter Alter, Hypertonus und pathologischer Nierenstatus konnte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) die Signifikanz dieser Verteilungen bestätigt werden (Tabelle 17).

	Atherosklerose-Score			Signifikanzen
	0 CP (-) und pAVK(-)	1 CP(+) oder pAVK(+)	2 CP(+) und pAVK(+)	
Probenanzahl	38	24	29	
Alter (Jahre)				<0,001***
Min-Max	19-82	46-86	53-101	
Mittelwert ± SD	48 ± 16,1	68 ± 11,9	74 ± 10,9	
Männl. Geschlecht	23/38 (60,5%)	15/24 (62,5%)	16/29 (55,2%)	n.s.
BMI (kg/m²)				n.s.
Mittelwert ± SD	25,9 ± 6	27,8 ± 7,2	27,2 ± 8,2	
Hypertonus	1/38 (2,6%)	7/24 (29,2%)	12/29 (41,4%)	<0,001***
Diabetes	0/38 (0%)	4/24 (16,7%)	7/29 (24,1%)	n.s.
Path. Nierenstatus	10/38 (26,3%)	15/24 (62,5%)	20/29 (69%)	<0,001***

Tabelle 17: Charakterisierung der Gruppen des Atherosklerose-Scores anhand klinisch relevanter Parameter. Der Vergleich der Gruppen bezüglich Parameter erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA. BMI, Body-Mass-Index; SD, Standardabweichung; n.s., nicht signifikant; ***P<0,001.

4.2 Analyse der S1P-Rezeptor-Expression in der A. carotis und A. iliaca

Die Expression der S1P-Rezeptoren S1PR1, S1PR2 und S1PR3 in der A. carotis und der A. iliaca wurde mittels qPCR gemessen (siehe Abschnitt 3.2.3, S. 23). Da die originalen Expressionsdaten nicht normalverteilt sind, wurden diese logarithmiert (natürlicher Logarithmus, ln) (Altman 1995). Voraussetzung für die statistische Auswertung in dieser Arbeit war eine annähernde Normalverteilung der Daten. Alle nachfolgenden Analysen wurden daher mit logarithmierten Werten durchgeführt. Exemplarisch sind die Histogramme der Expressionsdaten der S1P-Rezeptoren in der A. iliaca vor und nach dem Logarithmieren gezeigt (Abbildung 5).

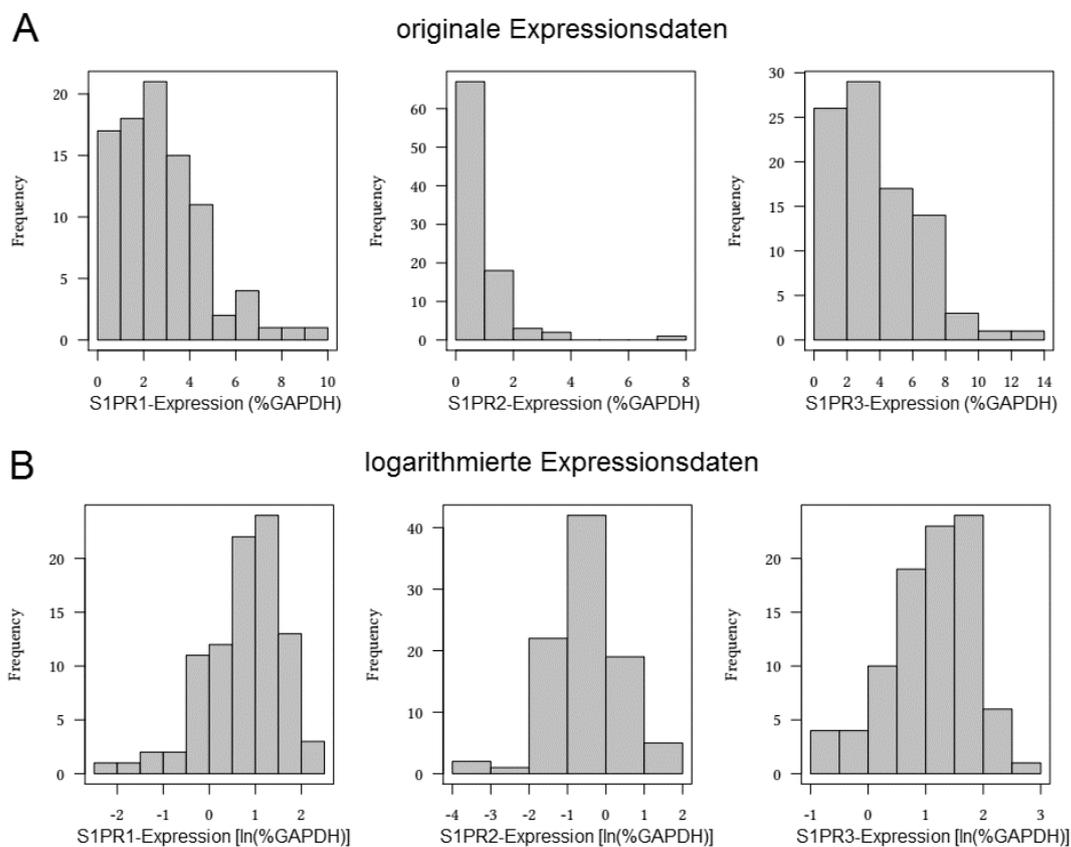


Abbildung 5: Histogramme der originalen und der logarithmierten Expressionsdaten des S1PR1, S1PR2 und S1PR3 in der A. iliaca. Gezeigt sind die Häufigkeitsverteilungen der originalen (A) und logarithmierten Expressionsdaten (B) der untersuchten S1P-Rezeptoren.

4.2.1 Analyse der S1P-Rezeptor-Expression in der Kontrollgruppe

Zunächst wurde die Expression der S1PR in der A. carotis und A. iliaca in der Kontrollgruppe, welche Probanden ohne CP und ohne pAVK beinhaltet analysiert (N=38).

Vergleich der S1P-Rezeptor-Expression zwischen der A. carotis und der A. iliaca

Die Expression des S1PR1 und S1PR2 in der A. carotis ist gegenüber der A. iliaca signifikant niedriger. Für den S1PR3 konnte diese Beobachtung nicht gemacht werden (Abbildung 6).

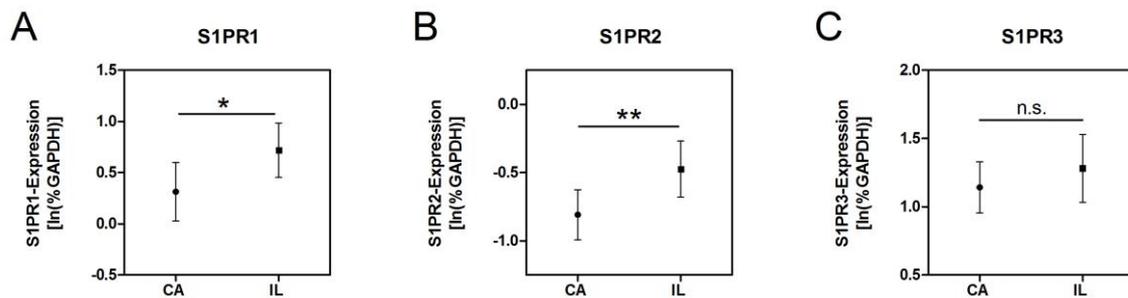


Abbildung 6: Expression des S1PR1, S1PR2 und S1PR3 in A. carotis und A. iliaca der Kontrollgruppe. Die Analyse der Expressionsunterschiede zwischen den beiden Gefäßen erfolgte mittels gepaartem, zweiseitigen t-Test (N=38). Gezeigt sind Mittelwerte +/- 95% KI. CA, A. carotis; IL, A. iliaca; n.s., nicht signifikant; *P<0,05, **P<0,01.

4.2.1.1 Einfluss des Alters und des Geschlechts auf die S1P-Rezeptor-Expression

In der Kontrollgruppe konnte kein signifikanter Einfluss des Geschlechts auf die Expression der einzelnen S1PR in beiden Gefäßabschnitten festgestellt werden (Abbildung 7).

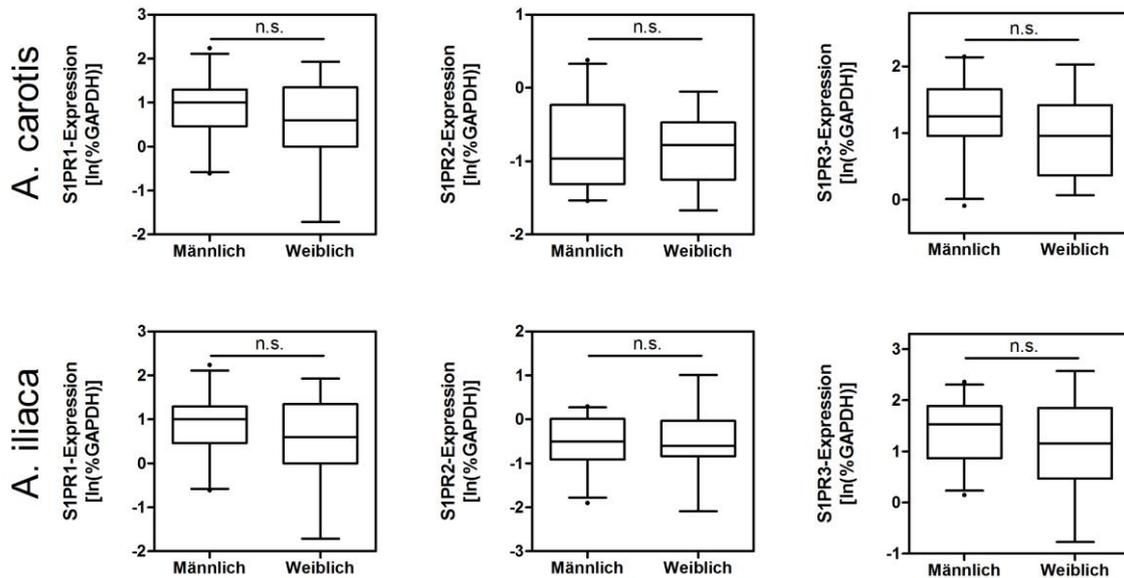


Abbildung 7: Geschlechtsunterschiede der Expression des S1PR1, S1PR2 und S1PR3 in A. carotis und A. iliaca der Kontrollgruppe. Die Geschlechtsunterschiede (männl. N=23, weibl. N=15) wurden in beiden Gefäßen mittels ungepaartem, zweiseitigen t-Test analysiert. Gezeigt sind Box-Plots mit Whiskern (5.-95, Perzentile). n.s., nicht signifikant.

Für die Untersuchung der Altersabhängigkeit der S1P-Rezeptor-Expression, wurde zunächst der Altersmedian ermittelt (49 Jahre). Daraufhin wurde die Expression der einzelnen Rezeptoren in der A. carotis und der A. iliaca zwischen jüngeren (<49 Jahre) und älteren (>49 Jahre) Probanden miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass die älteren Probanden im Mittel eine verminderte Expression des S1PR3 in der A. carotis aufweisen (Abbildung 8, S. 32).

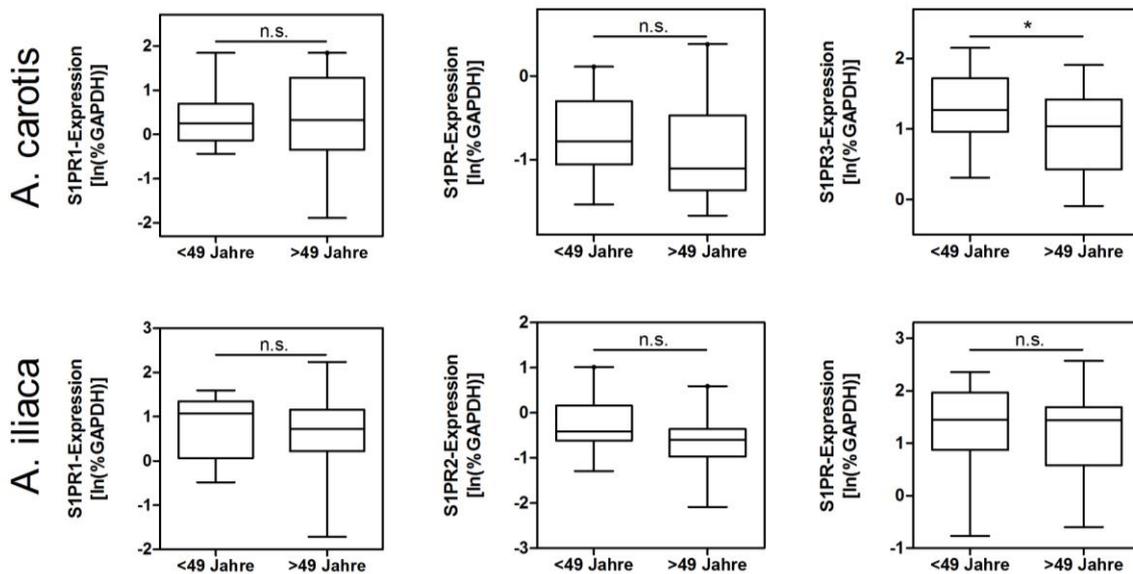


Abbildung 8: Mediane Altersunterschiede der S1PR3-Expression in der A. carotis der Kontrollgruppe. Die Expressionsunterschiede anhand des Medianalters wurden mittels ungepaartem, zweiseitigen t-Test analysiert (N=38). Gezeigt sind Box-Plots mit Whiskern (5.-95, Perzentile). n.s., nicht signifikant; *P<0,05.

Um diese Altersveränderungen näher zu untersuchen, wurden lineare Regressionsanalysen durchgeführt. Die Analysen der Expression der S1P-Rezeptoren S1PR1, S1PR2 und S1PR3 in der A. carotis ergaben, dass mit steigendem Alter ebenfalls die Expression des S1PR3 abnimmt. In der A. iliaca war die S1PR2-Expression negativ mit dem steigenden Alter korreliert. Die signifikanten Altersassoziationen sind in Abbildung 9 dargestellt.

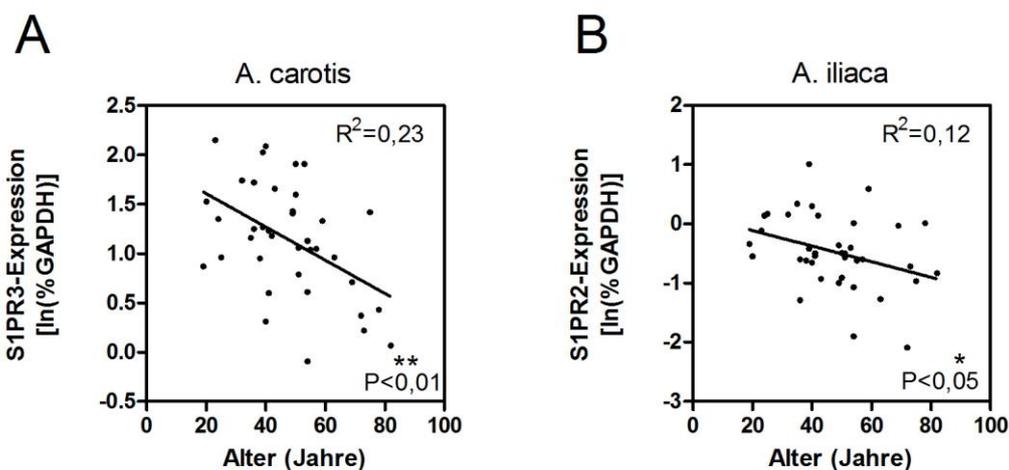


Abbildung 9: Altersabhängigkeit der S1P-Rezeptoren S1PR1, S1PR2 und S1PR3 in der A. carotis und A. iliaca der Kontrollgruppe. Die Analyse der Altersassoziationen der S1PR erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse (N=38). *P<0,05, **P<0,01.

