

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Universitäres Herzzentrum  
Klinik und Poliklinik für Gefäßmedizin

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

## **Expressionsmuster der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren in der humanen Aorta in Assoziation mit Atherosklerose**

### **Dissertation**

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

vorgelegt von:

Chris Claudius Winter  
aus Bad Soden am Taunus

Hamburg 2017

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 06.09.2018**

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

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

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Jörg Heeren**

***„It always seems impossible until it's done.“***

– Nelson Mandela

**für Mama, Papa und Leni**

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Aorta.....	1
1.1.1	Einteilung.....	2
1.1.2	Wandaufbau und Funktion .....	3
1.2	Arteriosklerose und Atherosklerose .....	5
1.2.1	Definition.....	5
1.2.2	Risikofaktoren der Atherosklerose.....	6
1.2.3	Pathogenese der Atherosklerose .....	7
1.2.4	Klassifikation der Atherosklerose nach Stary <i>et al.</i> .....	9
1.3	Sphingosin-1-Phosphat und seine Rezeptoren.....	9
1.3.1	Sphingosin-1-Phosphat .....	9
1.3.2	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren .....	11
1.3.2.1	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 1.....	12
1.3.2.2	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 2.....	13
1.3.2.3	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 3.....	14
<b>2</b>	<b>Fragestellung und Zielsetzung .....</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>17</b>
3.1	Material .....	17
3.1.1	Studie .....	17
3.1.2	Definition der Plaqueausprägung .....	17
3.1.3	Chemikalien, Kits und Geräte.....	19
3.2	Methoden .....	20
3.2.1	RNA-Isolation .....	20
3.2.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten RNA-Lösung und Qualitätskriterien .....	21
3.2.3	cDNA-Synthese .....	22
3.2.4	Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR).....	22
3.2.5	Statistik .....	24
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>26</b>
4.1	Beschreibung der Gesamtkohorte .....	26
4.1.1	Einteilung in Kontroll- und Plaquegruppe .....	26
4.1.2	Lokalisation der Aortenplaques .....	27
4.2	Analyse der Expression der S1P-Rezeptoren.....	28
4.2.1	Expression der S1P-Rezeptoren in den verschiedenen Aortenabschnitten in der Gesamtkohorte sowie Kontroll- und Plaquegruppe .....	29

4.2.2	Korrelation der Expression der S1P-Rezeptoren untereinander in der Kontrollgruppe .....	31
4.2.3	Einfluss klinischer Parameter auf die Expression der S1P-Rezeptoren in den verschiedenen Aortenabschnitten der Gesamtkohorte.....	33
4.2.4	Einfluss der Atherosklerose auf die Expression der S1P-Rezeptoren.....	34
4.3	Regressionsanalyse: Einfluss verschiedener Parameter auf das Vorkommen von Plaque in der Aorta.....	39
4.3.1	Aorta ascendens.....	39
4.3.2	Aorta descendens.....	41
4.3.3	Aorta abdominalis.....	42
4.3.4	Plaquescore der Gesamtaorta.....	44
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>47</b>
5.1	Beschreibung der Studienkohorte.....	47
5.2	Expressionsunterschiede der S1P-Rezeptoren zwischen den einzelnen Aortenabschnitten .....	48
5.3	Wechselbeziehungen der S1P-Rezeptorexpression in der Kontrollgruppe .....	49
5.4	Veränderungen der S1P-Rezeptorexpression bei Atherosklerose .....	50
5.4.1	Einfluss der S1P-Rezeptorexpression und klinischen Parameter auf Atherosklerose.....	51
5.5	Limitationen.....	57
<b>6</b>	<b>Fazit und Ausblick .....</b>	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>59</b>
<b>8</b>	<b>Summary .....</b>	<b>60</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>61</b>
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>63</b>
<b>11</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>73</b>
<b>12</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>74</b>
<b>13</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>75</b>
<b>14</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>80</b>
<b>15</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>81</b>
<b>16</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>83</b>

## **1 Einleitung**

In den westlichen Industrienationen ist die häufigste Todesursache die koronare Herzkrankheit (KHK), die auf die Folgen der Atherosklerose zurückzuführen ist [1]. Die Atherosklerose ist eine Systemerkrankung der Arterien, welche durch Verhärtungen in den Gefäßwänden gekennzeichnet ist. Neben den bei der KHK betroffenen Koronargefäßen kann aber auch die Aorta, als das zentrale Gefäß des Körperkreislaufs, atherosklerotischen Veränderungen unterliegen. Die klinische Erfahrung hat gezeigt, dass in der Aorta das Auftreten von Atherosklerose von proximal nach distal zunimmt [2].

Die Mechanismen, die der Ausbildung dieser Erkrankung zu Grunde liegen, involvieren zahlreiche physiologische und pathophysiologische Vorgänge. Diese Arbeit untersucht das Expressionsmuster der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren (S1PR) in verschiedenen Aortenabschnitten in Assoziation mit Atherosklerose. Sphingosin-1-Phosphat (S1P) ist ein bioaktives Sphingolipid, welches unter anderem als Bestandteil des HDL (High-Density Lipoprotein) für die Entstehung und Entwicklung der Atherosklerose eine wichtige Rolle spielt.

### **1.1 Aorta**

Die humane Aorta des Erwachsenen ist 30-40 cm lang, besitzt einen sich im Verlauf verjüngenden Durchmesser von 2,5-3,5 cm und eine Wandstärke von ca. 2,5 mm. Sie entspringt aus dem linken Ventrikel des Herzens und wird in vier Abschnitte untergliedert: Aorta ascendens, Arcus aortae, Aorta descendens und Aorta abdominalis (s. Abb. 1).

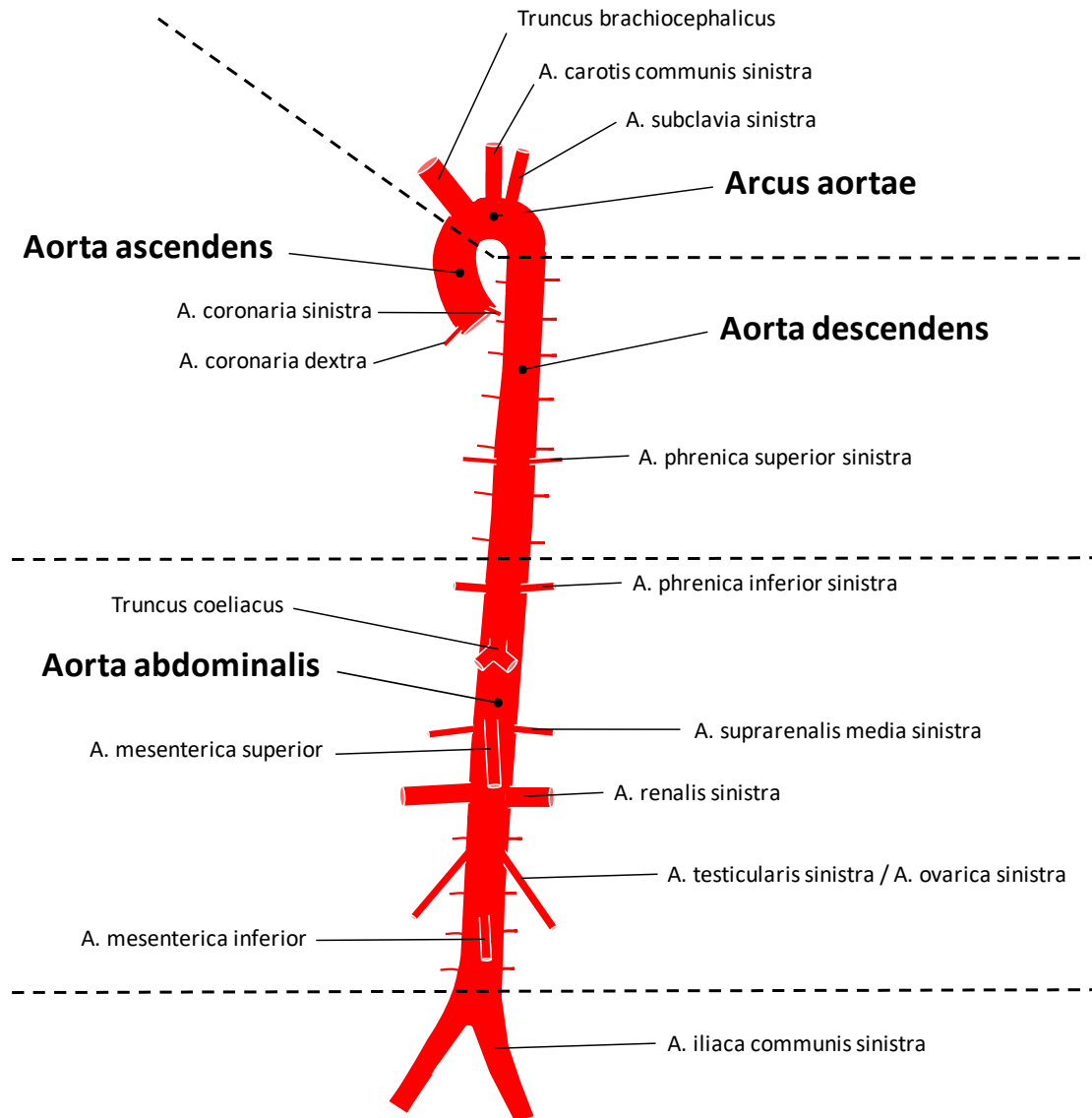


Abb. 1: Schematische Darstellung der Aortenabschnitte mit abgehenden Gefäßen

### 1.1.1 Einteilung

#### Aorta ascendens:

Die Aorta ascendens beginnt direkt nach der Aortenklappe und verläuft größtenteils intraperikardial, senkrecht steigend bis zum Truncus brachiocephalicus. Direkt hinter der Aortenklappe entspringen die beiden Koronararterien (A. coronaria dextra, A. coronaria sinistra) zur Versorgung des Herzens.