4.2.1.2 Untersuchung der Korrelation zwischen der Expression der S1P-Rezeptoren

Im Folgenden wird untersucht, inwiefern die Expression eines individuellen S1P-Rezeptors mit der Expression eines anderen S1P-Rezeptors in Zusammenhang steht. Hierzu werden zunächst die Assoziationen der S1PR innerhalb der A. carotis bzw. der A. iliaca (intravaskuläre Assoziationen) und im Weiteren zwischen den beiden Gefäßen (intervaskuläre Assoziationen) analysiert.

Zur Untersuchung der intravaskulären Assoziationen in der A. carotis wurden die entsprechenden Expressionswerte mittels linearer Regression analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Expression des S1PR1 und des S1PR2 miteinander korrelieren, der S1PR3 jedoch nicht. (Tabelle 18, Abbildung 10)

A. carotis	A. carotis		
	S1PR1	S1PR2	S1PR3
S1PR1	/	<0,001***	n.s.
S1PR2	<0,001***	/	n.s.
S1PR3	n.s.	n.s.	/

Tabelle 18: Intravaskuläre Assoziationen der S1P-Rezeptoren. S1PR1, S1PR2 und S1PR3 in der A. carotis der Kontrollgruppe. n.s., nicht signifikant; ***P<0,001.

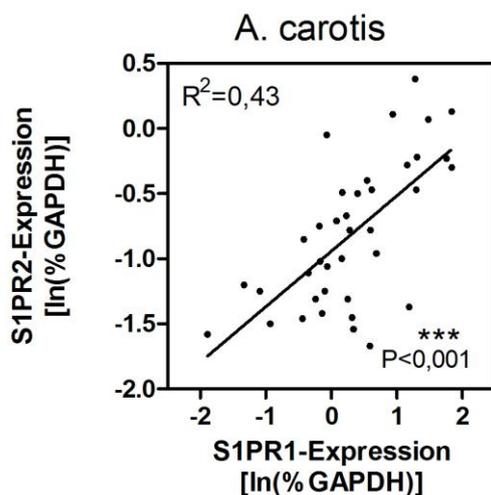


Abbildung 10: Intravaskuläre Assoziation der Expression des S1PR1 und S1PR2 in der A. carotis der Kontrollgruppe. Die Analyse der Korrelation der S1P-Rezeptoren erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse (N=38). ***P<0,001.

Analog zu der A. carotis ergab sich auch für die A. iliaca, dass die Expression des S1PR1 und des S1PR2 miteinander korreliert, während der S1PR3 unabhängig von diesen Rezeptoren ist (Tabelle 19, Abbildung 11, S. 34).

A. iliaca	A. iliaca		
	S1PR1	S1PR2	S1PR3
S1PR1	/	<0,001***	n.s.
S1PR2	<0,001***	/	n.s.
S1PR3	n.s.	n.s.	/

Tabelle 19: Intravaskuläre Assoziationen der S1P-Rezeptoren S1PR1, S1PR2 und S1PR3 in der A. iliaca der Kontrollgruppe. n.s., nicht signifikant; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001.

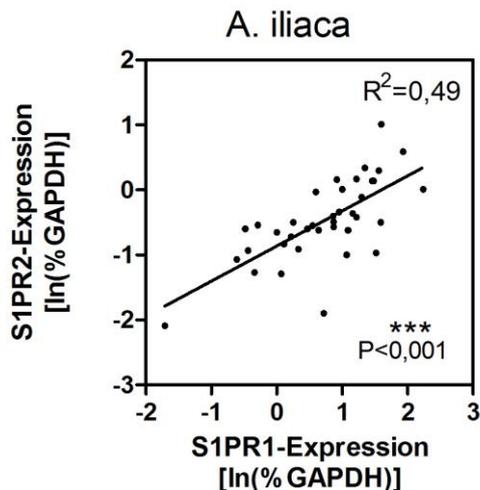


Abbildung 11: Intravaskuläre Assoziationen der Expression des S1PR1 und S1PR2 in der A. iliaca der Kontrollgruppe. Die Analyse der Korrelationen der S1P-Rezeptoren erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse (N=38). ***P<0,001.

Intervaskuläre Assoziationen der S1P-Rezeptor-Expression

Neben den Assoziationen innerhalb eines Gefäßes, könnten die Expressionen der S1PR auch zwischen den untersuchten Gefäßen korrelieren. Nachfolgend wurde daher untersucht, inwiefern die Expression eines S1P-Rezeptors in der A. carotis die Expression dieses Rezeptors in der A. iliaca bedingt (intervaskuläre Assoziationen). Die durchgeführten linearen Regressionsanalysen ergaben, dass Expression des S1PR1 und des S1PR2 in der A. carotis nicht mit dem jeweiligen Rezeptor in der A. iliaca assoziiert ist. Im Gegensatz hierzu besteht eine signifikante Korrelation zwischen der Expression des S1PR3 in der A. carotis mit der Expression des S1PR3 in der A. iliaca (Tabelle 20, Abbildung 12, S. 35).

A. carotis	A. iliaca		
	S1PR1	S1PR2	S1PR3
S1PR1	n.s.	/	/
S1PR2	/	n.s.	/
S1PR3	/	/	<0,01**

Tabelle 20: Intervaskuläre Assoziationen der S1P-Rezeptoren S1PR1, S1PR2 und S1PR3 zwischen der A. carotis und der A. iliaca der Kontrollgruppe. n.s., nicht signifikant; **P<0,01.

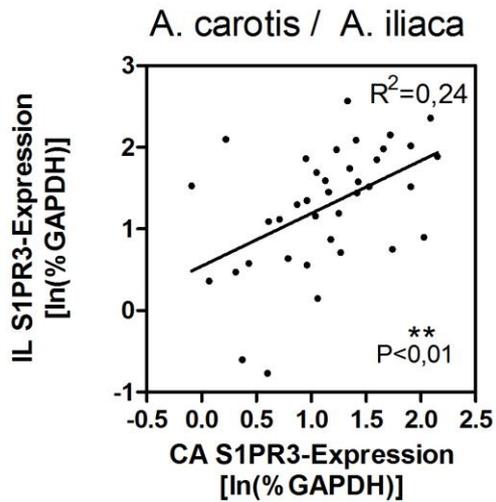


Abbildung 12: Intervaskuläre Assoziationen des S1PR3 zwischen der A. carotis und der A. iliaca. Die Analyse der Korrelationen der S1P-Rezeptoren erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse (N=38). CA, A. carotis; IL, A. iliaca; **P<0,01.

Zusammenfassend ergaben die Untersuchungen, dass innerhalb der A. carotis bzw. der A. iliaca die Expressionen des S1PR1 und des S1PR2 korrelieren. Im Gegensatz hierzu ist die Expression des S1PR3 gefäßübergreifend assoziiert.

4.3 Analyse der S1P-Rezeptor-Expression in Probanden mit Carotisplaque

Nach der Analyse der S1P-Rezeptor-Expression in der Kontrollgruppe wird im Folgenden die Expression der S1P-Rezeptoren in Abhängigkeit von der CP (dieser Abschnitt), der pAVK (siehe Abschnitt 4.4, S. 37) und dem Atherosklerose-Score (siehe Abschnitt 4.6, S. 38) untersucht.

Die Expression der S1P-Rezeptoren in der A. carotis war unabhängig vom CP-Status (Abbildung 13).

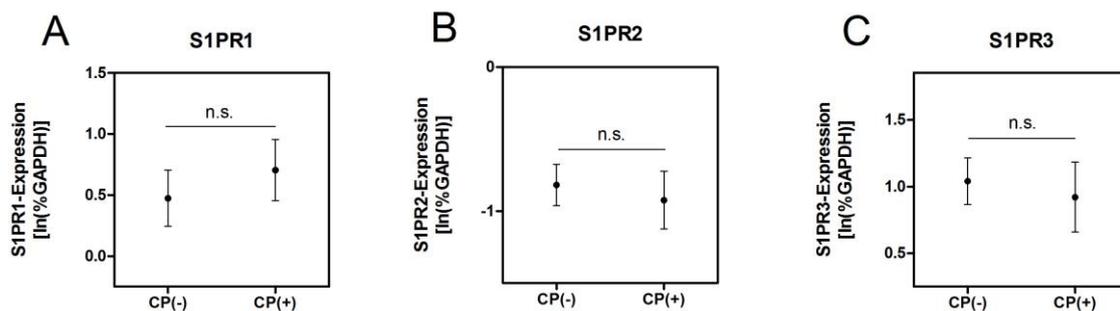


Abbildung 13: Expressionen der S1P-Rezeptoren S1PR1, S1PR2, S1PR2 in der A. carotis der CP-Gruppe. Die Analyse der Expressionsunterschiede erfolgte mittels ungepaartem, zweiseitigen t-Test (N=38). Gezeigt sind Mittelwerte +/- 95% KI. n.s., nicht signifikant.

Bei der Untersuchung der S1P-Rezeptor-Expression in der CP-Gruppe wurde die A. iliaca nicht einbezogen. Der Grund hierfür liegt in der deutlichen Überschneidung der CP- und der pAVK-Gruppe: Probanden mit einer CP wiesen zu 93 Prozent ebenfalls eine pAVK auf. Daher entspricht die CP-Gruppe weitestgehend der Gruppe „2“ der Atherosklerose-Score (siehe Abschnitt 3.1.3, S. 18). Auf mögliche Veränderungen der S1P-Rezeptor-Expression in der A. iliaca in Probanden mit pAVK und CP (Gruppe „2“) im Vergleich zu Probanden mit pAVK ohne CP (entspricht annähernd Gruppe „1“) wird bei der Untersuchung der Expression der S1PR mit der Atherosklerose-Score eingegangen.

4.4 Analyse der S1P-Rezeptor-Expression in Probanden mit pAVK

Während der CP-Status keinen Einfluss auf die Expression der Rezeptoren gezeigt hatte, konnte für Probanden mit pAVK festgestellt werden, dass die Expression des S1PR1 in der A. carotis signifikant erhöht ist (Abbildung 14 A). Für den S1PR3 zeigte sich, dass dieser Rezeptor sowohl in der A. carotis, als auch in der A. iliaca weniger in Probanden mit pAVK exprimiert wird (Abbildung 14 C). Allerdings ist diese Reduktion nicht statistisch signifikant. Die übrigen Rezeptoren wiesen keine signifikanten Unterschiede auf.

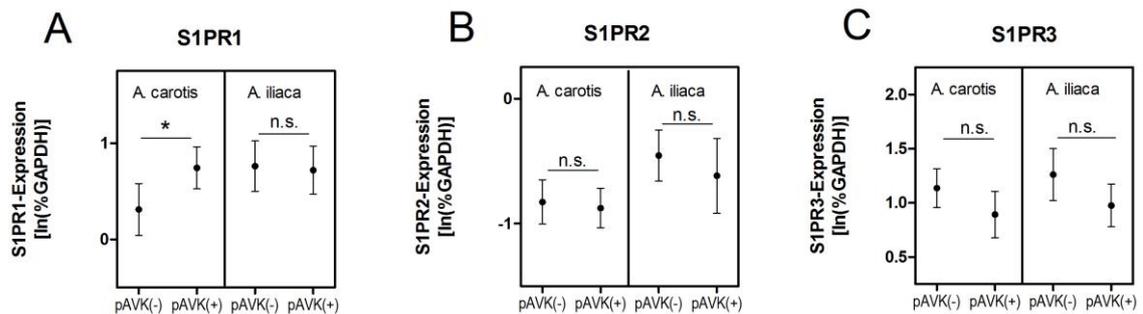


Abbildung 14: Expression der S1P-Rezeptoren S1PR1, S1PR2, S1PR2 in der A. iliaca und A. carotis in den pAVK-Gruppe. Die Analyse der Expressionsunterschiede erfolgte mittels ungepaartem, zweiseitigen t-Test (N=51). Gezeigt sind Mittelwerte +/- 95% KI. n.s., nicht signifikant. *P<0,05.

4.5 Veränderungen der S1P-Rezeptor-Expression in Abhängigkeit vom Atherosklerose-Score

Wie in Abschnitt 4.1 (S. 27) beschrieben, wurde aufgrund der Überschneidungen der CP- und pAVK-Gruppen ein Atherosklerose-Score eingeführt. Im Folgenden wurde untersucht, ob sich die Expression der S1PR in der A. carotis und der A. iliaca in Abhängigkeit vom Atherosklerose-Score verändert. Hierzu wurden einfaktorielle ANOVA-Analysen mit Post-Hoc-Test nach Tukey durchgeführt. Es zeigten sich keine signifikanten Expressionsunterschiede der untersuchten S1P-Rezeptoren in der A. carotis und in der A. iliaca zwischen den Gruppen des Atherosklerose-Scores (Abbildung 15).

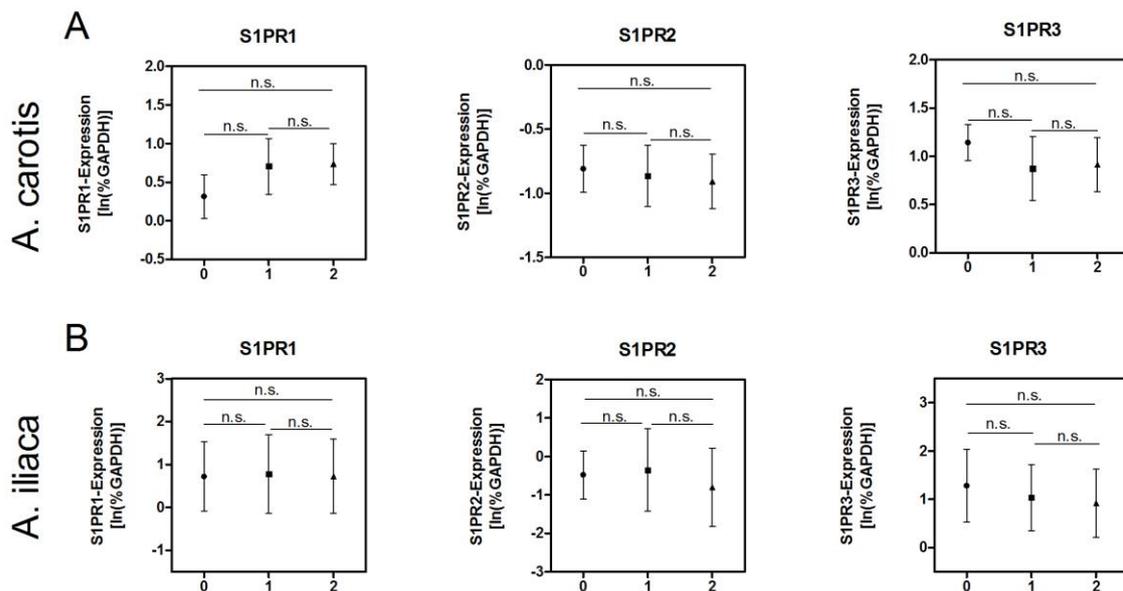


Abbildung 15: Expression des S1PR1, S1PR2 und S1PR3 in der A. carotis und in der A. iliaca der Gruppen des Atherosklerose-Scores. Die Analyse der Expressionsunterschiede erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA und post-hoc-Test nach Tukey („0“ N=38, „1“ N=24, „2“ N=29). Gezeigt sind Mittelwerte +/- 95% KI. n.s., nicht signifikant.

Zusammenfassend lassen sich folgende Aussagen bezüglich der S1P-Rezeptor-Expression in den untersuchten Gruppen (CP, pAVK und Atherosklerose-Score) treffen: Während es keine signifikanten Expressionsunterschiede in den CP-Gruppe und in den Gruppen des Atherosklerose-Scores gab, wiesen Probanden mit pAVK im Vergleich zu Probanden ohne pAVK eine signifikant höhere Expression des S1PR1 in der A. carotis auf.

4.6 Einfluss der Expression der S1P-Rezeptoren auf Carotisplaque, pAVK und Atherosklerose-Score unter Berücksichtigung klinischer Parameter und Komorbiditäten

In den Abschnitten 4.2 bis 4.6 wurde die Rezeptorexpression in den verschiedenen Gruppen untersucht (CP, pAVK, Atherosklerose-Score). Nachfolgend wird nun in verschiedenen Regressionsmodellen analysiert, welchen Einfluss die Expression der S1P-Rezeptoren in der A. carotis und A. iliaca auf diese Gruppen besitzt. Hierbei wird zusätzlich der Einfluss von verschiedenen Parametern, welche von klinischer Signifikanz für die Atherosklerose sind, mit in die Analyse einbezogen.

In den Regressionsmodellen wurden die CP, pAVK und der Atherosklerose-Score als abhängige Variablen definiert. Weiterhin wurden folgende Parameter als unabhängige Variablen ausgewählt: Alter, Geschlecht, Hypertonus, Diabetes, pathologischer Nierenstatus sowie die logarithmierten S1P-Rezeptor-Expressionen in der A. carotis (CA In S1PR1, S1PR2, S1PR3) und in der A. iliaca (IL In S1PR1, S1PR2, S1PR3).

Der BMI wurde nicht als Variable in das Regressionsmodell aufgenommen, da die vorherigen Analysen keine signifikanten Unterschiede in der CP- oder in der pAVK-Gruppe im Vergleich zur jeweiligen Referenzgruppe ergaben (Tabelle 15, S. 27).

Für die Regressionsanalysen in diesem Kapitel wurde jeweils nach dem gleichen Schema vorgegangen (siehe Abschnitt 3.2.4, S. 26): Nach der Analyse im Gesamtmodell, welches alle oben genannten Variablen einschließt, wurde mittels Rückwärtselimination die höchsten P-Werte sukzessive eliminiert und ein finales Modell gebildet, das nur signifikante Variablen enthält.

4.6.1 Einflussvariablen auf die Entwicklung einer Carotisplaque

Aus dem Gesamtmodell ist ersichtlich, dass das Alter und die S1PR1-Expression in der A. iliaca sowie eine Hypertonie und eine pAVK einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung einer Carotisplaque haben und das Risiko für eine Carotisplaque erhöhen (Odds Ratio, OR>1) (Tabelle 21).

Variable	OR	95% KI	P-Werte
Alter	1.107	1.034-1.208	0.009**
IL In S1PR1	3.943	1.318-16.034	0.027*
Hypertonus	5.429	1.222-29.538	0.034*
pAVK	8.119	1.325-75.955	0.036*
IL In S1PR2	0.369	0.107-0.981	0.072
path. Nierenstatus	0.397	0.067-1.895	0.270
CA In S1PR1	1.654	0.504-5.997	0.418
IL In S1PR3	0.673	0.198-2.151	0.508
Diabetes	1.840	0.299-13.451	0.520
CA In S1PR2	0.801	0.168-3.789	0.776
CA In S1PR3	1.121	0.375-3.233	0.833
männl. Geschlecht	1.012	0.225-4.719	0.987

Tabelle 21: Gesamtmodell der ausgewählten Einflussvariablen auf die Carotisplaque. Die Analyse erfolgte mittel logistischer Regression. IL In S1PR1/2/3, log. S1P-Rezeptor-Expression in der A. iliaca; CA In S1PR1/2/3, log. S1P-Rezeptor-Expression in der A. carotis; OR, Odds Ratio; KI, Konfidenzintervall; *P<0,05, **P<0,01.

Das Gesamtmodell enthält eine Reihe nicht signifikanter Variablen. Diese wurden nun schrittweise mittels Rückwärtselimination entfernt und das Regressionsmodell jeweils erneut berechnet. Die folgenden Variablen wurden in der nachstehenden Reihenfolge ausgeschlossen. In Klammern ist der letzte P-Wert der Variable im Modell angegeben.

1. Männliches Geschlecht (P=0,987)
2. CA log S1PR3 (P=0,83)
3. CA log S1PR2 (P=0,772)
4. IL log S1PR3 (P=0,534)
5. Diabetes (P=0,528)
6. CA log S1PR1 (P=0,447)
7. Pathologischer Nierenstatus (P=0,169)

Das finale Modell der Einflussvariablen auf die Carotisplaque enthält somit die folgenden Variablen (Tabelle 22, S. 41):

Variable	OR	95% KI	P-Werte
Alter	1.075	1.022-1.141	0.009**
pAVK	9.650	2.028-72.817	0.010*
Hypertonus	4.346	1.205-17.747	0.030*
IL In S1PR1	3.102	1.188-9.709	0.033*
IL In S1PR2	0.373	0.129-0.894	0.043*

Tabelle 22: Finales Modell der Einflussvariablen auf die Carotisplaque. IL In S1PR1/2, log. S1P-Rezeptor-Expression in der A. iliaca; OR, Odds Ratio; KI, Konfidenzintervall; *P<0,05, **P<0,01.

Im finalen Modell haben die Variablen Alter, pAVK, Hypertonus, IL In S1PR1 und IL In S1PR2 einen signifikanten Einfluss auf die Ausbildung einer Carotisplaque. Eine pAVK erhöht das Risiko eine Carotisplaque zu entwickeln um das 9,7-Fache, eine Hypertonie um das 4,3-Fache. Während das Risiko für eine Carotisplaque mit der Expression des S1PR1 steigt, sinkt es mit zunehmender S1PR2-Expression.

Die Expression des S1PR3 in der A. iliaca und in der A. carotis hat nach diesem Modell keinen Einfluss auf die Carotisplaque.

4.6.2 Einflussvariablen auf die Entwicklung einer pAVK

Analog zum vorherigen Modell, wurde auch für die pAVK vorgegangen. Das Gesamtmodell zeigt, dass das Alter, die S1PR1-Expression in der A. carotis und das männliche Geschlecht einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung einer pAVK haben und das Risiko für eine pAVK erhöhen (OR>1). Im Gegensatz hierzu ist die S1PR2-Expression in der A. carotis mit einem verminderten Risiko (OR<1) für eine pAVK verbunden (Tabelle 23).

Variable	OR	95% KI	P-Werte
Alter	1.117	1.050-1.216	0.002**
CA In S1PR1	7.588	1.854-49.145	0.013*
männl. Geschlecht	12.988	1.740-162.319	0.023*
CA In S1PR2	0.124	0.013-0.804	0.042*
Carotisplaque	7.112	0.937-91.556	0.082
Hypertonus	7.393	0.735-113.171	0.109
path. Nierenstatus	3.963	0.749-26.483	0.119
IL In S1PR2	1.951	0.513-9.178	0.353
IL In S1PR3	0.748	0.161-3.400	0.702
CA In S1PR3	0.734	0.130-3.735	0.713
IL In S1PR1	0.829	0.217-2.934	0.773
Diabetes[†]	-	-	-

[†] Da in der pAVK(-)-Gruppe kein Proband mit einem Diabetes vorkommt, war die Berechnung der OR für diese Variable nicht möglich.

Tabelle 23: Gesamtmodell der ausgewählten Einflussvariablen auf die pAVK. Die Analyse erfolgte mittels logistischer Regression. IL In S1PR1/2/3, log. S1P-Rezeptor-Expression in der A. iliaca; CA In S1PR1/2/3, log. S1P-Rezeptor-Expression in der A. carotis; OR, Odds Ratio; KI, Konfidenzintervall; *P<0,05; **P<0,01.

Durch die Rückwärtselimination wurden schrittweise folgende Variablen entfernt:

1. Diabetes
2. IL log S1PR3 (P=0,885)
3. IL log S1PR1 (P=0,547)
4. IL log S1PR2 (P=0,14)
5. CA log S1PR3 (P=0,225)
6. Carotisplaque (P=0,096)
7. Pathologischer Nierenstatus (P=0,06)
8. CA log S1PR2 (P=0,055)

Das finale Modell der Einflussvariablen auf die pAVK enthält somit die folgenden Variablen (Tabelle 24, S. 43).

Variable	OR	95% KI	P-Wert
Alter	1.153	1.089-1.244	<0.001***
männl. Geschlecht	7.214	1.543-46.876	0.021*
CA In S1PR1	2.206	1.106-4.827	0.033*
Hypertonus	6.436	1.348- 49.311	0.035*

Tabelle 24: Finales Modell der Einflussvariablen auf die pAVK. CA In S1PR1, log. S1PR1-Expression in der A. carotis; OR, Odds Ratio; KI Konfidenzintervall; *P<0,05; ***P<0,001.

Im finalen Modell haben die Variablen Alter, männliches Geschlecht, CA In S1PR1 und Hypertonie einen signifikanten Einfluss auf die pAVK. Das männliche Geschlecht erhöht das Risiko für eine pAVK um das 7,2-Fache, ein arterieller Hypertonus um das 6,4-Fache. Die Expression des S1PR1 in der A. carotis erhöht das Risiko eine pAVK zu entwickeln um das 2,2-Fache.

4.6.3 Einflussvariablen des Atherosklerose-Scores

Analog zu Abschnitt 4.6.1 wurde ebenfalls für den Atherosklerose-Score vorgegangen. Im Gegensatz zu der CP und pAVK erfolgte die Analyse der Atherosklerose-Score mittels linearer Regression, welche Koeffizienten und keine OR produziert (siehe Abschnitt 3.2.4, S. 26). Aus dem Gesamtmodell ist zu erkennen, dass das Alter, ein Hypertonus und die S1PR1-Expression in der A. carotis signifikant den Atherosklerose-Score erhöhen (Tabelle 25).

Variable	Koeffizient	95% KI	P-Werte
Alter	0.025	0.016-0.034	<0.001***
Hypertonus	0.526	0.180-0.873	0.003**
CA In S1PR1	0.289	0.081-0.498	0.007**
CA In S1PR2	-0.256	-0.572-0.059	0.110
Diabetes	0.362	-0.085-0.809	0.111
IL In S1PR1	0.154	-0.053-0.361	0.143
männl. Geschlecht	0.161	-0.122-0.443	0.261
IL In S1PR2	-0.097	-0.300-0.107	0.348
IL In S1PR3	-0.069	-0.286-0.148	0.530
CA In S1PR3	0.023	-0.196-0.241	0.837
path. Nierenstatus	0.031	-0.277-0.338	0.844

Tabelle 25: Gesamtmodell der Einflussvariablen des Atherosklerose-Scores. Die Analyse erfolgte mittels linearer Regression. IL In S1PR1/2/3, log. S1P-Rezeptor-Expression in der A. iliaca; CA In S1PR1/2/3, log. S1P-Rezeptor-Expression in der A. carotis; OR, Odds Ratio; KI, Konfidenzintervall; **P<0,01; ***P<0,001.

Durch die Rückwärtselimination wurden schrittweise folgende Variablen entfernt:

1. Pathologischer Nierenstatus (P=0,844)
2. CA log S1PR3 (P=0,822)
3. IL log S1PR3 (P=0,530)
4. Männliches Geschlecht (P=0,295)
5. IL log S1PR2 (P=0,27)
6. IL log S1PR1 (P=0,302)
7. Diabetes (P=0,055)

Das finale Modell der Einflussvariablen auf den Atherosklerose-Score enthält die folgenden Variablen (Tabelle 26):

Variable	Koeffizient	95% KI	P-Wert
Alter	0.024	0.017-0.032	<0.001***
Hypertonus	0.617	0.303-0.930	<0.001***
CA In S1PR1	0.357	0.162-0.552	<0.001***
CA In S1PR2	-0.349	-0.646- -0.052	0.022*

Tabelle 26: Finales Modell der Einflussvariablen des Atherosklerose-Scores. CA In S1PR1/2, log. S1P-Rezeptor-Expression in der A. carotis; KI, Konfidenzintervall; *P<0,05; ***P<0,001.

Im finalen Modell haben die Variablen Alter, Hypertonus, CA In S1PR1 und CA In S1PR2 einen signifikanten Einfluss auf den Atherosklerose-Score. Eine arterielle Hypertonie erhöht den Atherosklerose-Score um 0,6. Steigt die Expression des S1PR1 in der A. carotis, erhöht sich der Atherosklerose-Score. Steigt hingegen die Expression des S1PR2 in diesem Gefäß, sinkt der Atherosklerose-Score. Die Expression des S1PR3 besitzt in diesem Modell keinen Einfluss auf den Atherosklerose-Score.

Zusammenfassend konnten folgende statistische Zusammenhänge gezeigt werden:

- Alter und Hypertonus erhöhen das Risiko für CP(+) und pAVK(+) und einen hohen Atherosklerose-Score
- A. iliaca:
 - Die S1PR1-Expression geht mit einem erhöhten Risiko für CP(+) einher.
 - Die S1PR2-Expression geht mit einem verminderten Risiko für CP(+) einher.
- A. carotis:
 - Die S1PR1-Expression ist positiv mit der Ausbildung einer pAVK und einem hohen Atherosklerose-Score assoziiert.
 - Die S1PR2-Expression geht mit einem niedrigen Atherosklerose-Score einher.
- Die Expression des S1PR3 zeigte in beiden Gefäßen keine signifikanten Zusammenhänge.

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expression der S1P-Rezeptoren S1PR1, S1PR2 und S1PR3 in der humanen A. carotis und A. iliaca zu untersuchen. Zwei Aspekte sollten dabei besonders betrachtet werden: Erstens unterscheidet sich die Expression der S1PR zwischen der A. carotis und der A. iliaca in Kontrollprobanden? Zweitens gibt es Veränderungen der S1P-Rezeptor-Expression in Assoziation mit der Atherosklerose? Die durchgeführte Untersuchung ergab, dass sich die Expression einzelner S1PR zwischen der A. carotis und der A. iliaca in der Kontrollgruppe unterscheidet. Ferner konnten Expressionsveränderungen bestimmter S1PR sowohl in der A. carotis als auch in der A. iliaca in Assoziation mit Atherosklerose identifiziert werden.

Die Rolle von S1P und den S1PR in der humanen Atherosklerose ist noch nicht ausreichend verstanden. Ein Großteil der Erkenntnisse stammt aus murinen Modellen. Im Menschen hingegen wurde die Expression der S1PR bisher nicht in einer größeren Stichprobe untersucht (Shimizu et al. 2012). S1P ist an der Regulation einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse im Gefäßsystem beteiligt. In der Atherosklerose kann S1P über seine S1PR eine Reihe von Zellen (u.a. Makrophagen, Lymphozyten und glatte Muskelzellen), die von pathophysiologischer Bedeutung sind, beeinflussen (Daum et al. 2009, Keul et al. 2011, Maceyka et al. 2012, Wilkerson und Argraves 2014). Nach derzeitigen Erkenntnissen aus Tiermodellen können S1P bzw. die S1PR sowohl pro- als auch antiatherogene Funktionen vermitteln (Nofer et al. 2007, Takuwa et al. 2012, Gulbins und Petrache 2013, Olivera et al. 2013). Im humanen Blut herrschen relativ hohe Konzentrationen von S1P, welches hier überwiegend an HDL gebunden ist (Marsolais und Rosen 2009, Winkler et al. 2015). Es gibt zunehmend Evidenz, dass S1P für die atheroprotektiven Funktionen des HDL mit verantwortlich sein könnte (Levkau 2015, Sattler et al. 2015). Weiterhin wurden die Serumkonzentrationen von S1P bereits mit Sepsis (Winkler et al. 2015) und obstruktiver KHK (Deutschman et al. 2003) assoziiert. Vor diesem Hintergrund ist zu erwarten, dass die S1P-Rezeptoren ebenfalls für die humane Atherosklerose von pathophysiologischer Bedeutung sind.