#### Arcus aortae:

Von der konvexen Seite des Arcus aortae gehen die großen Arterien für die Versorgung von Kopf und Arm ab: Truncus brachiocephalicus, A. carotis communis sinistra und die A. subclavia sinistra.

### Aorta descendens:

Der sich dem Aortenbogen anschließende Teil wird als Aorta descendens bezeichnet. Er verläuft absteigend durch die Brusthöhle bis zum Zwerchfell (Diaphragma), weshalb er auch als Brustaorta (Aorta thoracica) benannt wird [3]. Von der Aorta descendens entspringen folgende Äste: Rr. bronchiales, Rr. oesophagei, Rr. mediastinales, Rr. pericardiaci und die Aa. phrenicae superiores. Die Aa. intercostales posteriores sind die einzigen parietalen Äste der Brustaorta.

### Aorta abdominalis:

Nachdem die Aorta descendens durch das Zwerchfell im Hiatus aorticus auf Höhe von BWK XII (12. Brustwirbelkörper) tritt, wird sie als Aorta abdominalis bezeichnet. Sie verläuft im Retroperitonealraum etwas links vor der Wirbelsäule, bevor sie sich auf Höhe von LWK IV (4. Lendenwirbelkörper) in die beiden Aa. iliaca communis aufteilt.

Die Aorta abdominalis gibt zahlreiche Äste ab, die zur Versorgung der Bauch- und Beckeneingeweide sowie zur Versorgung der Wand des Abdomens dienen. Zu den paarig angelegten Aortenästen zählen die A.phrenica inferior, Aa. lumbales, A. suprarenalis, A. renalis und die A. ovarica/testicularis. Als unpaarige Aortenäste entspringen der Truncus coeliacus, die A. mesenterica superior sowie die A. mesenterica inferior [4, 5].

### **1.1.2 Wandaufbau und Funktion**

Als Hauptschlagader hat die Aorta die Funktion, das aus dem Herzen kommende, oxygenierte Blut gleichmäßig in den Körperkreislauf zu transportieren. Die Aorta besitzt den typischen dreischichtigen Wandaufbau einer Arterie, bestehend aus Tunica intima, Tunica media und Tunica adventitia (s. Abb. 2).

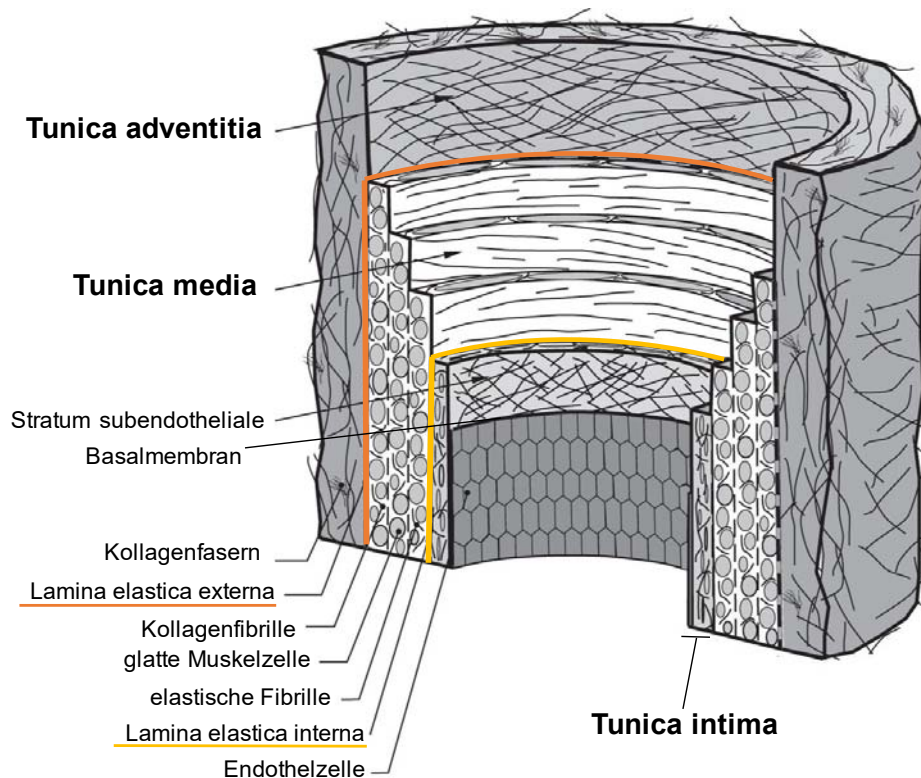
#### Tunica intima:

Die Tunica intima (Intima) besteht aus dem Endothel, welches das Gefäß zum Lumen hin begrenzt, und einer darunter liegenden subendothelialen Schicht (Stratum subendotheliale). Diese Schicht besteht aus lockerem Bindegewebe mit vereinzelt eingelagerten glatten Muskelzellen (GMZ), Fibroblasten und Immunzellen. Die Abgrenzung dieser Schicht zum Endothel bildet eine Basalmembran. Von der Tunica media grenzt sich die Intima durch eine kompakte Schicht aus elastischen Fasern ab (Lamina elastica interna).



Tunica media:

Die Tunica media (Media) besteht hauptsächlich aus GMZ sowie elastischen und kollagenen Bindegewebsfasern. Das Verhältnis der Hauptkomponenten untergliedert Arterien in einen elastischen und einen muskulären Typ. Die Aorta zählt zum elastischen Wandtyp, da sie großen pulsatorischen Volumenbeanspruchungen ausgesetzt ist. Funktional ermöglichen die elastischen Fasern der Aorta eine Dehnung, die während der Austreibungsphase, der Systole, die Blutdruckspitzen dämpft. In der Diastole sorgen Rückstellkräfte der elastischen Fasern dann für die gleichmäßige Verteilung des Blutes (konstanter Blutdruck / Blutfluss) in die Peripherie (Windkesselfunktion). Die Media grenzt sich zur Adventitia, ebenso wie die Intima zur Media, durch eine kompakte Schicht elastischer Fasern ab (Lamina elastica externa).



**Abb. 2: Typischer Wandaufbau einer Arterie.** Quelle: verändert nach Gasser TC *et al.*; 2006 [6], ©The Royal Society

Tunica adventitia:

Die Tunica adventitia (Adventitia) begrenzt das Gefäß zum Gewebe hin und verankert gleichzeitig das Gefäß im umliegenden Gewebe. Diese Schicht besteht aus lockerem Bindegewebe mit elastischen und kollagenen Fasern, in das hauptsächlich Fibroblasten, aber auch Immun- und Stammzellen eingelagert sind [7]. Ebenso verlaufen in der Adventitia vegetative Nervenfasern zur Media und vor allem in großen Gefäßen zusätzlich die Vasa vasorum, die das äußere Drittel des Gefäßes mit Blut versorgen [4, 5].

## 1.2 Arteriosklerose und Atherosklerose

Der Begriff der Arteriosklerose stellt einen Sammelbegriff für arterielle Gefäßerkrankungen dar. Diese sind durch fibröse Umbauprozesse gekennzeichnet. Hierbei stellt die Atherosklerose die klinisch bedeutendste Unterform dar. Basierend auf einer Endothelschädigung, beispielsweise durch eine Dyslipidämie, kommt es zu einer chronischen entzündlichen Reaktion der Gefäßwand mit anschließender Plaquebildung in der Intima. Deutlich seltenere Formen der Arteriosklerose sind die Mönckeberg'sche Mediasklerose (MMS) und die Arteriolosklerose [8]. Die MMS ist durch lokale Kalzifizierungen charakterisiert und tritt vorwiegend sekundär bei Diabetes mellitus und chronischer Niereninsuffizienz auf. Sie ruft allerdings keine Lumeneinengungen hervor und bleibt daher meist asymptomatisch. Die Atherosklerose und die MMS können gemeinsam in gleichen Gefäßabschnitten auftreten [9].

### 1.2.1 Definition

Der Begriff der Atherosklerose wurde erstmalig von dem deutschen Pathologen Felix Marchand im Jahr 1904 verwendet. Dafür bediente er sich der griechischen Sprache und kreierte aus den Wörtern „athära“ (=Grütze) und „skleros“ (=hart) den Begriff der Atherosklerose [10]. Die „WHO Study Group“ stellte im Jahr 1958 folgende Definition für die Atherosklerose auf: „Atherosklerose ist eine variable Kombination von Veränderungen der Intima von Arterien (ausgenommen Arteriolen), bestehend aus der fokalen Ansammlung von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutprodukten, Fasergewebe und Kalziumablagerungen und verbunden mit Veränderungen in der Media.“ [11]

Erste atherosklerotische Veränderungen zeigen sich bereits in frühen Kindesjahren bzw. in der Pubertät. Frühe klinische Manifestationen treten meist erst ab der dritten bis vierten Lebensdekade auf [12]. Als klinische Hauptmanifestationen der Atherosklerose gelten die koronare Herzkrankheit, die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) und die zerebrovaskuläre Insuffizienz. Stenosen in den Koronargefäßen können zu Angina pectoris und akuten Infarkten, in den Zerebralgefäßen zu Schlaganfällen, transitorisch ischämischen Attacken und vaskulären Demenzen führen. Des Weiteren kann es durch die Atherosklerose zu Stenosen der Viszeralgefäße (Angina abdominalis), Beckengefäße und Nierenarterien kommen [13, 14]. Die Einengung der Mesenterialgefäße führt unmittelbar nach der Nahrungsaufnahme zu rezidivierenden Bauchschmerzen und kann im Akutfall, genau wie der Herz- oder Hirninfarkt, einen lebensbedrohlichen Zustand (Mesenterialinfarkt) darstellen. Folge der Atherosklerose in den Beckengefäßen sind minderperfundierte Schwellkörper, wodurch erektile Dysfunktionen (Impotenz) auftreten

können [15]. Die Blutdruckregulation findet unter anderem auch in den Nierenarterien statt. Durch die Verkalkungen dort kann es zu einem atherosklerosebedingten Bluthochdruck kommen, welcher im chronischen Verlauf eine Niereninsuffizienz verursachen kann [16]. Darüber hinaus kann die Atherosklerose auch zu Aussackungen der Gefäßwände (Aneurysma verum) [17] oder direkten Einblutungen in die Gefäßwand (Aortendissektion) führen [18].