Nach der Charakterisierung hinsichtlich klinischer Parameter und dem Vergleich der Studiengruppen, wird im Folgenden auf die Ergebnisse der Expressionsanalysen in der Kontrollgruppe eingegangen. Im Weiteren werden die Veränderungen der S1P-Rezeptor-Expression in der Atherosklerose diskutiert.

5.1 Charakterisierung und Vergleich der Studiengruppen

Aufgrund der gewählten Klassifikationskriterien (Gefäßstatus der A. carotis für die CP-Gruppe, anamnestischer pAVK-Status) war zu erwarten, dass die Probanden mit einer Carotisplaque bzw. einer pAVK auch kränker im Vergleich zur jeweiligen Referenzgruppe sind. Die Verteilung der klinischen Parameter und Komorbiditäten (z.B. Alter, Hypertonus) bestätigen diese Vermutung: Probanden, die eine Carotisplaque oder eine pAVK aufwiesen, waren im Mittel ebenfalls älter und litten gehäuft an Begleitpathologien (Tabelle 15, S. 27). Dieser Trend zeichnete sich ebenfalls im Atherosklerose-Score ab, welcher die CP- und die pAVK-Gruppe zusammenfasst (Tabelle 17, S. 28). Weiterhin waren Kontrollprobanden, welche weder eine Carotisplaque noch eine pAVK aufwiesen, ebenfalls signifikant jünger und zeigte einen deutlich geringeren Anteil an Komorbiditäten im Vergleich zu den übrigen Probanden. Diese Verteilung der klinischen Parameter spricht für die Validität der Einteilungskriterien.

Zu beachten ist, dass die Carotisplaque- und die pAVK-Gruppe nicht unabhängig voneinander sind: Mehr als 93 Prozent der Probanden mit einer CP wiesen ebenfalls eine pAVK auf. Demnach lassen sich in dieser Studie keine Aussagen über die Carotisplaque ohne das gleichzeitige Vorhandensein einer pAVK treffen. Auch in größer angelegten klinischen Studien konnte eine ähnliche Assoziation der beiden Pathologien nachgewiesen werden. So konnten Razzouk et al. zeigen, dass Probanden mit einer pAVK eine deutlich höhere Prävalenz für Stenosen der A. carotis aufweisen, als solche ohne pAVK (18,8 Prozent vs. 3,3 Prozent) (Razzouk et al. 2015). Weiterhin konnte in einer Metaanalyse aus ultraschall-basierten Studien bei über 4.500 Patienten mit pAVK eine Prävalenz von 28 Prozent für über 50-prozentige bzw. 14 Prozent für über 70-prozentige Carotisstenosen festgestellt werden (Eckstein et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit waren die Unterschiede deutlich größer: 32 Prozent der Probanden mit pAVK hatten ebenfalls eine Carotisplaque bzw. zwei Prozent der Probanden ohne pAVK. Der Vergleich mit der genannten Studien ist allerdings aufgrund der stark unterschiedlichen Studienkriterien und Kohortengrößen nur eingeschränkt möglich.

Um Veränderungen der S1P-Rezeptor-Expression in der Atherosklerose beurteilen zu können, wurde in dieser Studie zunächst die Expression in einer gebildeten Kontrollgruppe analysiert.

5.2 Veränderungen der S1P-Rezeptor-Expression in der Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe waren der S1PR1 und der S1PR2 in der A. iliaca signifikant höher exprimiert als in der A. carotis. Der gleiche Trend weist die Expression des S1PR3 auf (Abbildung 6, S. 30). Nach Kenntnis des Autors wurden die Expressionsunterschiede zwischen der humanen A. carotis und der A. iliaca bis dato nur in einer Studie von Shimizu et al. untersucht (Shimizu et al. 2012). In dieser Studie war der S1PR1 (nicht signifikant) und der S1PR3 (signifikant) in den iliofemorale Arterien höher exprimiert als in der A. carotis. Diese Expressionsunterschiede wurden auch in der Kontrollgruppe gesehen, allerdings waren hier die Unterschiede der S1PR1-Expression zwischen den beiden Gefäßen signifikant. Bezüglich der S1PR2-Expression gab es jedoch Unterschiede im Vergleich zu den Ergebnissen dieser Arbeit: Der S1PR2 wies bei Shimizu et al. eine signifikant niedrigere Expression in iliofemorale Arterien im Vergleich zur A. carotis auf. In der Kontrollgruppe dagegen war der S1PR2 signifikant höher in der A. iliaca als in der A. carotis exprimiert. Hinsichtlich des Vergleichs dieser beiden Studien müssen allerdings einige Einschränkungen berücksichtigt werden. Die Anzahl der Proben war bei Shimizu et al. mit N=5 Proben der A. carotis und N=8 Proben der A. iliaca sehr gering. Weiterhin litten die Probanden der Studie an der arteriellen Verschlusskrankheit, entweder der A. carotis oder der iliofemorale Arterien. Demnach werden bei der Betrachtung der Arbeit von Shimizu et al. und der vorliegenden Studie eine Krankengruppe mit einer Kontrollgruppe verglichen. Aus diesen Gründen ist ein Vergleich der beiden Studien nur eingeschränkt möglich.

Eine Erklärung für die unterschiedliche Expression der S1PR in der A. carotis und der A. iliaca der Kontrollgruppe könnte in der embryonalen Vasogenese liegen: Während die glatten Muskelzellen der A. carotis der Neuralleiste entstammen, leiten sich die glatten Muskelzellen der A. iliaca dem splanchnischen Mesoderm ab (Majesky 2007). Demnach könnte der unterschiedlichen Expression der S1PR, bedingt durch die Entwicklungsunterschiede der Gefäße, intrinsische genetische Unterschiede der verschiedenen Gefäßabschnitte zugrunde liegen.

Majesky postuliert, dass die Reaktion eines Gefäßes auf systemische Risikofaktoren und iatrogene Interventionen sowie die Anfälligkeit für die Atherosklerose von diesen genetischen Unterschieden der Gefäßabschnitte abhängig sein könnte (Majesky 2007). Bezogen auf die analysierten Gefäße könnten demnach die unterschiedliche Expression der S1P-Rezeptoren in der A. iliaca im Vergleich zur A. carotis, neben lokalen flussmechanischen Faktoren, für die erhöhte Prävalenz der pAVK im Vergleich zur Carotisstenose verantwortlich sein: In einer Analyse des Life Line Screening® (USA) mit ca. 3.7 Millionen Teilnehmern, wurde die Prävalenz der Carotisstenose (>50 Prozent) mit 3,9 Prozent und die der pAVK mit 4,1 Prozent angegeben (Razzouk et al. 2015).

Da Alter und Geschlecht als wichtige Risikofaktoren für die Atherosklerose gelten (Fruchart 2004), wurde der Einfluss dieser Variablen in der Kontrollgruppe untersucht. Der Vergleich der Expression der S1PR zwischen den männlichen und weiblichen Probanden ergab keine signifikanten Unterschiede. Demnach scheint das Geschlecht in dieser Gruppe keinen signifikanten Einfluss auf die S1P-Rezeptor-Expression zu besitzen. Bezüglich des Alters konnten allerdings Veränderungen der S1P-Rezeptor-Expression festgestellt werden: Mit steigendem Alter nimmt die Expression des S1PR3 in der A. carotis und des S1PR2 in der A. iliaca signifikant ab (Abbildung 9, S. 32). Es gibt Hinweise darauf, dass der S1PR2 und der S1PR3 atheroprotektive Funktionen besitzen können (Nofer et al. 2004, Tölle et al. 2005, Shimizu et al. 2007, Keul et al. 2007). Diese werden weiter unten diskutiert. Geht man von der protektiven Rolle der Rezeptoren für die Atherosklerose aus, könnte eine Verminderung der Expression des S1PR2 in der A. iliaca und des S1PR3 in der A. carotis im Alter mit einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber der Atherosklerose einhergehen. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, weshalb das steigende Alter und die Atherosklerose positiv assoziiert sind. Die Ergebnisse von Weerd et al. verdeutlichen diesen Zusammenhang (Weerd et al. 2009): In einer Metaanalyse von 40 Studien wiesen in der Gruppe unter 70 Jahre 4,8 Prozent der männlichen bzw. 2,2 Prozent der weiblichen Probanden eine Carotisstenose über 50 Prozent auf. In der Gruppe über 70 Jahre stiegen die Prävalenzen der Carotisstenose mit 12,5 Prozent in männlichen bzw. 6,9 Prozent in weiblichen Probanden deutlich an.

Neben der Altersabhängigkeit des S1PR3, haben die weiteren Analysen gezeigt, dass die Expression dieses Rezeptors ebenfalls gefäßübergreifend korreliert: Es besteht eine deutliche Assoziation der S1PR3-Expression zwischen der A. iliaca und der A. carotis (Abbildung 12, S. 35). Diese Ergebnisse könnten dafür sprechen, dass es sich bei den S1PR3-exprimierenden Zellen um einen systemisch regulierten Zelltyp, wie z.B. Stammzellen handelt (Vasa et al. 2001, Guzik et al. 2004, Walter et al. 2007). Scheubel et al. haben in einer Studie an koronaren Bypass-Patienten gezeigt, dass die Zahl der endothelialen Progenitorzellen (EPZ) negativ mit steigendem Alter assoziiert ist (Scheubel et al. 2003). Die heterogene Gruppe der EPZ umfasst Zellen mit Stammzell-ähnlichen Funktionen, welche ebenfalls die Neovaskularisation fördern können (Leor und Marber 2006). In einer Studie am murinen Hinterlauf-Ischämie-Modell konnten von Walter et al. weiterhin einen Einfluss von S1P bzw. FTY720 (synthetisches S1P-Analogon) auf die EPZ zeigen (Walter et al. 2007). Während im Wildtyp die Applikation von FTY720 und S1P zu einer Verbesserung des Blutflusses nach einer Ischämie im Hinterlauf führte, konnte dieser Effekt nicht in S1PR3-Knockout-Mäusen nachgewiesen werden (Walter et al. 2007). Dies deutet darauf hin, dass die Funktion der EPZ in diesem Modell vom S1PR3 abhängig ist. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Altersabhängigkeit und die potentiell systemische Regulation der Expression des S1PR3 könnten dafür sprechen, dass dieser Rezeptor auf entsprechenden Stammzellen bzw. den EPZ, exprimiert wird, welche ebenfalls

protektiv auf die Atherosklerose wirken könnten (Asahara et al. 1999, Vasa et al. 2001, Scheubel et al. 2003, George et al. 2011). Da in dieser Studie allerdings die Vollwand der Gefäße untersucht wurde, lassen sich keine Rückschlüsse auf die Zellen ziehen, welche den Rezeptor exprimieren.

Im Gegensatz zu der gefäßübergreifenden Assoziation des S1PR3, zeigten die Analysen der Expression des S1PR1 und des S1PR2, dass diese Rezeptoren innerhalb der A. carotis und der A. iliaca korrelieren (Abbildung 10, S. 33 und Abbildung 11, S. 34). Dies ist insofern interessant, als dass die beiden Rezeptoren antagonistische zelluläre Funktionen besitzen: Während der S1PR1 in Endothelzellen Rac-vermittelt die Integrität der endothelialen Barriere fördert (Wilkerson und Argraves 2014), scheint der S1PR2 über den Rho-Signalweg diese zu inhibieren (Lee et al. 2009, Zhang et al. 2013). Auch in GMZ haben die Rezeptoren gegensätzliche Funktionen: Der S1PR1 fördert via Rac die Migration und Proliferation von GMZ (Blaho und Hla 2014), während der S1PR2 via Rho die zelluläre Migration hemmt (Mack 2011). Diese Daten könnten Hinweise dafür sein, dass die Expression des S1PR1 und des S1PR2 in der A. carotis und A. iliaca der Kontrollgruppe lokalen Regulationsmechanismen unterliegt. Hierfür sprechen die antagonistischen Funktionen der S1PR im Endothel und in GMZ sowie die intravaskuläre Korrelation der beiden Rezeptoren.

Nach der Betrachtung der Kontrollgruppe wird im Folgenden auf die Veränderungen der S1PR in der Atherosklerose eingegangen.

5.3 Einfluss der S1P-Rezeptor-Expression auf die Atherosklerose

In den Regressionsanalysen zeigten sich signifikante Einflüsse des S1PR1 und des S1PR2 in der A. iliaca (und nicht in der A. carotis) auf die CP. Umgekehrt wurde die pAVK durch die S1PR1-Expression in der A. carotis positiv beeinflusst. Diese Ergebnisse erscheinen zunächst nicht intuitiv: Da die pAVK die CP dominiert, würde man erwarten, dass die gleichen S1P-Rezeptoren einen Einfluss auf die CP und die pAVK ausüben. Dies ist nicht der Fall und könnte bedeuten, dass die Veränderungen der Expressionen des S1PR1 bzw. S1PR2 in der A. iliaca mit der CP assoziiert sind. Demnach wäre es möglich, dass lokale Expressionsveränderungen einzelner S1PR gefäßübergreifend atherosklerotische Prozesse in anderen Gefäßabschnitten anzeigen können. Dies steht allerdings im Widerspruch zu der potentiell lokalen Regulation des S1PR1 und des S1PR2 in der Kontrollgruppe.

Die gebildeten CP und pAVK-Gruppen wurden aufgrund der großen Überschneidungen in einem Atherosklerose-Score zusammengefasst. Hier wird davon ausgegangen, dass ein zunehmender Score mit einer stärkeren Ausprägung der Atherosklerose in den Probanden verbunden ist. Die Regressionsanalysen in dieser Arbeit konnten zeigen, dass die

Expressionen des S1PR1 und S1PR2 in der A. carotis einen Einfluss auf den Atherosklerose-Score und die pAVK ausüben. Dies ist aufgrund der Dominanz der pAVK in den Gruppen, auf denen der Atherosklerose-Score basiert, zu erwarten gewesen. Mit dem Atherosklerose-Score steigt die Expression des S1PR1 vor allem in der A. carotis an (nicht signifikant) (Abbildung 15, S. 38). Eben dieser Rezeptor wurde auch durch die Regressionsanalyse des Atherosklerose-Scores als Einflussvariable identifiziert: Eine Anstieg S1PR1-Expression in der A. carotis ging mit einer Erhöhung des Atherosklerose-Scores einher und könnte für eine proatherogene Rolle des Rezeptors sprechen. Dies ist allerdings konträr zu der Funktion des S1PR1 im murinen Endothel. Hier scheint der Rezeptor für die Aufrechterhaltung der endothelialen Barriere notwendig zu sein und damit potentiell atheroprotektiv zu wirken (Blaho und Hla 2014). Mäuse mit einem endothelspezifischen Knockout des S1PR1 wiesen eine erhöhte vaskuläre Permeabilität und strukturelle Veränderungen in den endothelialen Zellverbindungen auf (Wilkerson und Argraves 2014).