Die verschiedenen Krankheitsbilder lassen bereits darauf schließen, dass bestimmte Gefäßareale stärker von der Atherosklerose betroffen sind als andere. Hierzu zählen vor allem die Herzkranzgefäße, Karotiden, intrakranielle Arterien, die Aorta und die Arterien der Extremitäten [12, 19].

Die beiden häufigsten Todesursachen in Deutschland sind durch die Folgen der Atherosklerose bedingt. Hierbei sind für das Jahr 2013 die chronische ischämische Herzkrankheit und der akute Myokardinfarkt mit insgesamt 125.220 Toten (14%) aufgeführt [1].

### **1.2.2 Risikofaktoren der Atherosklerose**

Zahlreiche Risikofaktoren, die eine Atherosklerose begünstigen, wurden in experimentellen und epidemiologischen Studien beschrieben. Diese lassen sich in zwei Gruppen unterteilen [20].

Als Hauptrisikofaktoren (1.Ordnung) gelten Nikotinabusus, Diabetes mellitus (HbA1c  $\geq 6,5\%$ ), arterielle Hypertonie ( $\geq 140/90$  mmHg), hohe LDL-Cholesterin-Werte ( $\geq 160$ mg/dl), niedrige HDL-Cholesterin-Werte ( $\text{♂} \leq 40$ mg/dl;  $\text{♀} \leq 50$ mg/dl), hohes Lebensalter ( $\text{♂} \geq 45$  Jahre;  $\text{♀} \geq 55$  Jahre) sowie eine positive Familienanamnese (Auftreten von kardiovaskulären Besonderheiten bei Angehörigen 1. Grades vor dem 55.(♂) bzw. 65.(♀) Lebensjahr).

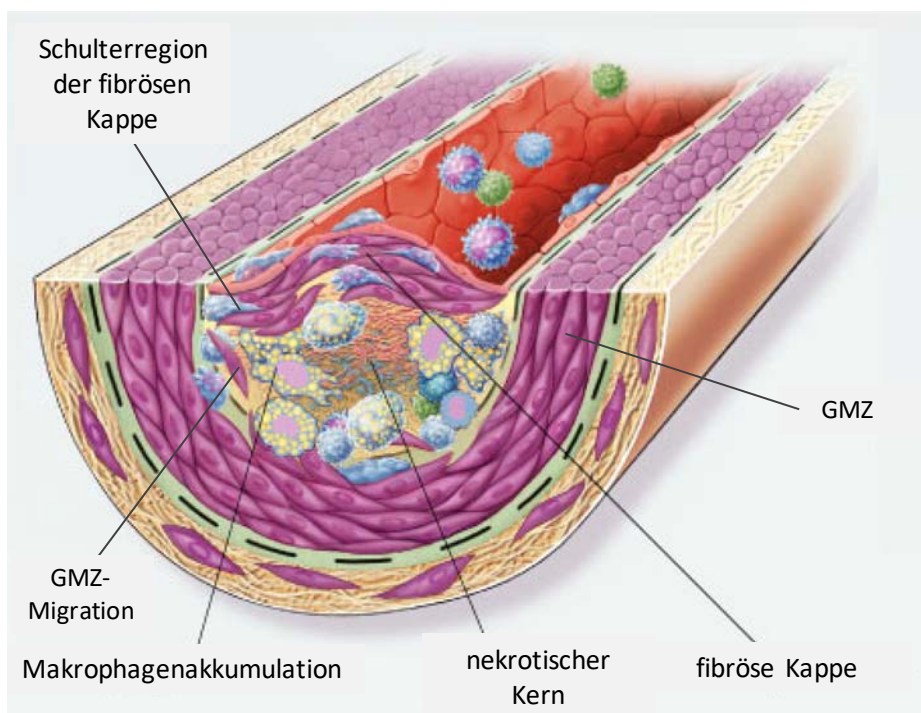
Zu den Risikofaktoren der 2. Ordnung zählen eine atherogene Diät, Adipositas, Bewegungsmangel, Fettstoffwechselstörungen (z.B. Hypertriglyceridämie ( $\geq 150$ mg/dl), Lipoprotein-a-Erhöhung ( $> 60$ mg/dl)), Glukosetoleranzstörung (Nüchternblutzucker  $\geq 100$ mg/dl), Entzündungszustände (CRP-Erhöhung), Thromboseneigung, Hyperfibrinogenämie [20], Homocystinurie [21] sowie Hyperphosphatämie [22].

Vor allem in westlichen Industrienationen leiden immer mehr Menschen am „Metabolischen Syndrom“, welches multiple Risikofaktoren wie Adipositas, Dyslipidämie, Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie vereint. Somit stellt das „Metabolische Syndrom“ ein immenses Risiko für das Auftreten einer Atherosklerose dar [23].

### 1.2.3 Pathogenese der Atherosklerose

In den 1970er-Jahren prägte Russel Ross die „Response-to-injury-Hypothese“, welche bis heute als allgemein akzeptierte zentrale Hypothese zur Entstehung der Atherosklerose gilt [24-26]. Kernpunkt ist die Aussage, dass es sich hierbei um eine chronische Entzündungsreaktion der Gefäßwand handelt, die durch eine endotheliale Dysfunktion verursacht wird. Das Endothel kann dabei durch verschiedene Faktoren geschädigt werden. Ursächlich sind neben den Risikofaktoren, wie z.B. der arteriellen Hypertonie und dem Rauchen, auch hämodynamische Kräfte wie Schubspannung, weshalb atherosklerotische Läsionen gerade vermehrt an Gefäßbiegungen und -verzweigungen auftreten [27-29].

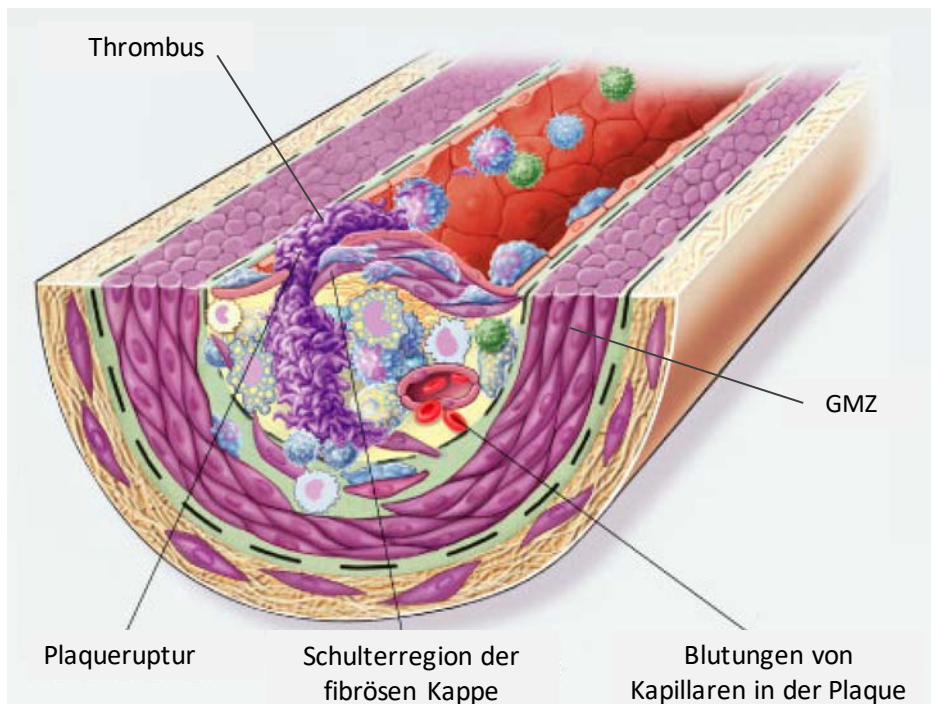
Eine typische atherosklerotische Plaque ist in Abb. 3 dargestellt.



**Abb. 3: Darstellung einer atherosklerotischen Läsion.** Quelle: verändert nach Ross R; 1999 [30], ©Massachusetts Medical Society. Details siehe Text. GMZ, glatte Muskelzelle.

Durch die Schädigung des Endothels kommt es zu einer gesteigerten Gefäßpermeabilität, was ein vermehrtes Eindringen von Plasmabestandteilen wie LDL und HDL in die Intima zur Folge hat. Dort kommt es zu einer Oxidierung des LDL bzw. HDL. Ebenso exprimiert das geschädigte Endothel verstärkt Adhäsionsmoleküle, was eine vermehrte Rekrutierung von Immunzellen, vor allem Monozyten aus dem Blut, in die Intima zur Folge hat. Vor allem die aus den Monozyten entstandenen Makrophagen und die GMZ nehmen über „Scavenger“-Rezeptoren oxLDL und oxHDL auf und werden so zu Schaumzellen, die zu sogenannten Fettstreifen in der Gefäßwand führen [29, 31-33]. Die aktivierten

Endothelzellen und eingedrungenen Makrophagen sezernieren ihrerseits Zytokine, die den Prozess der Lipidoxidation und das Eindringen von Immunzellen beschleunigen. Die Toxizität der oxidierten Lipoprotein-Bestandteile führt schließlich zum Absterben der Schaumzellen, wobei ein nekrotischer Kern entsteht. Dieser besteht aus Zelldebris, Lipiden und auch öfter aus Cholesterinkristallen [29, 34]. Der nekrotische Kern wird durch einwandernde GMZ zum Lumen hin begrenzt. Die GMZ produzieren eine Matrix und bilden so eine fibröse Kappe, die die Plaque stabilisiert. Dabei sind die Schulterregionen der fibrösen Kappe (Übergänge von Plaque zu Intima) besonders kritisch, da sich hier oft Makrophagen ansammeln, die Proteasen wie insbesondere Matrixmetalloproteasen (MMP) sezernieren, was durch Verdau der extrazellulären Matrix das Risiko einer Ruptur der fibrösen Kappe steigert [29, 35]. Durch einen Riss der fibrösen Kappe entstehen komplexe Läsionen (s. Abb. 4).



**Abb. 4: Darstellung einer komplexen atherosklerotischen Läsion.** Quelle: verändert nach Ross R; 1999 [30], ©Massachusetts Medical Society. Details siehe Text. GMZ, glatte Muskelzelle.

Diese Läsionen zeichnen sich durch Hämatome und Thromben aus. Hämatome können auf zwei unterschiedliche Wege entstehen. Zum einen kann es durch die Fissur zum Bluteinstrom vom Lumen in die Gefäßwand kommen, zum anderen können neu gebildete Kapillare in der Läsion reißen und so Sickerblutungen nach sich ziehen. Eine resultierende Thrombenbildung kann einen akuten Arterienverschluss zur Folge haben. Durch die fibrotische Stabilisierung komplexer Läsionen („Remodeling“) kann es zu einer progredienten Stenosierung der betroffenen Arterie kommen [8, 36].

### **1.2.4 Klassifikation der Atherosklerose nach Stary *et al.***

Stary *et al.* [36, 37] haben basierend auf histologischen und histochemischen Befunden atherosklerotische Läsionen in sechs Entwicklungsstufen (I-VI) eingeteilt, wobei die Typen I-III klinisch keine Symptome hervorrufen.

Eine Typ I-Läsion (Initialläsion), die schon im Kindesalter auftreten kann, ist nur mikroskopisch oder histologisch zu detektieren. Hier finden sich erste, isolierte Ansammlungen von Schaumzellen. Die Typ II-Läsion (Fettstreifen) ist durch makroskopisch sichtbare, gelbe Fettstreifen mit einer erhöhten Anzahl lipidbeladener Makrophagen bzw. GMZ charakterisiert. Diese Veränderungen sind durch eine Verringerung von Risikofaktoren, z.B. durch eine entsprechende Diät, beeinflussbar. Die Typ III-Läsion stellt eine Intermediärläsion zwischen einem teilweise reversiblen Fettstreifen (Typ II-Läsion) und einem Atherom (Typ IV-Läsion) dar und wird daher auch als Proatherom oder Übergangsstadium bezeichnet. Hier finden sich gehäuft extrazelluläre Lipideinlagerungen in der Intima. Das Kennzeichen der Typ IV-Läsion, auch Atherom genannt, ist der nekrotische Kern, der aus Zelldebris und Lipiden besteht. Typ V-Läsionen sind definiert durch ein vermehrtes Vorkommen von fibrösem Bindegewebe, welches sich aufgrund der zerstörten Intimastruktur bildet und werden in drei Unterkategorien eingeteilt. Bei der Typ Va-Läsion, dem Fibroatherom, bildet sich eine fibröse Kappe, hauptsächlich bestehend aus Kollagen und GMZ über dem Lipidkern. Eine Läsion, bei der der Lipidkern und andere Strukturen der Läsion kalzifiziert sind, wird als Typ Vb bezeichnet. Typ Vc-Läsionen sind gekennzeichnet durch einen minimalen Lipidkern. Die komplexen Typ VI-Läsionen entstehen nach Ruptur der fibrösen Kappe einer Typ V-Läsion, wobei es zu Einblutungen wie auch zu einem akuten Verschluss kommen kann.

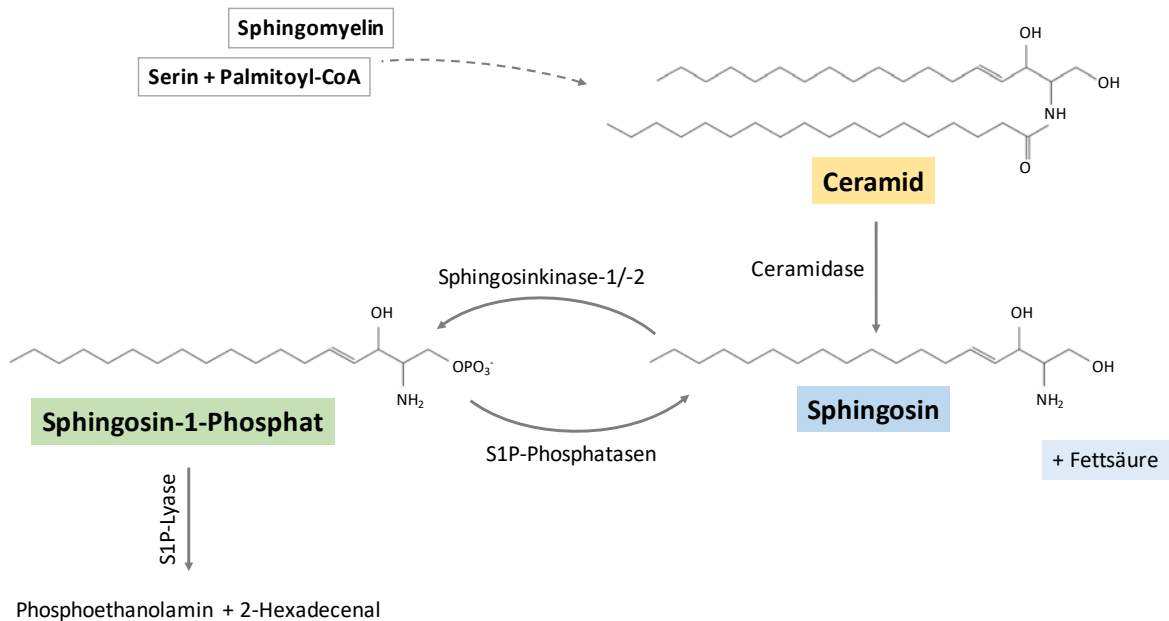
## **1.3 Sphingosin-1-Phosphat und seine Rezeptoren**

### **1.3.1 Sphingosin-1-Phosphat**

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) gehört zur Substanzklasse der Sphingolipide [38]. Diese findet man ubiquitär in eukaryotischen Zellen [39, 40]. S1P gilt heute als Regulator von vielen physiologischen und pathophysiologischen Reaktionen im menschlichen Organismus [41].

Die Biosynthese des S1P erfolgt über mehrere Schritte. Zunächst wird Ceramid entweder durch Sphingomyelinasen aus Sphingomyelin oder direkt über einen *de-novo*-Syntheseweg aus Serin und Palmitoyl-CoA generiert [40]. Ceramid wird dann mittels Ceramidase zu Sphingosin und einer freien Fettsäure hydrolysiert, bevor es im letzten Schritt von der Sphingosinkinase-1 oder -2 (Sphk1/2) zu Sphingosin-1-Phosphat phosphoryliert wird.

Der Abbau von S1P geschieht auf unterschiedlichen Wegen. Entweder wird mittels S1P-Phosphatasen S1P zu Sphingosin dephosphoryliert oder S1P wird durch die S1P-Lyase irreversibel in 2-Hexadecenal und Phosphoethanolamin gespalten (s. Abb. 5) [40, 42].



**Abb. 5: Synthese und Abbau von S1P.** Quelle: erstellt nach Spiegel und Milstien; 2003 [40]. CoA, Coenzym A.

Im menschlichen Serum werden S1P-Spiegel von 0,5-1,2 nmol/ml gemessen, wobei der S1P-Spiegel weder vom Geschlecht noch vom Alter beeinflusst zu sein scheint [43]. Widersprüchliche Daten liegen vor bezüglich der Frage, ob bzw. inwiefern S1P-Spiegel im Blut mit Atherosklerose assoziiert sind. Während eine Studie fand, dass Serum-S1P positiv mit der Schwere der KHK einhergeht [44], berichtete eine andere Studie für Plasma-S1P das Gegenteil [45]. Eine aktuelle Studie aus unserer Arbeitsgruppe stellte fest, dass Gefäßpatienten, die wegen Behandlung einer Karotisstenose oder einer pAVK aufgenommen wurden, niedrigere Serum-S1P Spiegel aufwiesen als gesunde Kontrollen (Blutspender) [46]. In der Homöostase regulieren vor allem Erythrozyten den S1P-Spiegel im Blut [47-49], aber andere Zellen, vor allem Endothelzellen, sind auch in der Lage S1P zu sezernieren [50]. Kommt es zu einer Gefäßverletzung wird S1P lokal von aktivierten Thrombozyten freigesetzt [49].

Im Blut findet man S1P hauptsächlich an Albumin und HDL gebunden, gefolgt von VLDL und LDL [49]. In den HDL-Partikeln ist S1P an ApoM gebunden [49, 51] und es wird gegenwärtig diskutiert, inwieweit atheroprotektive Eigenschaften des HDL auf S1P beruhen [52-54]. So wirkt HDL-S1P vasodilatatorisch über die Aktivierung der endothelialen



NO-Synthase (eNOS) [55], antiinflammatorisch über eine Inhibierung der Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle [56] und es kann die Gefäßpermeabilität senken, indem die endotheliale Barriere verstärkt wird [57].

Im Gewebe kommt S1P nur in sehr geringer Konzentration vor, so dass zwischen Blut und Gewebe ein S1P-Gradient besteht. Dieser Gradient ist essentiell für den Austritt von Lymphozyten aus lymphatischen Organen ins Blut [49, 58].