In der vorliegenden Arbeit wurden Vollwandproben mittels qPCR untersucht. Da diese Methode alle Zellen der Vollwand einschließt, ist davon auszugehen, dass die Endothelzellen einen nur sehr geringen Anteil an der gemessenen Expression des S1PR1 ausmachen. Demnach ist es wahrscheinlicher, dass andere Zellen für den Anstieg des S1PR1 verantwortlich sind. Beispielsweise exprimieren Lymphozyten den S1PR1 auf ihrer Zelloberfläche (Schwab et al. 2005). In diesen Zellen wird der S1PR1 für die Emigration aus sekundären lymphatischen Organen benötigt, welche den bestehenden Blut-Gewebe-Gradienten für S1P mittels dieses Rezeptors erkennen können (Brunkhorst et al. 2014). Lymphozyten nehmen als inflammatorische Zellen eine wichtige Funktion in der Pathogenese der Atherosklerose ein (Hansson und Hermansson 2011). T-Lymphozyten werden parallel mit Makrophagen in die atherosklerotische Läsion rekrutiert, produzieren dort proatherogene Mediatoren und tragen so zu dem Wachstum der Läsion bei. Auch B-Lymphozyten akkumulieren in größerer Zahl in der Adventitia des betroffenen Gefäßes (Hansson und Hermansson 2011, Libby 2012).

In GMZ Zellen fördert der S1PR1 die Migration und Proliferation (Daum et al. 2009). Koshiba et al. haben in einer Studie an Ratten untersucht, welchen Einfluss FTY720 auf die Transplantatvaskulopathie (TVP) in diesen Tieren besitzt (Koshiba et al. 2002). Die TVP weist einige Ähnlichkeiten zur Atherosklerose und der Intimahyperplasie auf (Rahmani et al. 2006). Diese Pathologien gehen beispielsweise mit einer verstärkten Proliferation und Migration von GMZ einher, welche an der Lumeneinengung beteiligt sind. Die Applikation von FTY720 in Kombination mit Cyclosporin A resultierte in den Ratten in einer deutlich verringerten Ausbildung der TVP (Koshiba et al. 2002). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass FTY720, welches bei andauernder Applikation als funktioneller S1PR1-Antagonist gilt, in diesem Modell

die Migration und Proliferation der GMZ inhibiert und damit eine Reduktion der TVP bewirkt (Chun und Hartung 2010).

Makrophagen exprimieren ebenfalls den S1PR1 (Blaho und Hla 2014) und sind weitaus häufiger in humanen Läsionen zu finden als T-Lymphozyten (4:1 bis 10:1) (Hansson und Hermansson 2011). Eine mögliche Erklärung für die zunehmende Expression des S1PR1 mit steigendem Atherosklerose-Score könnte demnach in der vermehrten Anzahl von Lymphozyten, Makrophagen und GMZ liegen, welche den Rezeptor exprimieren. Allerdings können diese Zellen ebenfalls den S1PR2 und S1PR3 exprimieren (Michaud et al. 2010, Blaho und Hla 2014). Für diese Rezeptoren konnte jedoch kein Anstieg verzeichnet werden. Ob sich möglicherweise die Expressionen einzelner S1PR selektiv in Assoziation mit der Atherosklerose verändern können, ist noch ungeklärt und kann in weiterführenden Studien untersucht werden.

Bezüglich des S1PR2 ergaben die Regressionsanalysen dieser Arbeit, dass die zunehmende Expression des S1PR2 in der A. carotis mit einer Abnahme der Atherosklerose-Score assoziiert ist. Demnach könnte der S1PR2 atheroprotektiv wirken. Dies steht allerdings im Gegensatz zu der Funktion des Rezeptors im Endothel. Hier scheint der S1PR2 inhibierend auf die endotheliale Barriere zu sein und könnte daher die Atherogenese begünstigen (Wilkerson und Argraves 2014). Zhang et al. konnten in einem Mausmodell mit Lipopolysaccharid-induzierter Endotoxämie an S1PR2-Knockout-Mäusen zeigen, dass diese Tiere im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich verminderte vaskuläre Permeabilität aufweisen (Zhang et al. 2013). Weiterhin scheint S1PR2-abhängig ebenfalls die Funktion von endothelialen Zell-Zell-Verbindungen gehemmt werden zu können (Spiegel und Milstien 2011). Wie beschrieben, ist jedoch anzunehmen, dass die Expression des S1PR2 im Endothel nur einen kleinen prozentualen Anteil an der mittels qPCR gemessenen Expression ausmacht. Weitere Hinweise für eine proatherogene Funktion des S1PR2 konnte eine Studie an ApoE-S1PR2-Knockout-Mäusen liefern (Skoura et al. 2011). Diese Tiere wiesen im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich verminderte Ausprägung der Atherosklerose auf. In diesem Modell scheint der S1PR2 die Retention von Makrophagen in den atherosklerotischen Läsionen und die Sekretion inflammatorischer Zytokine zu fördern (Skoura et al. 2011). Diese Daten sprechen, wie auch im Endothel, für eine proatherogene Funktion des S1PR2 in Makrophagen. Neben den genannten Zellen, können auch andere Zelltypen, wie z.B. GMZ, für die Expressionsveränderungen verantwortlich sein. Die pathophysiologischen Prozesse im Verlauf der Atherogenese finden hauptsächlich in der Intima statt. Hierbei kommt es zu einer Aktivierung und Migration von glatten Muskelzellen in der dieser Schicht (Lusis 2000). Eine mögliche Erklärung für die potentiell atheroprotektiven Eigenschaften des S1PR2 könnte in der Beeinflussung der GMZ-Funktion liegen, welche diesen Rezeptor hauptsächlich

exprimieren (Daum et al. 2009). Die Ergebnisse von Studien an S1PR2-Knockout-Mäusen legen nahe, dass der S1PR2 auch auf die Intimahyperplasie inhibitorisch wirkt (Shimizu et al. 2007). Die S1PR2-Knockout-Mäuse entwickelten nach Ligatur der A carotis deutlich größere neointimale Läsionen im Vergleich zum Wildtyp (Shimizu et al. 2007). Im Zentrum der Pathogenese der Intimahyperplasie steht die übermäßige Proliferation und Migration von GMZ, welche ebenfalls eine Rolle für das Plaquewachstum und –progression spielen (Doran et al. 2008, Cronenwett und Johnston 2014). Die im Verlauf der Atherogenese unter anderem von Endothelzellen, Makrophagen und Lymphozyten vermehrt sezernierten Mediatoren (z.B. PDGF, Fibroblast GF, TGF- β , IL-1) können eine Änderung des Phänotyps von GMZ vom kontraktilen, differenzierten zum synthetischen, dedifferenzierten Phänotyp induzieren (Doran et al. 2008). GMZ vom synthetischen Phänotyp sind in der Lage, von der Media in die Intima zu migrieren und vermehrt extrazelluläre Matrix zu produzieren (Doran et al. 2008). Des Weiteren können GMZ eine Vielzahl von Adhäsionsmolekülen (u.a. VCAM-1) exprimieren und so die Akkumulierung von Monozyten und Lymphozyten in der Läsion begünstigen. In GMZ kann der S1PR2 die Rho-abhängige Differenzierung fördern. Differenzierte GMZ zeigen im Vergleich zum dedifferenzierten Phänotyp eine verminderte Proliferation und Migration (Mack 2011). Eine S1PR2-vermittelte Inhibition ihrer Migration und Proliferation über den Rho-Signalweg könnte daher z.T. für die potentiell protektiven Funktion bezüglich der Intimahyperplasie und der Atherosklerose verantwortlich sein.

Die Expression des S1PR3 in der A. carotis und in der A. iliaca konnte weder für die Carotisplaque und die pAVK, noch für den Atherosklerose-Score als signifikante Einflussgröße identifiziert werden. Dies ist insofern interessant, als dass die Ergebnisse im Tiermodell nahe legen, dass der S1PR3 von pathophysiologischer Bedeutung für die Intimahyperplasie und der GMZ-Funktion sein könnte (Shimizu et al. 2012). Shimizu et al. konnten zeigen, dass Mäuse mit einem Knockout des S1PR3 nach Denudation der ilio-femorale Arterie signifikant geringere Läsionen im Vergleich zum Wildtyp entwickeln. Dies könnte dafür sprechen, dass der S1PR3 in diesen Tieren die Intimahyperplasie fördert (Shimizu et al. 2012). Im Gegensatz hierzu entwickelten S1PR3-defiziente Mäuse im Ligationsmodell der A. carotis deutlich größere Läsionen im Vergleich zum Wildtyp (Shimizu et al. 2012). Der Rezeptor könnte demnach abhängig vom Verletzungsmodell (Denudation vs. Ligatur) und des betroffenen Gefäßes (A. carotis vs. A. iliaca) der S1PR3 unterschiedliche Funktionen besitzen.

Für den S1PR3 wurden sowohl pro- als auch antiatherogene Funktionen beschrieben (Nofer et al. 2004, Tölle et al. 2005, Keul et al. 2011). S1PR3-/ApoE-doppel-Knockout-Mäuse zeigten im Vergleich zum Wildtyp keine Veränderung der Plaquegröße. Allerdings wiesen die atherosklerotischen Läsionen der Tiere einen deutlich reduzierten Anteil an Monozyten bzw. Makrophagen auf, deren Migration in diesem Modell vom S1PR3 abhängig zu sein scheint

(Keul et al. 2011). Die Ergebnisse könnten auf eine proatherogene Rolle des Rezeptors über die Beeinflussung von Makrophagen/Monozyten hin deuten. Im Gegensatz hierzu wurden ebenfalls antiatherogene Funktionen des S1PR3 beschrieben (Nofer et al. 2004, Tölle et al. 2005, Keul et al. 2007). So scheint S1PR3-vermittelt durch die Aktivierung der eNOS, die NO-abhängige Vasodilatation stimuliert zu werden (Tölle et al. 2005).

Mit zunehmender Atherosklerose-Score nahm die Expression des S1PR3 in der A. carotis und in der A. iliaca ab (nicht signifikant; Abbildung 15, S. 38). Vermutlich lassen sich diese Veränderungen durch das steigende Alter erklären: In der Kontrollgruppe waren ebenfalls die Expression des S1PR3 in der A. carotis und das Alter negativ assoziiert. Das Alter stellt einen bedeutenden Risikofaktoren für die Atherosklerose dar (Fruchart 2004). Dies legen ebenfalls die Ergebnisse der Regressionanalysen in dieser Arbeit nahe. Wie oben beschrieben, könnte der S1PR3 eine antiatherogene Funktion besitzen (Tölle et al. 2005, Keul et al. 2007). Die Regressionsanalysen konnten diesen Rezeptor allerdings nicht als signifikante Einflussvariable identifizieren. Dies ist womöglich durch das Alter bedingt, welches seinen Einfluss auf die Atherosklerose, zumindest partiell, über den S1PR3 vermitteln könnte. Durch einen Abfall der Expression des antiatherogenen S1PR3 im Alter könnte demnach die Atherosklerose begünstigt werden.

Die Vielzahl der beschriebenen Funktionen der S1PR verdeutlicht, wie komplex der mögliche Einfluss von S1P auf die humane Atherosklerose sein könnte. Die pathophysiologische Rolle von S1P ist noch Bestandteil aktueller Forschungsbemühungen (Sattler et al. 2015, Levkau 2015). Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass S1P im Menschen antiatherogene Funktionen besitzen könnte. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass niedrige HDL-S1P-Spiegel im Blut positiv mit der Schwere und dem Auftreten der KHK assoziiert sind (Argraves et al. 2011, Levkau 2015). Weiterhin scheinen die atheroprotektiven Funktionen des HDL (z.B. Förderung der Endothelialen Barriere, eNOS-Aktivierung) abhängig von dem Gehalt an HDL-gebundenem S1P zu sein (Nofer et al. 2004, Sattler et al. 2015, Levkau 2015). Interessanterweise scheinen auch Statine (HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren), welche sich zur Primär- und Sekundärprophylaxe der Atherosklerose bzw. der kardiovaskulären Folgen etabliert haben, das S1P-S1PR-System zu beeinflussen (Igarashi et al. 2007, González-Díez et al. 2008, Egom et al. 2013). Es wird vermutet, dass S1P – neben der Senkung des LDL-C-Spiegels – für die atheroprotektiven Effekte der Statine mit verantwortlich sein könnte. González-Díez et al. konnten in humanen vaskulären GMZ zeigen, dass durch Simvastatin die Expression des S1PR3 in diesen Zellen signifikant stimuliert und gleichzeitig die HDL- oder S1P- vermittelte zelluläre Antwort potentiell werden konnte (González-Díez et al. 2008). Weiterhin konnten Statine in vitro die S1PR1-Expression in humanen Endothelzellen fördern und die HDL-vermittelte eNOS-Produktion stimulieren (Igarashi et al. 2007). Letztlich hängt die

Reaktion einer Zelle auf S1P von den exprimierten S1PR ab, die je nach Zelltyp variieren können (Daum et al. 2009, Blaho und Hla 2014). Die vorliegende Arbeit liefert erstmals Erkenntnisse über die Expression der S1PR in der humanen A. carotis und A. iliaca. Die Kenntnis des Expressionsmusters im menschlichen Gefäßsystem und der Veränderungen der S1PR in der Atherosklerose sind unabdingbar für die gezielte Entwicklung von pharmakologischen Ansätzen zur Therapie der Atherosklerose.

5.4 Limitationen

Diese Arbeit besitzt verschiedene Limitationen, welche als Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen dienen können. Die Analyse der Expression der S1PR in dieser Arbeit erfolgte mittels qPCR. Hierbei wurde davon ausgegangen, dass die mRNA-Expression der S1P-Rezeptoren linear mit der tatsächlichen Proteinexpression korreliert. Das Studienkollektiv besteht aus Verstorbenen, sodass die Qualität der Proben, trotz der angelegten Qualitätskriterien, variieren kann.

Alle Angaben zum Gefäßstatus, auf denen die Klassifikationen der Gruppen in dieser Arbeit basieren, entstammen dem Sektionsprotokoll und lassen sich nicht weiter überprüfen. Die Angaben, auf denen die Klassifizierung der Gruppen in dieser Arbeit beruhen, lassen keine Aussagen über den Schweregrad der Erkrankung zu. So ist bezüglich der pAVK nur der anamnestische pAVK-Status bekannt. Die in die Regressionsanalysen einbezogenen Komorbiditäten (z.B. Hypertonie, Diabetes) basieren ebenfalls lediglich auf Angaben aus dem Sektionsprotokoll. Detaillierte Informationen über deren Schweregrad waren nicht gegeben. Weiterhin wurde der Nierenstatus anhand der Angaben aus dem Sektionsprotokoll erhoben und stellt nur eine grobe Einteilung dar (siehe Abschnitt 3.1.4, S.19).

Aufgrund der gewählten Klassifikationskriterien der CP- und der pAVK-Gruppen wurden auch solche Proben mit atherosklerotischen Veränderungen der Gefäße in die Kontrollgruppe eingeschlossen. 71 Prozent der Probanden der Kontrollgruppe hatten einen auffälligen Plaquestatus (weiche Plaque) in der A. carotis. 26 Prozent der Proben der Kontrollgruppe zeigten einen auffälligen Nierenstatus und ein Proband hatte eine Hypertonie. Aufgrund dieser Auffälligkeiten kann die Kontrollgruppe nicht als gefäßgesund angesehen werden. Dennoch kann festgehalten werden, dass diese Gruppe hauptsächlich Probanden mit einer geringen Ausprägung der Atherosklerose bzw. einem signifikant reduzierten Anteil an komorbiden Pathologien im Vergleich zu den übrigen Probanden einschließt. Weiterhin ist die Probenzahl mit N=23 männlichen und N=15 weiblichen Probanden relativ gering.