### 1.3.2 Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren

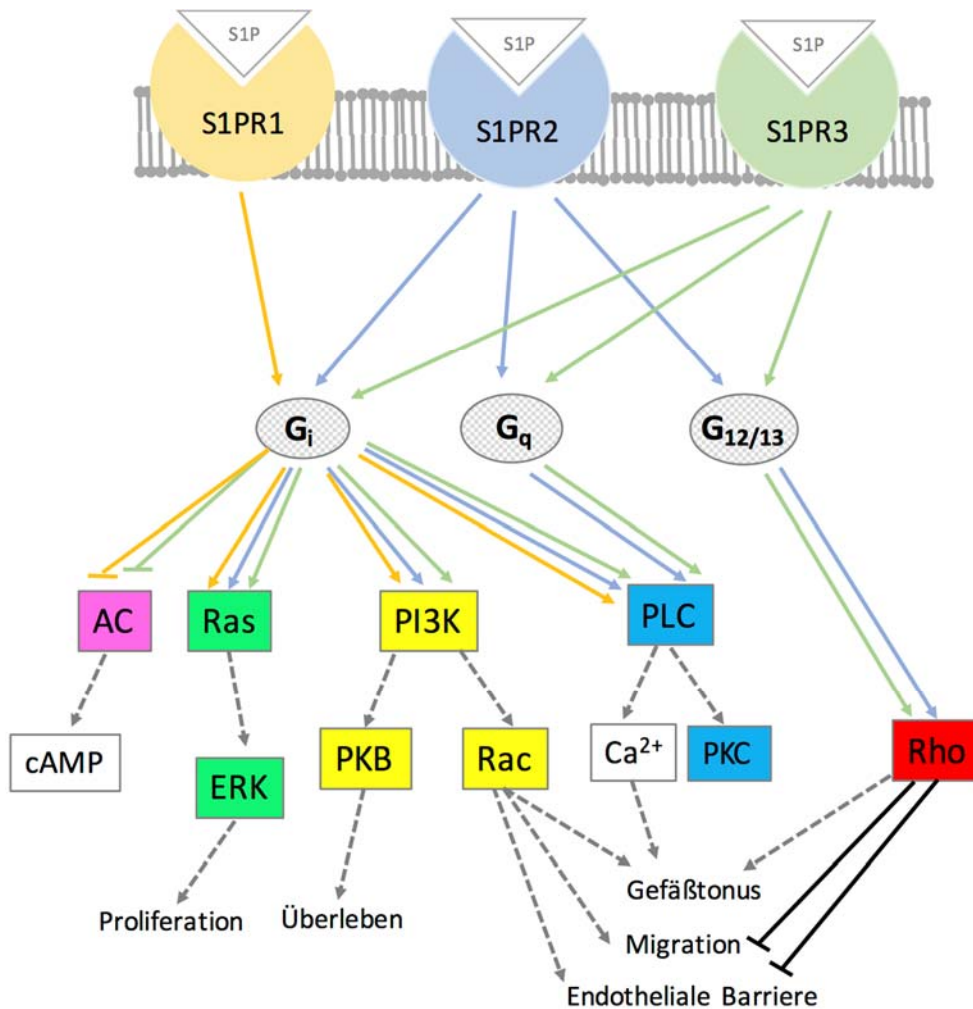
Obschon rezeptorunabhängige Funktionen für S1P beschrieben wurden, lassen sich die meisten Effekte von S1P auf eine Aktivierung von S1P-Rezeptoren zurückführen [59].

Es gibt fünf verschiedene S1P-Rezeptoren (S1PR1, S1PR2, S1PR3, S1PR4, S1PR5), die allesamt zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören.

Während die S1PR1, S1PR2 und S1PR3 ubiquitär exprimiert werden, existiert der S1PR4 vorrangig in lymphatischen und blutbildenden Geweben und der S1PR5 hauptsächlich im Gehirn und in der Haut [60]. Die Expression der S1P-Rezeptoren hängt von der Art des Gewebes und seinem Entwicklungsstand bzw. Alter ab [61].

Einzelne S1P-Rezeptoren koppeln an verschiedene heterotrimere G-Proteine ( $G_i$ -,  $G_q$ - oder  $G_{12/13}$ ) [62] und je nach Kopplung werden verschiedene Signalwege aktiviert. Der S1PR1 ist ausschließlich mit  $G_i$  assoziiert, während S1PR2 und S1PR3 je nach Zelltyp sowohl an  $G_i$ ,  $G_q$  oder  $G_{12/13}$  koppeln können. Die wichtigsten Signalwege der S1PR1, S1PR2 und S1PR3 sind in Übersichtsartikeln beschrieben [62-64] und in Abb. 6 zusammengefasst. Eine  $G_i$  induzierte Inhibierung der Adenylatcyclase (AC) führt zu einer indirekten Aktivierung von ERK und fördert dadurch die Zellproliferation, während die  $G_i$ -vermittelte Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) die Zellmigration und das Zellüberleben fördert. In Endothelzellen wird über Rac die Barrierfunktion gestärkt. Über  $G_q$  wird die Phospholipase C (PLC) aktiviert, was eine Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration zur Folge hat und in GMZ zur Kontraktion führt.  $G_{12/13}$  aktiviert das kleine G-Protein Rho, welches ebenfalls die Kontraktilität von glatten Muskelzellen erhöht und deren Migration inhibiert. Im Endothel führt dieser Signalweg zu einer Erhöhung der vaskulären Permeabilität.





**Abb. 6: Signalwege des S1PR1, S1PR2 und S1PR3.** S1PR1, S1PR2 und S1PR3 werden ubiquitär exprimiert und induzieren unterschiedliche Signalwege. Quelle: erstellt nach Nagahashi M *et al.*; 2014 [62] und Brinkmann V; 2007 [64]. AC, Adenylatcyclase; cAMP, cyclisches Adenosinmonophosphat; ERK, Extracellular-signal Regulated Kinase; PI3K, Phosphoinositid-3-Kinase; PKB, Proteinkinase B; PLC, Phospholipase C; PKC, Proteinkinase C; S1P, Sphingosin-1-Phosphat; S1PR, S1P-Rezeptor.

### 1.3.2.1 Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 1

Im Gefäßsystem wird der S1PR1 insbesondere auf Endothelzellen exprimiert [49, 65], in denen er vor allem die Zell-Zell-Kontakte verstärkt und so die vaskuläre Permeabilität verringert [66-68]. *In vitro* stimuliert S1PR1 die Proliferation und Migration von Endothelzellen und fördert ihr Überleben durch Inhibierung der Apoptose [65, 69]. Einhergehend mit diesen Effekten spielt der S1PR1 eine entscheidende Rolle in der Vaskulogenese und Angiogenese. Mäuse mit einer systemischen Deletion des S1PR1 sind auf Grund erhöhter vaskulärer Permeabilität und einer mangelnden Gefäßreifung während der Embryonalentwicklung nicht lebensfähig. Der gleiche letale Phänotyp wurde ebenso bei Mäusen mit einem endothelzell-spezifischen Knockout (KO) des S1PR1 beobachtet [70]. Die fehlende Gefäßreifung basiert auf einer ungenügenden Rekrutierung von Perizyten und

GMZ der größeren Gefäße, wodurch die Gefäße instabil bleiben und es intrauterin zu Blutungen kommt [71, 72]. Kürzlich wurde gezeigt, dass in der Angiogenese S1PR1 das *sprouting* inhibiert und gleichzeitig für die Stabilisierung des sich entwickelnden Blutgefäßes verantwortlich ist [61, 70, 73].

Des Weiteren kann der endotheliale S1PR1, wie auch der S1PR3 (s.u.) den Gefäßtonus regulieren. Dabei führt die Aktivierung des Rezeptors zu einer PKB-vermittelten Phosphorylierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS), welches die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) steigert und letztendlich zu einer Vasodilatation führt [55, 74, 75]. Wie oben erwähnt, ist ein S1P-Gradient zwischen Gewebe und Blut für den Lymphozytenaustritt aus den lymphatischen Geweben verantwortlich; dieser Effekt ist von S1PR1 abhängig [76-79]. Fingolimod (FTY720) ist ein immunsuppressives S1P-Analogon, da es nach endogener Phosphorylierung an S1PR1 bindet und nach transienter Aktivierung des Rezeptors seine Internalisierung und Degradation bewirkt [49, 77, 80]. Auf Grund dieses Mechanismus findet FTY720 bereits klinische Anwendung in der Behandlung der Multiplen Sklerose [81]. FTY720 sowie der S1PR1-Agonist KRP-203 führten in einem Mausmodell für Atherosklerose zu einer Verringerung der Plaquelastung. Gleichzeitig kam es aber auch zu einer Lymphozytopenie, so dass unklar bleibt, ob der antiatherogene Effekt auf einer Aktivierung des S1PR1 oder auf der Degradation des S1PR1 beruhte [82, 83].

### 1.3.2.2 Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 2

S1PR2 koppelt im Wesentlichen an  $G_{12/13}$ , was zu einer Aktivierung von Rho führt [84, 85]. Im Gefäß wird der S1PR2 unter anderem von Endothelzellen, GMZ und Makrophagen exprimiert. Im Endothel scheint S1PR2 im Vergleich zum S1PR1 antagonistische Effekte zu haben [61]. In *in vitro* Versuchen mit humanen Umbilikalvenen wurde gezeigt, dass die endotheliale Barrierefunktion nach Aktivierung des endothelialen S1PR2 zu aufgelockerten Zell-Zell-Verbindungen und damit zu einer gesteigerten Permeabilität führte [86]. Wurde S1PR2 durch den Einsatz des S1PR2-Antagonisten JTE013 gehemmt, hatte dieses gestärkte Zell-Zell-Verbindungen und eine verminderte Gefäßpermeabilität zur Folge [86]. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam es in *in vivo* Versuchen in Lungen von Ratten, in denen JTE013 eine  $H_2O_2$ -induzierte Permeabilität reduzierte [86]. Auch in einem Nieren-Ischämie-Reperusionsmodell an der Maus zeigten S1PR2 und S1PR1 gegensätzliche Effekte. Während die Aktivierung des S1PR1 protektiv wirkte, führte eine Aktivierung des S1PR2 zu vermehrter Organschädigung [87]. In der Retina von Mäusen führt Hypoxie zum Krankheitsbild der ischämischen Retinopathie. Hierfür scheint der S1PR2 eine Rolle zu spielen, da die pathologische Neovaskularisierung in S1PR2-KO-Mäusen stark reduziert

war. Der zugrunde liegende Mechanismus könnte eine S1PR2-abhängige Inhibierung der eNOS-Expression, beziehungsweise eine Aktivierung der COX-2 Expression sein [88]. S1PR2-KO-Mäuse zeigen keine offensichtlichen kardiovaskulären Defekte. Allerdings wurde in diesen Tieren ein verminderter Gefäßwiderstand nach Gabe eines Vasokonstriktors (Phenylephrin) festgestellt [89]. Eine S1PR2-gesteuerte Vasokonstriktion konnte zusätzlich in murinen Lymphgefäßen gezeigt werden [90] und scheint auch für die adäquate Entwicklung des Gehörs verantwortlich zu sein. Innerhalb weniger Wochen nach der Geburt verlieren S1PR2-KO-Mäuse das Gehör und weisen pathologische Defekte in der Stria vascularis und im Innenohr auf. Dies liegt in der verminderten S1PR2-vermittelten Vasokonstriktion der A. spiralis modioli begründet, welche das Blut direkt in die Stria vascularis (Gefäßstreifen) transportiert und normalerweise vor zu hohen Blutdrücken schützt [91]. Diese S1PR2-Effekte beruhen wahrscheinlich auf einer Aktivierung des Rho-Signalwegs, der in GMZ die Expression von Differenzierungsgenen aktiviert sowie das Wachstum und die Migration der GMZ hemmt [92-94]. Im Einklang hiermit ist der Befund, dass es, im Gegensatz zu Wildtyp-Tieren, in S1PR2-KO-Mäusen nach Ligatur der A. carotis zu einer massiven Intimahyperplasie kommt [95]. Ein inhibitorischer Effekt von S1PR2 wurde auch in der Plaquebelastung in einem murinen Atherosklerosemodell beobachtet. So bildeten nach Western-Diät ApoE/S1PR2-Doppelknockout-Mäuse deutlich kleinere Plaques im Vergleich zu ApoE-KO-Mäusen und die Plaques enthielten weniger Makrophagen und zeigten eine verringerte Expression von inflammatorischen Zytokinen [96].

### **1.3.2.3 Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 3**

S1PR3 koppelt an die G-Proteine  $G_i$ ,  $G_q$  und  $G_{12/13}$  [97] und wird vor allem auf Endothelzellen und GMZ exprimiert [65]. Wie für S1PR1 wurde beschrieben, dass auch S1PR3 die Proliferation, das Überleben und die Migration von Endothelzellen fördert [65, 69]. Wie S1PR1 (s.o.), stimuliert auch S1PR3 die endotheliale NO-Produktion durch eine PKB-vermittelte Phosphorylierung und Aktivierung von eNOS [55, 98]. Im Gegensatz zu diesen agonistischen Effekten zu S1PR1, inhibiert S1PR3 aber die Barrierefunktion, hat hier also den gleichen Effekt wie S1PR2 (s.o.) [99-101]. Während der endotheliale S1PR3 Gefäße dilatiert, hat S1PR3 auf GMZ den gegensätzlichen Effekt. Hier führt die  $G_q$ -abhängige Freisetzung von intrazellulärem Kalzium zur Kontraktion der Zellen [102]. S1PR3 hat proinflammatorische Eigenschaften, so steigert S1PR3 die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen wie P-Selektin und fördert damit das „Rolling“ von Leukozyten während der Leukodiapedese [103]. Ebenfalls scheint der S1PR3 an der Rekrutierung von Makrophagen während entzündlichen Prozessen und der Atherosklerose beteiligt zu sein. Eine durch Thioglykolat hervorgerufene Peritonitis in ApoE/S1PR3-

Doppelknockout-Mäusen ging, verglichen mit ApoE-KO-Mäusen, mit einer verminderten Anzahl von Makrophagen und einer geringeren Expression der inflammatorischen Zytokine (TNF- $\alpha$ , Tumornekrosefaktor  $\alpha$  und MCP-1, Monozyten-Chemoattraktives Protein-1) in den Makrophagen einher [104]. Des Weiteren wiesen die atherosklerotischen Plaques von ApoE/S1PR3-Doppelknockout-Mäusen nach Western-Diät deutlich weniger Makrophagen auf, als die ApoE-KO-Kontrollen aufwiesen, wobei interessanterweise die Tiere hinsichtlich der Plaquebelastung keine Unterschiede zeigten [104]. Ein komplexes Bild für S1PR3 ergibt sich auch in Mausmodellen für Intimahyperplasie. Während S1PR3 die Intimahyperplasie nach Denudierung der Iliofemoralarterie stimuliert, inhibiert S1PR3 die Intimahyperplasie nach Ligatur der A. carotis [104, 105]. Die Gründe hierfür sind unklar, aber es ist wahrscheinlich, dass verschiedene Zelltypen betroffen sind.

## 2 Fragestellung und Zielsetzung

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die verschiedenen S1P-Rezeptoren sowohl potentiell antiatherogene als auch proatherogene Wirkungen haben (s. Tab. 1). Bisher gibt es keine Daten, ob sich die Expression der einzelnen S1P-Rezeptoren in den verschiedenen Abschnitten der humanen Aorta unterscheidet oder ob Veränderungen der S1P-Rezeptorexpression mit Atherosklerose einhergehen. Diese Fragen werden im Rahmen dieser Arbeit bearbeitet.

S1PR1	S1PR2	S1PR3
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Zellüberleben</b> ↑: EZ [61, 65]</li> <li>• <b>Migration</b> ↑: EZ, GMZ [102, 106], Makrophagen [61]</li> <li>• <b>Proliferation</b> ↑: EZ, GMZ [102, 106]</li> <li>• <b>Antiinflammatorisch</b> [107, 108]</li> <li>• <b>Lymphozytenaustritt</b> ↑ [76-79]</li> <li>• <b>Endotheliale Barriere</b> ↑ [99-101]</li> <li>• <b>Vasodilatation</b> über EZ (eNOS ↑) [55, 74, 75]</li> <li>• <b>Gefäßreifung</b> [49, 71, 72]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Zellüberleben</b> ↓: EZ [61]; ↑: Makrophagen [61]</li> <li>• <b>Migration</b> ↓: EZ, GMZ [106], Makrophagen [109]</li> <li>• <b>Proliferation</b> ↓: EZ [61, 93], GMZ [93]</li> <li>• <b>Zelldifferenzierung</b> ↑: GMZ [92, 93]</li> <li>• <b>Proinflammatorisch</b> [88, 96]</li> <li>• <b>Makrophagenretention</b> in der Plaque [96]</li> <li>• <b>Endotheliale Barriere</b> ↓ [99, 100]</li> <li>• <b>Vasokonstriktion</b> über GMZ [102]; eNOS ↓ [88]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Zellüberleben</b> ↑: EZ [65]</li> <li>• <b>Migration</b> ↑: EZ, GMZ [102, 106], Makrophagen [104]</li> <li>• <b>Proliferation</b> ↑: EZ [102, 106], GMZ [106]</li> <li>• <b>Proinflammatorisch</b> [104]</li> <li>• <b>„Rolling“ von Leukozyten</b> [103]</li> <li>• <b>Endotheliale Barriere</b> ↓ [99-101]</li> <li>• <b>Vasodilatation</b> über EZ (eNOS ↑) [55, 74, 75], <b>Vasokonstriktion</b> über GMZ [102]</li> </ul>

**Tab. 1: Effekte der S1P-Rezeptoren im Gefäßsystem.** EZ, Endothelzelle; GMZ, glatte Muskelzelle; NO, Nitric Oxide, Stickstoffmonoxid; eNOS, endotheliale NO-Synthase.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Studie**

In Kooperation mit Prof. Wolfgang Keil (Institut für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität in München) wurden, im Rahmen von 116 Obduktionen, Gefäßproben (Vollwand) der humanen Aorta in der Zeit von Februar bis Mai 2014 asserviert. Dabei wurde jeweils eine Probe der Aorta ascendens, der Aorta descendens und der Aorta abdominalis gewonnen. Das entnommene Gewebe wurde in RNAlater (Ambion®; s. 3.1.3, S. 19) überführt. Bis zum Transport nach Hamburg wurden die Proben bei 4°C gelagert, danach wurden sie bis zur Aufarbeitung bei -80°C aufbewahrt (SANYO; s. 3.1.3, S. 20).

Gleichzeitig wurden uns folgende Daten aus den Sektionsprotokollen zur Verfügung gestellt: Todesursache, Geschlecht, Alter, Gewicht, Größe, arterieller Hypertonus (ja/nein), Diabetes mellitus (ja/nein), Nierenstatus sowie die Plaqueausprägung in den einzelnen Aortenabschnitten (s. 3.1.2). Dabei basieren die Angaben über den arteriellen Hypertonus und Diabetes mellitus ausschließlich auf anamnestischen Informationen. Die Angaben zum Nierenstatus hingegen, basieren neben den anamnestischen auch auf direkt gewonnenen Informationen aus der Obduktion. Jegliche Normabweichung (z.B. Niereninsuffizienz, Schrumpfniere, Nierenzysten, Arteriosklerose) wurde als ein pathologischer Nierenstatus betrachtet.