6 Fazit und Ausblick

S1P und seine Rezeptoren regulieren eine Reihe von Zellen, die auch in der Pathogenese der Atherosklerose eine wichtige Rolle einnehmen. Die Analyse der Expression des S1PR in der humanen A. carotis und A. iliaca in einer größeren Stichprobe ist bislang noch nicht erfolgt. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen nun erstmals, dass sich die Expression der S1P-Rezeptoren zwischen der A. carotis und der A. iliaca unterscheidet. In der Kontrollgruppe waren der S1PR1 und der S1PR2 in der A. iliaca höher exprimiert als in der A. carotis. Weiterhin konnten Altersassoziationen einzelner S1PR nachgewiesen werden: Mit steigendem Alter sinkt die S1PR3-Expression in der A. carotis und die S1P2-Expression in der A. iliaca. Ferner hat diese Studie gezeigt, dass die Expressionen einzelner S1PR in den untersuchten Gefäßen mit der Atherosklerose assoziiert ist. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Zunahme der S1PR1-Expression in der A. carotis positiv mit der Atherosklerose einhergeht. Demnach könnte der S1PR1 in diesem Gefäß eine proatherogene Rolle einnehmen. Im Gegensatz hierzu war die steigende Expression des S1PR2 in der A. carotis mit einer Verringerung des Atherosklerose-Scores verbunden. Dies könnte für eine atheroprotektive Funktion des Rezeptors in der A. carotis sprechen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten durch weiterführende Untersuchungen bestätigt werden. Da in dieser Studie Vollwand analysiert wurde, kann keine Aussage darüber getroffen werden, welche Zellen zu den Veränderungen der S1P-Rezeptor-Expression beitragen und in welcher Gefäßschicht (Intima, Media oder Adventita) dies geschieht. Hierzu müssten daher zusätzlich histopathologische Färbungen der S1PR durchgeführt werden. Um die bestimmte mRNA-Expression zu bestätigen sollten Western Blot-Analysen erfolgen.

Aus dem hier analysierten Probandenkollektiv wurden neben der A. carotis und der A. iliaca auch weitere Gefäße, wie z.B. die Koronararterien und verschiedene Abschnitte der Aorta entnommen. Analog zu dem für diese Studie gebildeten Atherosklerose-Score, könnte man diese Abschnitte in einer Gesamtscore zusammenfassen. Mittels einer solchen Gesamtscore könnte man die Schwere der Atherosklerose in den Probanden besser anzeigen und die somit die Veränderungen der Expression der S1PR mit steigender Krankheitslast akkurater darstellen.

Ließen sich durch weitergehende Studien einzelne S1PR-Rezeptoren identifizieren, welche gefäßübergreifend den Progress der Atherosklerose fördern bzw. hemmen, wäre eine pharmakologische Blockade bzw. Agonisierung dieser Rezeptoren denkbar. Dies könnte neue Therapiemöglichkeiten für die Atherosklerose eröffnen.

7 Zusammenfassung

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) ist ein bioaktives Sphingolipid mit vielfältigen physiologischen und pathophysiologischen Funktionen im Herzkreislaufsystem. Es gibt zunehmend Evidenz, dass S1P für die Atherosklerose eine wichtige Rolle einnimmt. S1P vermittelt seine intrazellulären Reaktionen über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, den S1P-Rezeptoren (S1PR), wobei die S1PR1, S1PR2 und S1PR3 in Gefäßen exprimiert werden.

Bis dato wurde die Expression der S1PR im humanen Gefäßsystem nicht in einer größeren Stichprobe untersucht. Für diese Arbeit wurden daher Gewebeproben der A. carotis und der A. iliaca von insgesamt 91 verstorbenen Probanden hinsichtlich der Expression von S1PR1, S1PR2 und S1PR3 mittels qPCR analysiert. Ziel war es, sowohl Expressionsunterschiede zwischen den Gefäßen als auch Atherosklerose-assoziierte Veränderungen der S1PR zu identifizieren. Hierzu wurden zunächst drei Gruppen gebildet: Eine Kontrollgruppe, eine Carotisplaque (CP)-Gruppe, welche auf dem Gefäßstatus der A. carotis basiert und eine pAVK-Gruppe. Aufgrund der deutlichen Überschneidungen der CP- und der pAVK-Gruppe wurden diese in einem Atherosklerose-Score zusammengefasst. Daraufhin wurde die Expression der S1PR innerhalb der Gruppen miteinander verglichen. Der Einfluss der S1PR und klinisch relevanter Parameter (z.B. Alter, Hypertonus) auf die Pathologien wurde in verschiedenen Regressionsmodellen untersucht.

Die Analysen ergaben, dass in Probanden der Kontrollgruppe der S1PR1 und der S1PR2 signifikant höher in der A. iliaca exprimiert werden als in der A. carotis. Die Expression des S1PR3 in der A. carotis und die des S1PR2 in der A. iliaca in der Kontrollgruppe nahm mit steigendem Alter ab. In den durchgeführten Regressionsanalysen zeigten sich folgende Veränderungen: In Probanden mit einer Carotisplaque ging eine Zunahme der S1PR1-Expression in der A. iliaca mit einem erhöhtem Risiko für die Entwicklung einer CP einher. Dies konnte analog für die S1PR1-Expression in der A. carotis in Probanden mit pAVK gezeigt werden. Die Expression des S1PR2 in der A. carotis hingegen war mit einer Reduktion des Risikos für die Entwicklung einer pAVK verbunden. Eine zunehmende Expression des S1PR1 in der A. carotis ging mit einer Erhöhung des Atherosklerose-Scores einher, während die steigende Expression des S1PR2 in diesem Gefäß mit einer Verringerung des Atherosklerose-Scores assoziiert war.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Expression der S1PR in der humanen A. carotis und A. iliaca einen Einfluss auf die Atherosklerose besitzen. Weiterhin unterscheidet sich die Expression der S1PR zwischen der A. carotis und der A. iliaca. Die Befunde sollten in einem größeren Probenkollektiv und unter Einbeziehung weiterer Abschnitte des Gefäßsystems bestätigt werden. Die Identifizierung von spezifischen S1PR, welche die Atherosklerose fördern bzw. hemmen, könnte zukünftig gezielte pharmakologische Therapieoptionen eröffnen.

Summary

Sphingosine-1-phosphat is a potent blood-borne signaling lipid that is recognized by five S1P receptors, S1PR1-5. Previous studies suggest important roles for S1P and its receptors S1PR1, S1PR2 and S1PR3 in the vasculature system including physiological as well as pathophysiological processes, e.g. atherosclerosis.

As of now, there are no data available on the specific expression of S1PRs in human carotid and iliac arteries. For this study, the expression of S1PR1, S1PR2 and S1PR3 was measured by real time PCR in 91 carotid and iliac artery specimen obtained from autopsies. The aim of this study was to investigate the expression of S1PRs in controls as well as in association with atherosclerosis.

To address this aim, three groups were formed. The first group consisted of controls with relatively reduced manifestations of atherosclerosis. The second group was based on the atherosclerotic status of the carotid artery according to the autopsy protocol (carotid artery plaque, CAP). The third group included all specimen with known peripheral artery disease (PAD). Because of the significant overlap between the CAP and the PAD group, we summarized these groups in an atherosclerotic score (AS). The influence of the S1PR and clinically important parameters (e.g. age, hypertension) on the pathologies has also been investigated using multiple regression models.

Analyses of controls showed significantly higher expression of S1PR1 and S1PR2 in iliac arteries compared to carotid arteries. Furthermore, the expression of S1PR3 in the carotid artery and of S1PR2 in the iliac artery decrease with age. Increased expression of S1PR1 in the iliac artery was associated with higher risk for CAS. Moreover, an increased expression of S1PR1 in the carotid was associated with higher risk for PAD. In contrast, high expression of S1PR2 in the carotid reduced the risk for PAD. Expression of S1PR1 in the carotid increased the AS while high expression of S1PR2 lowered the AS.

The findings of this study show that expression of S1PR in human carotid and iliac arteries are associated with atherosclerosis. However further studies with larger sample sizes are needed to confirm these findings and other sections of the vascular system need to be included. The identification of specific S1PR that influence atherosclerosis can lead to new pharmacologic therapies in the future.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomischer Aufbau einer gesunden Arterie vom muskulären Typ.....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung einer fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsion..	7
Abbildung 3: Synthese und Abbau von S1P.....	9
Abbildung 4: S1P-Rezeptoren: Gekoppelte G-Proteine und aktivierte Signalwege.	11
Abbildung 5: Histogramme der originalen und der logarithmierten Expressionsdaten des S1PR1, S1PR2 und S1PR3 in der A. iliaca	29
Abbildung 6: Expression des S1PR1, S1PR2 und S1PR3 in A. carotis und A. iliaca der Kontrollgruppe.....	30
Abbildung 7: Geschlechtsunterschiede der Expression des S1PR1, S1PR2 und S1PR3 in A. carotis und A. iliaca der Kontrollgruppe.....	31
Abbildung 8: Mediane Altersunterschiede der S1PR3-Expression in der A. carotis der Kontrollgruppe.....	32
Abbildung 9: Altersabhängigkeit der S1P-Rezeptoren S1PR1, S1PR2 und S1PR3 in der A. carotis und A. iliaca der Kontrollgruppe	32
Abbildung 10: Intravaskuläre Assoziation der Expression des S1PR1 und S1PR2 in der A. carotis der Kontrollgruppe	33
Abbildung 11: Intravaskuläre Assoziationen der Expression des S1PR1 und S1PR2 in der A. iliaca der Kontrollgruppe	34
Abbildung 12: Intervaskuläre Assoziationen des S1PR3 zwischen der A. carotis und der A. iliaca	35
Abbildung 13: Expressionen der S1P-Rezeptoren S1PR1, S1PR2, S1PR2 in der A. carotis der CP-Gruppe.....	36
Abbildung 14: Expression der S1P-Rezeptoren S1PR1, S1PR2, S1PR2 in der A. iliaca und A. carotis in den pAVK-Gruppe	37
Abbildung 15: Expression des S1PR1, S1PR2 und S1PR3 in der A. carotis und in der A. iliaca der Gruppen des Atherosklerose-Scores	38

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Risikofaktoren der Atherosklerose	4
Tabelle 2: Überblick über die Funktionen und mRNA-Verteilung der S1PR-Subtypen	12
Tabelle 3: Klassifikation des Gefäßlumens und des Plaquestatus im Sektionsprotokoll	17
Tabelle 4: Lumen- und Plaquestatus der Gesamtkohorte	18
Tabelle 5: Kriterien für die Einteilung der CP-Gruppe.....	18
Tabelle 6: Verteilung der Atherosklerose-Score	19
Tabelle 7: Kits	20
Tabelle 8: Geräte	20
Tabelle 9: Reagenzien	21
Tabelle 10: Pipettierschema der cDNA-Synthese für die qPCR	23
Tabelle 11: Pipettierschema eines Mastermix für eine Probe.....	24
Tabelle 12: Pipettierschema des qPCR-Ansatzes.....	24
Tabelle 13: Reaktionsprofil für die qPCR	24
Tabelle 14: Sequenzen der verwendeten Primerpaare für die qPCR	24
Tabelle 15: Charakterisierung der gebildeten Gruppen anhand ausgewählter klinischer Parameter.....	27
Tabelle 16: Überschneidungen der Carotisplaque- und der pAVK-Gruppe	28
Tabelle 17: Charakterisierung der Gruppen des Atherosklerose-Scores anhand klinisch relevanter Parameter	28
Tabelle 18: Intravaskuläre Assoziationen der S1P-Rezeptoren. S1PR1, S1PR2 und S1PR3 in der A. carotis der Kontrollgruppe.....	33
Tabelle 19: Intravaskuläre Assoziationen der S1P-Rezeptoren S1PR1, S1PR2 und S1PR3 in der A. iliaca der Kontrollgruppe	34
Tabelle 20: Intervaskuläre Assoziationen der S1P-Rezeptoren S1PR1, S1PR2 und S1PR3 zwischen der A. carotis und der A. iliaca der Kontrollgruppe.....	34
Tabelle 21: Gesamtmodell der ausgewählten Einflussvariablen auf die Carotisplaque. Die Analyse erfolgte mittel logistischer Regression	40
Tabelle 22: Finales Modell der Einflussvariablen auf die Carotisplaque	41
Tabelle 23: Gesamtmodell der ausgewählten Einflussvariablen auf die pAVK. Die Analyse erfolgte mittels logistischer Regression.....	42
Tabelle 24: Finales Modell der Einflussvariablen auf die pAVK.....	43
Tabelle 25: Gesamtmodell der Einflussvariablen des Atherosklerose-Scores	43
Tabelle 26: Finales Modell der Einflussvariablen des Atherosklerose-Scores	44

10 Literaturverzeichnis

- Aichner, F, Lang, W (2002): Atherothrombose. Ein interdisziplinärer Leitfaden für Grundlagen, Klinik und Management. Thieme, Stuttgart.
- Alberti, K, Eckel, R H, Grundy, S M, Zimmet, P Z, Cleeman, J I, Donato, K A, Fruchart, J-C, James, W P T, Loria, C M, Smith, S C (2009): Harmonizing the Metabolic Syndrome A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 120, 1640–1645.
- Allende, M L, Yamashita, T, Proia, R L (2003): G-protein-coupled receptor S1P1 acts within endothelial cells to regulate vascular maturation. *Blood*. 102, 3665–3667.
- Altman, D G (1995): Practical statistics for medical research. Chapman and Hall, London.
- 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 (2011): S1P, dihydro-S1P and C24:1-ceramide levels in the HDL-containing fraction of serum inversely correlate with occurrence of ischemic heart disease. *Lipids Health Dis*. 10, 70.
- Asahara, T, Masuda, H, Takahashi, T, Kalka, C, Pastore, C, Silver, M, Kearne, M, Magner, M, Isner, J M (1999): Bone Marrow Origin of Endothelial Progenitor Cells Responsible for Postnatal Vasculogenesis in Physiological and Pathological Neovascularization. *Circ Res*. 85, 221–228.
- Badimon, J J, Santos-Gallego, C G (2015): HDL Dysfunction: Is the Answer in the Sphinx's Riddle? *J Am Coll Cardiol*. 66, 1486–1488.
- Baeyens, A, Fang, V, Chen, C, Schwab, S R (2015): Exit Strategies: S1P Signaling and T Cell Migration. *Trends Immunol*. 36, 778–787.
- Baeyens, N, Schwartz, M A (2016): Biomechanics of vascular mechanosensation and remodeling. *Mol Biol Cell*. 27, 7–11.
- Bentzon, J F, Otsuka, F, Virmani, R, Falk, E (2014): Mechanisms of Plaque Formation and Rupture. *Circ Res*. 114, 1852–1866.
- Blaho, V A, Hla, T (2014): An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors. *J Lipid Res*. 55, 1596–1608.
- Brinkmann, V (2007): Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease. Mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. *Pharmacol Ther*. 115, 84–105.
- Brunkhorst, R, Vutukuri, R, Pfeilschifter, W (2014): Fingolimod for the treatment of neurological diseases-state of play and future perspectives. *Front Cell Neurosci*. 8, 283.
- Camm, J, Hla, T, Bakshi, R, Brinkmann, V (2014): Cardiac and vascular effects of fingolimod: mechanistic basis and clinical implications. *Am Heart J*. 168, 632–644.
- Carson, S, Miller, H, Witherow, D S (2012): Molecular Biology Techniques: A Classroom Laboratory Manual. Third Edition. Academic Press, San Diego.
- Chomczynski, P, Sacchi, N (2006): The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc*. 1, 581–585.