Diese Studie wurde von der zugehörigen Ethikkommission genehmigt (s. Anhang, S. 75). Folgende Ausschlusskriterien bestanden: Minderjährigkeit, ein länger als vier Tage zurückliegender Todeszeitpunkt bei Obduktion sowie Brandleichen.

##### **3.1.2 Definition der Plaqueausprägung**

Im Rahmen der Sektion war, wie bereits erwähnt, auch das Ausmaß der Plaqueausprägung festgehalten und semiquantitativ eingeschätzt worden. Eingeteilt wurde in 0 (makroskopisch keine Veränderungen in der Gefäßwand), 1 (weiche Gefäßwand mit gelben Fetteinlagerungen) und 2 (harte Gefäßwand). Diese Einteilung wurde vom Obduzenten getrennt für die jeweils drei untersuchten Abschnitte der Aorta vorgenommen (s. Tab. 2).

	AS		DE		AB	
	n	Fraktion (%)	n	Fraktion (%)	n	Fraktion (%)
<b>Plaque 0</b>	93	80,2	73	62,9	21	18,1
<b>Plaque 1</b>	12	10,3	28	24,1	30	25,9
<b>Plaque 2</b>	11	9,5	15	12,9	65	56,0
<b>Gesamt</b>	116	100	116	100	116	100

**Tab. 2: Plaqueausprägung in den drei Aortenabschnitten.** 0=keine Plaque; 1=weiche Plaque; 2=harte Plaque; AS, Aorta ascendens; DE, Aorta descendens; AB, Aorta abdominalis.

Für die Analyse wurden jeweils zwei Plaquegruppen zusammengefasst: Für die AS und DE wurden die Gruppen Plaque 1 und Plaque 2 kombiniert (PLQ(+)), die Plaquegruppe 0 wird im Weiteren als PLQ(-) bezeichnet. Für die AB wurden die Gruppen Plaque 0 und Plaque 1 kombiniert (PLQ(-)), die Plaquegruppe 2 wird im Weiteren als PLQ(+) bezeichnet (s. Tab. 3).

	AS		DE		AB	
	n	Fraktion (%)	n	Fraktion (%)	N	Fraktion (%)
<b>PLQ(-)</b>	93	80,2	73	62,9	51	44,0
<b>PLQ(+)</b>	23	19,8	43	37,1	65	56,0
<b>Gesamt</b>	116	100	116	100	116	100

**Tab. 3: Vorkommen von Plaque in den drei Aortenabschnitten.** PLQ(-), keine Plaque lokal vorhanden; PLQ(+), Plaque lokal vorhanden; AS, Aorta ascendens; DE, Aorta descendens; AB, Aorta abdominalis.

Basierend auf der ursprünglichen Plaqueausprägung (s. Tab. 2) wurde zusätzlich ein quantitativer Plaquescore (0-6) für die gesamte Aorta erstellt (s. Tab. 4).

Plaquescore	n	Fraktion (%)
<b>0</b>	21	18,1
<b>1</b>	17	14,7
<b>2</b>	40	34,5
<b>3</b>	16	13,8
<b>4</b>	12	10,3
<b>5</b>	1	0,9
<b>6</b>	9	7,8
<b>Gesamt</b>	116	100

**Tab. 4: Plaquescore der Aorta.** Für jeden Probanden wurde der Score der Plaqueausprägung für die jeweils drei Aortenabschnitte addiert.

### 3.1.3 Chemikalien, Kits und Geräte

In den folgenden Tabellen werden die zur Lagerung bzw. Aufarbeitung der Gewebeproben verwendeten Chemikalien (s. Tab. 5), Kits (s. Tab. 6) und Geräte (s. Tab. 7) aufgelistet.

Name	Hersteller
RNAlater® Solution	Ambion®
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
Ethanol 99 %	Walter CMP

**Tab. 5: Chemikalien**

Name	Inhalt	Hersteller
RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit (50)	RNeasy Mini Spin Columns; Collection tubes (1,5 ml); Collection tubes (2 ml); RLT Puffer; RW1 Puffer; RPE Puffer; Proteinase K; 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	<u>5X Reaction Mix:</u> Reaktionspuffer; dNTPs; oligo (dT) <sub>18</sub> ; randomisierte Hexamer-Primer;  Maxima Enzyme Mix: Maxima Reverse Transkriptase; RiboLock RNase Inhibitor;  RNase-freies Wasser	Thermo Scientific
Rotor-Gene® SYBR® Green PCR Kit (400)	<u>2x Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix:</u> HotStarTaq®Plus DNA Polymerase; Rotor-Gene SYBR Green PCR Buffer; dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Qiagen

**Tab. 6: Kits**



Name	Hersteller
TissueLyser® LT	Qiagen
Stainless Steel Beads, 7mm	Qiagen
Thermomixer comfort	Eppendorf
Zentrifuge 5810	Eppendorf
V.I.P.™ (Gefrierschrank -80°C)	SANYO
Epoch™ Spektralphotometer	BioTek®
Take3™ Mikro-Volumen Platte	BioTek®
Thermal Cycler T100™ (PCR-Maschine)	BioRad
Comfort (Gefrierschrank -20°C)	LIEBHERR
Rotor-Gene Q-System (qPCR-Maschine)	Qiagen

**Tab. 7: Geräte**

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 RNA-Isolation

Die bei -80°C gelagerten Proben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Aufarbeitung erfolgte mit dem RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen; s. Tab. 6), das alle notwendigen Lösungen enthält. Zunächst wurden 300µl RLT Puffer mit 3µl β-Mercaptoethanol (Sigma Aldrich; s. Tab. 5) versetzt und zusammen mit zwei Metallkugeln (Stainless Steel Beads, Qiagen; s. Tab. 7) in ein 2ml Reaktionsgefäß gefüllt und auf Eis gekühlt. Per Skalpell wurde von der Probe ein etwa 30mg schweres Teilstück abgeschnitten, weiter zerkleinert, überschüssiges RNAlater entfernt und das Gewebe in das vorbereitete Reaktionsgefäß überführt. Der auf Trockeneis gekühlte Rotor des TissueLyser (Qiagen; s. Tab. 7) wurde mit der Probe bestückt und diese dann für 5 Minuten bei 50 Hertz homogenisiert. Daraufhin wurden für weitere fünf Minuten der Rotor auf Trockeneis und die Probe auf Eis gekühlt. Diese Prozedur wurde insgesamt dreimal wiederholt. Eine Proteinase-K-Verdünnung (590µl RNase-freies Wasser, 10µl Proteinase K (Qiagen; s. Tab. 6)) wurde angesetzt und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß pipettiert. Nach Zugabe des hergestellten Homogenats wurde der Ansatz bei 56°C und 1200rpm für 30 Minuten im Thermomixer (Eppendorf; s. Tab. 7) inkubiert. Nach einer dreiminütigen Zentrifugation (Eppendorf; s. Tab. 7) bei 10.000g wurde der Überstand mit 450µl Ethanol 99% (Walter CMP; s. Tab. 5) versetzt und für wenige Sekunden gemixt. Hiervon wurden 700µl auf die Membran der Eluationssäule (RNeasy Mini Spin Column, Qiagen; s. Tab. 6) gegeben und zentrifugiert (1min, 10.000g). Dieser Vorgang wurde mit den verbliebenen 650µl wiederholt. Anschließend wurde auf die Eluationssäule 350µl RW1 Puffer pipettiert und zentrifugiert (1min, 10.000g). Nun folgte ein 30-minütiger DNase-I-Verdau unter Verwendung des RNase-Free DNase Sets (Qiagen; s. Tab. 6). Dazu

wurde zunächst die Trockensubstanz in 550µl RNase-freiem Wasser gelöst. 10µl dieser DNase-Lösung wurden mit 70µl RDD Puffer vermengt und zum Verdau der genomischen DNA auf die Eluationssäule pipettiert. Der Verschlussdeckel der Eluationssäule blieb dabei geöffnet. Es folgten Waschvorgänge mit 350µl RW1 Puffer, gefolgt von zwei weiteren Waschungen mit 500µl RPE Puffer. Die Zentrifugationen wurden jeweils bei 10.000g für 2 Minuten durchgeführt, gefolgt von einer abschließenden Zentrifugation (1min, 10.000g), um Waschpufferreste vollständig von der Säulenmatrix zu entfernen. Für die Eluation wurden 50µl RNase-freies Wasser direkt auf die Matrix der Eluationssäule pipettiert. Das Eluat wurde dann mittels Zentrifugation (1min, 10.000g) gewonnen. Die isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C im Gefrierschrank (SANYO; s. Tab. 7) aufbewahrt.

### 3.2.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten RNA-Lösung und Qualitätskriterien

Die Konzentration der RNA wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers (BioTek®; s. Tab. 7) gemessen. Dazu wurden zunächst 2µl der aufgereinigten RNA-Lösung auf eine Mikro-Volumen-Platte (BioTek®; s. Tab. 7) pipettiert. Die Mikro-Volumen-Platte umfasste 16 Mikrosports, wobei die ersten beiden Mikrosports der Blindwertbestimmung dienen. Hierfür wurde RNase-freies Wasser verwendet. Die mit der RNA-Lösung bestückte Mikro-Volumen-Platte wurde in das Spektralphotometer gegeben. Die Auswertung erfolgte mit der vom Hersteller für das Spektralphotometer mitgelieferten Datenanalyse-Software (Gen5™ 2.0, BioTek®). Die RNA-Konzentration wurde dabei mittels der Extinktion bei 260nm Wellenlänge unter der Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes in ng/µl errechnet [110]. Hierbei entspricht 1 OD (optische Dichte) einer RNA Konzentration von 40µg/ml.

$$E_{260} = \epsilon_{260} * c * d \quad \rightarrow \quad c = \frac{E_{260}}{\epsilon_{260} * d}$$

$E_{\lambda}$  = Extinktion bei 260nm

$\epsilon_{\lambda}$  = RNA-spezifischer Extinktionskoeffizient bei 260nm

$c$  = RNA-Konzentration in der Lösung

$d$  = Schichtdicke der Küvette (1cm)

Da Nukleinsäuren und Proteine UV-Licht unterschiedlicher Wellenlängen absorbieren, (260nm, bzw. 280nm) konnte die Reinheit der RNA mittels eines Extinktionsquotienten (260nm/280nm) bestimmt werden, wobei der Quotient für reine RNA zwischen 1,9 und 2,0 liegt [111]. RNA-Lösungen mit einem Quotienten  $\leq 1,8$  bzw.  $\geq 2,5$  wurden verworfen und die Isolation der RNA mit einem neuen Stück der jeweiligen Gewebeprobe wiederholt. Die RNA-Isolation wurde ebenfalls wiederholt, wenn die RNA-Konzentration in der Lösung unter 5ng/ $\mu$ l lag.