- Christoffersen, C, Obinata, H, Kumaraswamy, S B, Galvani, S, Ahnstrom, J, Sevvana, M, Egerer-Sieber, C, Muller, Y A, Hla, T, Nielsen, L B, Dahlback, B (2011): Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108, 9613–9618.
- Chun, J, Hartung, H-P (2010): Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Clin Neuropharmacol.* 33, 91–101.
- Cronenwett, J L, Johnston, K W (2014): Rutherford's vascular surgery. Eighth edition. Saunders/Elsevier, Philadelphia, PA.
- Daum, G, Grabski, A, Reidy, M A (2009): Sphingosine 1-Phosphate A Regulator of Arterial Lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29, 1439–1443.
- Debus, E S, Gross-Fengels, W (2012): Operative und interventionelle Gefäßmedizin: Springer Medizin. Springer, Berlin.
- Deutschman, D H, Carstens, J S, Klepper, R L, Smith, W S, Page, M, Young, T R, Gleason, L A, Nakajima, N, Sabbadini, R A (2003): Predicting obstructive coronary artery disease with serum sphingosine-1-phosphate. *Am Heart J.* 146, 62–68.
- Doran, A C, Meller, N, McNamara, C A (2008): Role of Smooth Muscle Cells in the Initiation and Early Progression of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28, 812–819.
- Eckstein, H.-H., Kühl, A., Berkefeld, J., Diel, R., Kopp, I., Langhoff, R., Lawall, H., Ringleb, P., Sander, D. & Storck, M. (2012): S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge der extracraniellen Carotisstenose. URL: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/004-028l_S3_Extracranielle_Carotisstenose_2012_verlaengert.pdf (Stand: 27.08.2016).
- Egom, E E, Rose, R A, Neyses, L, Soran, H, Cleland, J G F, Mamas, M A (2013): Activation of sphingosine-1-phosphate signalling as a potential underlying mechanism of the pleiotropic effects of statin therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 50, 79–89.
- Frohman, E M, Racke, M K, Raine, C S (2006): Multiple Sclerosis - The Plaque and Its Pathogenesis. *N Engl J Med.* 354, 942–955.
- Fruchart, J-C (2004): New Risk Factors for Atherosclerosis and Patient Risk Assessment. *Circulation.* 109, III-15-III-19.
- George, A L, Bangalore-Prakash, P, Rajoria, S, Suriano, R, Shanmugam, A, Mittelman, A, Tiwari, R K (2011): Endothelial progenitor cell biology in disease and tissue regeneration. *J Hematol Oncol.* 4, 24.
- Gimbrone, M A (1999): Vascular Endothelium, Hemodynamic Forces, and Atherogenesis. *Am J Pathol.* 155, 1–5.
- Gimbrone, M A, García-Cardena, G (2016): Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res.* 118, 620–636.
- González-Díez, M, Rodríguez, C, Badimon, L, Martínez-González, J (2008): Prostacyclin induction by high-density lipoprotein (HDL) in vascular smooth muscle cells depends on sphingosine 1-phosphate receptors: Effect of simvastatin. *Thromb Haemost.* 100, 119–126.
- Grundey, S M (2008): Metabolic Syndrome Pandemic. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28, 629–636.
- Grundey, S M, Pasternak, R, Greenland, P, Smith, S, Fuster, V (1999): Assessment of Cardiovascular Risk by Use of Multiple-Risk-Factor Assessment Equations: A Statement for Healthcare Professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *Circulation.* 100, 1481–1492.

- Gulbins, E, Petrache, I (2013): Sphingolipids in disease: Handbook of experimental pharmacology, 0171-2004. Volume 216. Springer, Wien.
- Guzik, T J, Sadowski, J, Kapelak, B, Jopek, A, Rudzinski, P, Pillai, R, Korbut, R, Channon, K M (2004): Systemic Regulation of Vascular NAD(P)H Oxidase Activity and Nox Isoform Expression in Human Arteries and Veins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24, 1614–1620.
- Hanel, P, Andreani, P, Graler, M H (2007): Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. *FASEB J.* 21, 1202–1209.
- Hansson, G K, Hermansson, A (2011): The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol.* 12, 204–212.
- Hla, T, Brinkmann, V (2011): Sphingosine 1-phosphate (S1P). Physiology and the effects of S1P receptor modulation. *Neurology.* 76, S3-S8.
- Igarashi, J, Miyoshi, M, Hashimoto, T, Kubota, Y, Kosaka, H (2007): Statins induce S1P1 receptors and enhance endothelial nitric oxide production in response to high-density lipoproteins. *Br J Pharmacol.* 150, 470–479.
- Indolfi, C, Vittorio Avvedimento, E, Di Lorenzo, E, Esposito, G, Rapacciuolo, A, Giuliano, P, Grieco, D, Cavuto, L, Stingone, A M, Ciullo, I, Condorelli, G, Chiariello, M (1997): Activation of cAMP–PKA signaling in vivo inhibits smooth muscle cell proliferation induced by vascular injury. *Nat Med.* 3, 775–779.
- Keul, P, Lucke, S, von Wnuck Lipinski, K, Bode, C, Gräler, M, Heusch, G, Levkau, B (2011): Sphingosine-1-phosphate receptor 3 promotes recruitment of monocyte/macrophages in inflammation and atherosclerosis. *Circ Res.* 108, 314–323.
- Keul, P, Tölle, M, Lucke, S, von Wnuck Lipinski, K, Heusch, G, Schuchardt, M, van der Giet, M, Levkau, B (2007): The Sphingosine-1-Phosphate Analogue FTY720 Reduces Atherosclerosis in Apolipoprotein E–Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27, 607–613.
- Kimura, T, Tomura, H, Mogi, C, Kuwabara, A, Damirin, A, Ishizuka, T, Sekiguchi, A, Ishiura, M, Im, D-S, Sato, K, Murakami, M, Okajima, F (2006): Role of Scavenger Receptor Class B Type I and Sphingosine 1-Phosphate Receptors in High Density Lipoprotein-induced Inhibition of Adhesion Molecule Expression in Endothelial Cells. *J Biol Chem.* 281, 37457–37467.
- Koshiba, T, Damme, B, Lu, Y, Yan, Y, Rutgeerts, O, Overbergh, L, Tanaka, K, Waer, M, Mathieu, C, Pirenne, J (2002): Combined use of FTY720 and cyclosporine A prevents chronic allograft vasculopathy. *Transplant Proc.* 34, 748–749.
- Ku, D N, Giddens, D P, Zarins, C K, Glagov, S (1985): Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 5, 293–302.
- Larena-Avellaneda, A, Franke, S (2004): Die Intimahyperplasie - Bedeutung für den Gefäßchirurgen und therapeutische Möglichkeiten. *Gefässchirurgie* 9, 89–95.
- Lee, J-F, Gordon, S, Estrada, R, Wang, L, Siow, D L, Wattenberg, B W, Lominadze, D, Lee, M-J (2009): Balance of S1P1 and S1P2 signaling regulates peripheral microvascular permeability in rat cremaster muscle vasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 296, 33–42.
- Leor, J, Marber, M (2006): Endothelial progenitors: a new Tower of Babel? *J Am Coll Cardiol.* 48, 1588–1590.

- Levkau, B (2015): HDL-S1P. Cardiovascular functions, disease-associated alterations, and therapeutic applications. *Front Pharmacol.* 6, 201.
- Liapis, C D, Avgerinos, E D, Kadoglou, N P, Kakisis, J D (2009): What a vascular surgeon should know and do about atherosclerotic risk factors. *J Vasc Surg.* 49, 1348–1354.
- Libby, P (2012): Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32, 2045–2051.
- Libby, P (2013): Mechanisms of Acute Coronary Syndromes and Their Implications for Therapy. *N Engl J Med.* 368, 2004–2013.
- Libby, P, Ridker, P M, Hansson, G K (2011): Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature.* 473, 317–325.
- 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 (2000): Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest.* 106, 951–961.
- Livak, K J, Schmittgen, T D (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25, 402–408.
- Lucke, S, Levkau, B (2010): Endothelial Functions of Sphingosine-1-phosphate. *Cell Physiol Biochem.* 26, 87–96.
- Lusis, A J (2000): Atherosclerosis. *Nature.* 407, 233–241.
- Maceyka, M, Harikumar, K B, Milstien, S, Spiegel, S (2012): Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends Cell Biol.* 22, 50–60.
- Mack, C P (2011): Signaling Mechanisms That Regulate Smooth Muscle Cell Differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31, 1495–1505.
- Majesky, M W (2007): Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27, 1248–1258.
- Marsolais, D, Rosen, H (2009): Chemical modulators of sphingosine-1-phosphate receptors as barrier-oriented therapeutic molecules. *Nat Rev Drug Discov.* 8, 297–307.
- Michaud, J, Im, D-S, Hla, T (2010): Inhibitory role of sphingosine 1-phosphate receptor 2 in macrophage recruitment during inflammation. *J Immunol.* 184, 1475–1483.
- Mohler, E R 3 (2003): Peripheral arterial disease: identification and implications. *Arch Intern Med.* 163, 2306–2314.
- Nichols, M, Townsend, N, Scarborough, P, Rayner, M (2014): Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update. *Eur Heart J.* 35, 2950–2959.
- Nofer, J-R, Bot, M, Brodde, M, Taylor, P J, Salm, P, Brinkmann, V, van Berkel, T, Assmann, G, Biessen, E A (2007): FTY720, a Synthetic Sphingosine 1 Phosphate Analogue, Inhibits Development of Atherosclerosis in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. *Circulation.* 115, 501–508.
- 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 (2004): HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest.* 113, 569–581.
- Olivera, A, Allende, M L, Proia, R L (2013): Shaping the landscape: metabolic regulation of S1P gradients. *Biochim Biophys Acta.* 1831, 193–202.

- Olivera, A, Rosenfeldt, H M, Bektas, M, Wang, F, Ishii, I, Chun, J, Milstien, S, Spiegel, S (2003): Sphingosine Kinase Type 1 Induces G12/13-mediated Stress Fiber Formation, yet Promotes Growth and Survival Independent of G Protein-coupled Receptors. *J Biol Chem.* 278, 46452–46460.
- 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 (2007): Promotion of Lymphocyte Egress into Blood and Lymph by Distinct Sources of Sphingosine-1-Phosphate. *Science.* 316, 295–298.
- R Core Team (2015): R: A language and environment for statistical. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rahmani, M, Cruz, R P, Granville, D J, McManus, B M (2006): Allograft Vasculopathy Versus Atherosclerosis. *Circ Res.* 99, 801–815.
- Razzouk, L, Rockman, C B, Patel, M R, Guo, Y, Adelman, M A, Riles, T S, Berger, J S (2015): Co-existence of vascular disease in different arterial beds. Peripheral artery disease and carotid artery stenosis – Data from Life Line Screening®. *Atherosclerosis.* 241, 687–691.
- Richter, G (2003): *Praktische Biochemie. Grundlagen und Techniken.* Thieme, Stuttgart.
- Rivera, R, Chun, J (2008): Biological effects of lysophospholipids. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 160, 25–46.
- Rosen, H, Sanna, M G, Cahalan, S M, Gonzalez-Cabrera, P J (2007): Tipping the gatekeeper: S1P regulation of endothelial barrier function. *Trends Immunol.* 28, 102–107.
- Russell, R (1999): Atherosclerosis - An Inflammatory Disease. *N Engl J Med.* 340, 115–126.
- Sanchez, T, Hla, T (2004): Structural and functional characteristics of S1P receptors. *J Cell Biochem.* 92, 913–922.
- 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 (2015): Defects of High-Density Lipoproteins in Coronary Artery Disease Caused by Low Sphingosine-1-Phosphate Content. *J Am Coll Cardiol.* 66, 1470–1485.
- Scheubel, R J, Zorn, H, Silber, R-E, Kuss, O, Morawietz, H, Holtz, J, Simm, A (2003): Age-dependent depression in circulating endothelial progenitor cells inpatients undergoing coronary artery bypass grafting. *J Am Coll Cardiol.* 42, 2073–2080.
- Schiffrin, E L, Lipman, M L, Mann, J F (2007): Chronic Kidney Disease. Effects on the Cardiovascular System. *Circulation.* 116, 85–97.
- Schwab, S R, Pereira, J P, Matloubian, M, Xu, Y, Huang, Y, Cyster, J G (2005): Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. *Science.* 309, 1735–1739.
- Shimizu, T, Nakazawa, T, Cho, A, Dastvan, F, Shilling, D, Daum, G, Reidy, M A (2007): Sphingosine 1-phosphate receptor 2 negatively regulates neointimal formation in mouse arteries. *Circ Res.* 101, 995–1000.
- 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 (2012): Sphingosine-1-phosphate receptor 3 promotes neointimal hyperplasia in mouse iliac-femoral arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32, 955–961.
- Skoura, A, Hla, T (2009): Regulation of vascular physiology and pathology by the S1P2 receptor subtype. *Cardiovasc Res.* 82, 221–228.

- Skoura, A, Michaud, J, Im, D-S, Thangada, S, Xiong, Y, Smith, J D, Hla, T (2011): Sphingosine-1-phosphate receptor-2 function in myeloid cells regulates vascular inflammation and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31, 81–85.
- Spiegel, S, Milstien, S (2003): Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4, 397–407.
- Spiegel, S, Milstien, S (2011): The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. *Nat Rev Immunol.* 11, 403–415.
- Statistisches Bundesamt (2014): Todesursachen in Deutschland. Fachserie 12: Reihe 4. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden.
- Szczepaniak, W S, Pitt, B R, McVerry, B J (2010): S1P2 receptor-dependent Rho-kinase activation mediates vasoconstriction in the murine pulmonary circulation induced by sphingosine 1-phosphate. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 299, 45.
- Takuwa, Y, Okamoto, Y, Yoshioka, K, Takuwa, N (2012): Sphingosine-1-phosphate signaling in physiology and diseases. *Biofactors.* 38, 329–337.
- Tölle, M, Levkau, B, Keul, P, Brinkmann, V, Giebing, G, Schönfelder, G, Schäfers, M, Wnuck Lipinski, K von, Jankowski, J, Jankowski, V, Chun, J, Zidek, W, van der Giet, M (2005): Immunomodulator FTY720 Induces eNOS-dependent arterial vasodilatation via the lysophospholipid receptor S1P3. *Circ Res.* 96, 913–920.
- Vasa, M, Fichtlscherer, S, Aicher, A, Adler, K, Urbich, C, Martin, H, Zeiher, A M, Dimmeler, S (2001): Number and Migratory Activity of Circulating Endothelial Progenitor Cells Inversely Correlate With Risk Factors for Coronary Artery Disease. *Circ Res.* 89, e1-e7.
- Walter, D H, Rochwalsky, U, Reinhold, J, Seeger, F, Aicher, A, Urbich, C, Spyridopoulos, I, Chun, J, Brinkmann, V, Keul, P, Levkau, B, Zeiher, A M, Dimmeler, S, Haendeler, J (2007): Sphingosine-1-Phosphate Stimulates the Functional Capacity of Progenitor Cells by Activation of the CXCR4-Dependent Signaling Pathway via the S1P3 Receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27, 275–282.
- Weerd, M de, Greving, J P, de Jong, A. W. F., Buskens, E, Bots, M L (2009): Prevalence of Asymptomatic Carotid Artery Stenosis According to Age and Sex. Systematic Review and Metaregression Analysis. *Stroke.* 40, 1105–1113.
- WHO (2014): Global status report on noncommunicable diseases 2014. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Wilkerson, B A, Argraves, K M (2014): The role of sphingosine-1-phosphate in endothelial barrier function. *Biochim Biophys Acta.* 1841, 1403–1412.
- Wilkerson, B A, Grass, G D, Wing, S B, Argraves, W S, Argraves, K M (2012): Sphingosine 1-Phosphate (S1P) Carrier-dependent Regulation of Endothelial Barrier High Density Lipoprotein (HDL)-S1P Prolongs Endothelial Barrier Enhancement As Compared With Albumin-S1P Via Effects On Levels, Trafficking, And Signaling Of S1P1. *J Biol Chem.* 287, 44645–44653.
- 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 (2015): Decreased serum concentrations of sphingosine-1-phosphate in sepsis. *Crit Care.* 19, 580.
- Wymann, M P, Schneiter, R (2008): Lipid signalling in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9, 162–176.