### 3.2.3 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde das cDNA Kit (Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR, Thermo Scientific; s. Tab. 6) verwendet.

Folgende Komponenten wurden auf Eis wie folgt gemischt:

- 14 $\mu$ l RNA-Lösung (maximal 200ng; gegebenenfalls mit RNA-freiem Wasser verdünnt)
  - 4 $\mu$ l Reaktionsmix (5X Reaction Mix)
  - 2 $\mu$ l Enzymmix (Maxima Enzyme Mix)
- 20 $\mu$ l Gesamtvolumen

Die Flüssigkeit wurde gemischt, mit einer Tischzentrifuge zentrifugiert und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gekühlt. Das Reaktionsgefäß wurde nun zur cDNA-Synthese in eine PCR-Maschine (BioRad; s. Tab. 7) überführt. Hier wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren und die Probe zunächst bei 25°C für 10 Minuten inkubiert. Nach der Hybridisierung erfolgte die reverse Transkription für 30 Minuten bei 50°C. Abschließend folgte die Termination der Reaktion für 5 Minuten bei 85°C. Die synthetisierte cDNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C im Gefrierschrank (LIEBHERR, s. Tab. 7) gelagert.

### 3.2.4 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Die quantitative Bestimmung der Expression der S1P-Rezeptoren, S1PR1, S1PR2 und S1PR3, erfolgte mittels qPCR (Qiagen, s. Tab. 7). Zur Normalisierung der Proben wurde die Expression der GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) gemessen. Mit Hilfe eines fluoreszierenden Moleküls (SYBR-Green) ist es nach jedem Amplifikationszyklus möglich, PCR-Produkte zu detektieren. SYBR-Green interkaliert an doppelsträngige DNA und emittiert Licht der Wellenlänge 522nm. Damit ist dieses Fluoreszenzsignal proportional zur Menge an amplifizierter DNA. Die Auswertung der qPCR-Messung wurde mit der Herstellersoftware (Rotor-Gene Q Series, Version 2.3.1,

Qiagen) durchgeführt. Auf der x-Achse wurde die Anzahl der abgelaufenen Zyklen gegen die Intensität der Fluoreszenz auf der y-Achse aufgetragen. In diesem Diagramm wurde in dem exponentiell verlaufenen Bereich der Reaktion der Schwellenwert (threshold) gesetzt und der  $C_T$ -Wert (cycle threshold) für die einzelnen PCR-Fragmente bestimmt. Der  $C_T$ -Wert beschreibt die Anzahl der Zyklen, bei dem das Fluoreszenzsignal erstmalig den definierten Schwellenwert überschreitet. Je kleiner der  $C_T$ , desto mehr Ziel-cDNA ist in der Probe vorhanden. Nach Amplifizierung der cDNA-Doppelstränge wurde anhand einer Schmelzkurve die Spezifität der Messung geprüft. Zeigte diese mehrere Peaks, was darauf hindeutet, dass unterschiedliche PCR-Fragmente amplifiziert wurden, wurde die Messung wiederholt. Jede Probe wurde dreifach gemessen. Die gemessenen  $C_T$ -Werte wurden gemittelt. Dabei wurde eine maximale Abweichung eines einzelnen  $C_T$ -Werts vom Mittelwert von 0,5 toleriert. Lag die Abweichung darüber, wurde die Messung ebenfalls wiederholt. Als weiteres Qualitätskriterium wurden die Negativkontrollen (Wasserwerte) betrachtet. Zeigte sich in beiden Negativkontrollen eine exponentiell verlaufende cDNA-Amplifizierung, wurde eine Verunreinigung des RNase-freien Wassers angenommen und die Messung wiederholt.

Zunächst wurde für jedes zu analysierende Gen (S1PR1, S1PR2, S1PR3, GAPDH) ein 9µl Mastermix mit dem entsprechenden Primer (Sigma Aldrich; s. Tab. 8) hergestellt. Dieser bestand aus 3µl RNase-freiem Wasser, 5µl Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen; s. Tab. 6) und 1µl Primer (Konzentration: 0,5µM).

Gen	Primer (Vorwärtsprimer / Rückwärtsprimer)	Hersteller
<b>S1PR1</b>	ATCATGGGCTGGAAGTGCATCA, 5'M-S1PR1-535 CGAGTCCTGACCAAGGAGTAGAT, 3'M-S1PR1-672	Sigma Aldrich
<b>S1PR2</b>	CAGACGCTAGCCCTGCTCAAGA, 5'M-S1PR2-708 TAGTGGGCTTTGTAGAGGA, 3'M-S1PR2-826	Sigma Aldrich
<b>S1PR3</b>	ACAACCGCATGTACTTTTTTCAT, 5'M-S1PR3-215 TACTGCCCTCCCTGAGGAACCA, 3'M-S1PR3-334	Sigma Aldrich
<b>GAPDH</b>	5'-TCCTGCACCACCAACTGCTT-488 3'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-592	Sigma Aldrich

**Tab. 8: Primer (qPCR)**

Neben den zu bestimmenden Proben, wurde bei jeder Messung sowohl eine Positivkontrolle als auch Negativkontrolle mitgeführt. Die Positivkontrolle bestand aus einem Mix der vier PCR-Fragmente, in einer Konzentration von je 20pg/ml der zu untersuchenden Gene. Für die Negativkontrolle wurde RNase-freies Wasser verwendet. Die Reaktionsgefäße für den 72-Well-Rotor der qPCR-Maschine wurden auf Eis nach folgendem Schema befüllt (s. Tab. 9):

<b>Probe</b> GAPDH, S1PR1, S1PR2, S1PR3 (in Triplikaten)	<b>Negativkontrolle</b> H <sub>2</sub> O (in Duplikaten)	<b>Positivkontrolle</b> Mix (in Unikaten)
9µl Mastermix 1µl cDNA	9µl Mastermix 1µl H <sub>2</sub> O	9µl Mastermix 1µl Mix
→ 12 Reaktionsgefäße	→ 8 Reaktionsgefäße	→ 4 Reaktionsgefäße

**Tab. 9: Pipettierschema (qPCR)**

Das Protokoll der qPCR-Reaktion ist in Tab. 10 zusammengefasst.

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>	<b>Wiederholung</b>
<b>Initiale Denaturierung</b>	95°C	10 min	1
<b>Denaturierung</b>	95°C	10 sek	40
<b>Hybridisierung</b>	60°C	15 sek	
<b>Kettenverlängerung</b>	72°C	20 sek	
<b>Schmelzkurve</b>	72°C – 95°C	90 sek pro 1°C	1

**Tab. 10 Protokoll der qPCR-Reaktion**

Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit Microsoft Excel 2011, unter Anwendung der folgenden Formel [112]:

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

Dabei wurde die Expression des Zielgens mit der Expression von GAPDH normalisiert und in Prozent angegeben.

### 3.2.5 Statistik

Die statistische Auswertung sowie das Erstellen der Abbildungen wurde mit Microsoft Excel 2011, GraphPad Prism (Version 6.0e) und der Statistiksoftware R (Version 3.2.3) durchgeführt. Die Auswertung mit der Statistiksoftware R erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Gerhard Schön aus dem Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Aufgrund der Verteilung der errechneten Rezeptorexpressionen wurden die Werte logarithmiert (natürlicher Logarithmus). Alle im Ergebnisteil durchgeführten Beschreibungen und Analysen basieren auf den logarithmierten Werten der Expressionsdaten. Neben Mittelwerten und Standardabweichungen wurden auch Konfidenzintervalle der Mittelwerte (95% KI) zur Beschreibung der Daten angegeben. Als statistischer Test wurde der t-Test (zweiseitig) durchgeführt. Beim Expressionsvergleich

von Proben unterschiedlicher Personen wurde ein ungepaarter t-Test verwendet, wohingegen beim Vergleich der Rezeptorexpression zwischen den drei Aortenabschnitten der gleichen Person ein gepaarter t-Test angewendet wurde. Dies erfolgte ohne Alpha-Fehler-Adjustierung. Neben dem t-Test wurden Pearson-Korrelationsanalysen zur Darstellung von Assoziationen durchgeführt, wobei jeweils ein Korrelationskoeffizient ( $r$ ) und der dazugehörige P-Wert angegeben wurde. Als statistisch signifikant („\*“) galt ein P-Wert von  $P < 0,05$ , wobei ein  $P < 0,01$  mit „\*\*“ und ein  $P < 0,001$  mit „\*\*\*“ gekennzeichnet wurde.

Die Regressionsanalysen mit Rückwärtselimination erfolgten je nach Art der abhängigen Variablen entweder logistisch oder linear. Logistische Regressionen wurden für das Vorkommen von Plaque (dichotome Variable) in den einzelnen Aortenabschnitten durchgeführt, wohingegen der Plaquescore (metrische Variable) der gesamten Aorta mittels linearer Regression analysiert wurde. Neben P-Werten und Konfidenzintervallen wurden für die logistischen Regressionen