- Zhang, G, Yang, L, Kim, G S, Ryan, K, Lu, S, O'Donnell, R K, Spokes, K, Shapiro, N, Aird, W C, Kluk, M J, Yano, K, Sanchez, T (2013): Critical role of sphingosine-1-phosphate receptor 2 (S1PR2) in acute vascular inflammation. *Blood*. 122, 443–455.
- Zhou, J, Li, Y-S, Chien, S (2014): Shear stress-initiated signaling and its regulation of endothelial function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 34, 2191–2198.

11 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Larena-Avellaneda für das Überlassen dieses interessanten Themas danken. Mein Dank gilt außerdem Herrn Dr. Günter Daum, der mich in unzähligen „Meetings“ insbesondere bei der Auswertung und dem Verfassen dieser Arbeit begleitete. Ihnen beiden möchte ich auf diesem Wege noch einmal meinen besonderen Dank für die kompetente und ausdauernde Unterstützung ausdrücken.

Bedanken möchte ich mich desweiteren bei Dr. Markus Geissen für die hervorragende Einführung in die Feinheiten der qPCR und bei Astrid Becker für die Hilfsbereitschaft im Labor. Herrn Gerhard Schön (Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) möchte ich für die sehr kompetente Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten danken.

Frau Dr. Sabine Wipper möchte ich für die freundliche Betreuung danken.

Weiterer Dank geht nach München an Herrn Prof. Dr. Keil für die Ermöglichung dieser Studie und an Susanne Ring sowie dem gesamten Team der Rechtsmedizin an der LMU für die Entnahme der Proben. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Martje Odinga für die mühevollen Zusammenfassung der Sektionsprotokolle bedanken.

Besonderer Dank gilt außerdem meinen Eltern und Großeltern. Ohne eure Unterstützung wäre weder diese Arbeit, noch das gesamte Studium möglich gewesen. Meinem Bruder möchte ich für die unermüdliche Hilfe und meiner Freundin für die emotionale Unterstützung während der gesamten Promotionszeit danken.

12 Lebenslauf

In der elektronischen Version wird auf eine Veröffentlichung des Lebenslaufs aus datenschutzrechtlichen Gründen verzichtet.

13 Anhang

Nummer	Alter	Sex 0=M, 1=W	CA S1PR1 [ln(%GAPDH)]	CA S1PR2 [ln(%GAPDH)]	CA S1PR3 [ln(%GAPDH)]	IL S1PR1 [ln(%GAPDH)]	IL S1PR2 [ln(%GAPDH)]	IL S1PR3 [ln(%GAPDH)]	CP 0=nein 1=ja	PAVK 0=nein 1=ja	BMI kg/m ²	Nieren 0=normal 1=pathologisch	Diabetes 0=nein 1=ja	Hypertonus 0=nein 1=ja	Atherosklose-Score (0=CP/pAVK nein; 1=CP oder pAVK; 2=CP+pAVK)
3	20	0	-0,44	-1,46	1,53	0,55	-0,55	1,52	0	0	23	0	0	0	0
5	50	0	0,32	-1,45	1,91	0,33	-0,91	1,52	0	0	15	1	0	0	0
6	64	0	1,61	-0,08	0,29	0,98	0,79	0,91	0	1	31	0	0	0	1
7	75	0	1,70	-0,53	0,41	-1,06	-1,85	1,35	0	1	25	0	0	0	1
8	63	0	1,88	-0,60	2,01	0,90	-0,58	1,03	1	1	29	0	0	0	2
9	53	0	2,07	-0,79	1,03	0,19	-1,46	0,39	1	1	36	0	1	1	2
10	65	0	1,05	-0,81	1,12	1,67	-0,60	0,90	1	1	25	0	0	0	2
11	41	1	1,84	-0,30	0,60	0,25	-0,50	-0,77	0	0	20	1	0	0	0
12	85	1	0,93	-0,64	0,51	0,61	-0,66	0,62	1	1	28	1	0	1	2
13	79	1	1,18	0,12	0,80	-0,42	-1,28	-0,13	0	1	24	1	0	0	1
16	84	1	0,95	-1,08	1,57	0,08	-1,31	1,89	1	1	22	1	0	0	2
17	83	1	0,67	-1,00	0,01	-1,15	-3,08	0,70	0	1	31	1	1	1	1
18	63	1	0,08	-0,71	0,96	-0,34	-1,27	0,56	0	0	20	1	0	0	0
21	69	0	0,35	-1,39	0,92	1,11	-1,21	1,26	1	1	32	1	1	0	2
22	40	1	0,60	-0,78	0,31	0,00	-0,65	0,47	0	0	21	0	0	0	0
23	46	0	1,17	-0,70	2,20	1,75	0,01	1,71	0	0	22	0	0	1	1
24	79	1	0,11	-1,51	0,71	1,81	-0,76	0,48	1	0	21	1	0	0	1
27	79	0	0,22	-0,99	2,05	0,41	-1,05	1,11	0	1	28	1	0	0	1
28	75	1	0,71	0,12	0,42	0,77	-0,38	0,58	1	1	21	1	0	1	2
30	38	0	1,16	-0,28	0,95	1,09	-0,62	1,86	0	0	38	0	0	0	0
31	48	0	0,98	-0,43	1,23	1,17	0,28	1,80	0	1	20	1	0	0	1
32	49	0	1,76	-0,23	1,41	1,07	-1,00	2,09	0	0	27	0	0	0	0
34	36	1	-0,18	-0,75	1,72	-0,48	-0,60	2,15	0	0	25	0	0	0	0
35	79	1	0,80	-0,29	1,05	1,23	-0,06	1,24	1	1	29	1	0	0	2
36	23	0	0,94	0,11	2,15	1,30	-0,11	1,89	0	0	24	0	0	0	0
37	79	1	0,65	-1,09	-0,12	1,04	-1,66	0,48	1	1	26	0	0	0	2
38	49	0	2,15	-0,37	1,61	1,86	0,23	2,07	0	1	25	0	0	0	1
39	70	0	0,32	-0,95	1,20	1,16	0,41	1,42	0	1	20	1	0	1	1
40	89	1	-0,34	-2,12	1,28	0,18	-1,79	-0,10	1	1	24	1	0	0	2
41	86	0	1,25	-0,70	0,49	1,50	-1,13	0,09	1	1	25	1	0	0	2
42	62	0	1,14	-1,15	0,46	-0,40	-1,79	-0,02	0	1	35	1	0	0	2
43	68	1	-0,59	-2,14	1,61	1,10	-0,82	1,67	1	1	19	1	0	0	2
45	73	1	0,34	-0,79	0,80	1,26	-0,11	1,27	1	1	39	1	1	1	2
46	86	0	0,80	-1,18	0,47	1,13	-0,06	1,02	1	1	23	1	0	0	2
48	66	1	1,82	-0,60	-0,66	1,51	-0,05	0,76	0	1	47	1	1	0	1
49	25	0	0,34	-1,54	0,96	1,22	0,17	1,35	0	0	28	0	0	0	0
50	65	0	1,94	-0,07	0,28	-2,01	-1,56	-0,67	1	1	23	0	0	0	2
51	57	0	1,31	-0,22	1,05	0,47	-0,60	1,69	0	0	28	0	0	0	0
52	75	1	0,59	-1,67	1,42	1,52	-0,97	1,44	0	0	31	1	0	0	0

Tabelle A- 1: Datensatz der Studie (1/3)

Nummer	Alter	Sex 0=M, 1=W	CA S1PR1 [ln(%GAPDH)]	CA S1PR2 [ln(%GAPDH)]	CA S1PR3 [ln(%GAPDH)]	IL S1PR1 [ln(%GAPDH)]	IL S1PR2 [ln(%GAPDH)]	IL S1PR3 [ln(%GAPDH)]	CP 0=nein 1=ja	pAVK 0=nein 1=ja	BMI kg/m2	Nieren 0=normal 1=pathologisch	Diabetes 0=nein 1=ja	Hypertonus 0=nein 1=ja	Atherosklerose-Score (0=CP/pAVK nein; 1=CP oder pAVK; 2=CP+pAVK)
53	71	0	0.69	-1.37	1.39	-0.04	-1.09	0.85	0	1	34	0	0	0	1
54	46	0	1.12	-1.32	0.70	0.95	-1.31	0.66	0	1	31	1	0	0	1
55	36	0	-0.06	-1.06	1.25	1.07	-1.29	1.19	0	0	29	0	0	0	0
56	55	1	1.30	-0.47	1.04	0.64	-0.62	1.16	0	0	20	0	0	0	0
57	75	1	0.45	-1.40	1.88	2.03	0.70	0.55	1	1	22	1	0	0	2
58	70	0	0.33	-1.09	1.45	0.83	-0.70	1.98	0	1	15	1	0	1	1
59	64	0	0.17	-0.88	1.56	-0.36	-1.27	0.80	1	1	19	0	1	1	2
60	75	0	1.49	-1.17	1.57	1.49	-0.99	1.59	1	1	29	1	1	0	2
61	49	0	1.84	0.13	1.43	1.16	-0.36	1.58	0	0	32	1	0	0	0
62	42	0	0.55	-0.40	1.18	1.46	0.14	0.87	0	0	30	0	0	0	0
64	51	0	-0.93	-1.50	1.06	1.59	-0.50	0.15	0	0	21	0	0	0	0
65	35	1	-0.07	-0.05	1.16	1.35	0.34	1.45	0	0	30	0	0	0	0
66	77	0	-0.13	-0.91	1.89	1.09	-0.17	1.42	0	1	25	1	0	0	1
67	59	1	-0.10	-1.25	1.33	1.93	0.59	2.57	0	0	24	1	0	0	0
68	53	0	-0.24	-1.31	1.91	0.86	-0.40	2.02	0	0	27	0	0	0	0
69	76	0	2.09	-0.65	0.68	1.07	1.32	1.85	0	1	28	0	0	0	1
70	51	0	0.40	-0.50	0.79	0.87	-0.57	0.64	0	0	37	1	0	0	0
71	86	1	0.76	-0.73	0.99	-0.18	-1.05	0.10	1	1	21	1	0	1	2
72	72	1	1.40	-0.13	2.11	0.85	-0.46	1.65	1	1	20	0	0	1	2
73	78	0	1.28	0.38	0.43	1.00	0.01	0.58	0	0	27	0	0	0	0
74	40	0	0.23	-0.67	2.09	1.56	0.30	2.36	0	0	21	0	0	0	0
75	39	1	0.28	-0.78	2.03	1.60	1.01	0.90	0	0	29	1	0	0	0
76	50	1	-0.35	-1.11	1.60	0.87	-0.49	1.85	0	0	18	0	0	0	0
77	43	0	-0.42	-0.85	1.66	-0.44	-0.93	1.98	0	0	24	0	0	0	0
78	39	0	-0.17	-1.02	1.27	1.22	-0.42	0.71	0	0	19	0	0	0	0
79	41	0	0.25	-1.31	1.23	-0.29	-0.54	1.97	0	0	22	0	0	0	0
80	69	1	0.62	-0.47	0.71	0.60	-0.03	1.12	0	0	33	1	0	0	0
81	56	0	1.37	-0.19	0.19	0.61	-1.29	1.63	1	1	25	0	0	0	2
82	74	0	0.78	-0.39	1.36	-0.46	-1.76	1.38	1	1	25	1	0	0	2
83	70	1	0.98	-0.77	-0.16	2.13	1.95	1.93	1	1	23	1	0	1	2
84	19	1	0.17	-0.49	0.87	0.95	-0.34	1.30	0	0	15	0	0	0	0
85	61	0	-0.69	-0.63	-0.89	1.40	1.29	1.30	0	1	41	1	1	0	1
86	24	0	-0.14	-1.42	1.35	1.48	0.14	1.74	0	0	20	0	0	0	0
87	73	1	0.53	-0.90	1.38	1.32	0.53	1.41	0	1	30	0	0	0	1
88	73	1	-1.89	-1.58	0.22	0.22	-0.72	2.10	0	0	22	0	0	0	0
89	54	0	-1.09	-1.25	-0.09	-0.61	-1.07	1.53	0	0	32	0	0	0	0
90	86	1	0.14	-1.43	1.22	0.97	-0.53	1.30	0	1	24	1	0	0	1
91	54	0	0.16	-1.00	1.13	0.72	-1.90	1.59	0	0	31	0	0	0	0
93	70	0	-0.23	-1.03	0.69	0.93	0.32	0.81	0	1	25	1	1	1	1

Tabelle A- 2: Datensatz der Studie (2/3)

Nummer	Alter	Sex 0=M, 1=W	CA S1PR1 [ln(%GAPDH)]	CA S1PR2 [ln(%GAPDH)]	CA S1PR3 [ln(%GAPDH)]	IL S1PR1 [ln(%GAPDH)]	IL S1PR2 [ln(%GAPDH)]	IL S1PR3 [ln(%GAPDH)]	CP 0=nein 1=ja	pAVK 0=nein 1=ja	BMI kg/m2	Nieren 0=normal 1=pathologisch	Diabetes 0=nein 1=ja	Hypertonus 0=nein 1=ja	Atherosklerose-Score (0=CP/pAVK nein; 1=CP oder pAVK; 2=CP+pAVK)
94	58	0	-0,23	-1,03	0,69	1,59	1,09	1,83	1	1	43	1	1	1	2
95	101	0	0,70	-1,07	1,88	0,83	-0,95	1,12	1	1	14	1	0	0	2
96	69	0	0,43	-1,02	0,99	0,65	-0,13	1,91	1	1	55	1	1	1	2
97	32	0	0,69	-0,96	1,74	0,92	0,16	0,75	0	0	23	0	0	0	0
98	54	0	1,48	0,07	0,61	2,24	0,01	1,09	0	0	33	0	0	0	0
99	82	1	-1,33	-1,20	0,07	0,11	-0,83	0,36	0	0	nd	1	0	1	0
111	72	1	1,19	-1,37	0,37	-1,71	-2,09	-0,60	0	0	36	0	0	0	0
135	73	1	0,35	-0,84	1,30	1,27	0,57	1,22	1	0	25	0	0	1	1
153	63	0	0,55	-1,41	0,37	1,17	-0,05	0,55	1	1	31	0	0	1	2
174	76	1	-1,29	-2,49	-0,08	-0,67	-0,94	-0,62	0	1	36	0	0	0	1
175	72	0	0,53	-0,69	0,72	-0,20	-1,08	0,27	1	1	31	1	0	1	2
176	55	1	0,98	0,13	0,95	1,93	0,39	0,47	0	1	22	1	0	1	1
210	80	1	-0,79	-1,83	-1,08	0,17	-3,89	-0,30	1	1	29	1	0	0	2

Tabelle A- 3: Daten der Studie (3/3)

14 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: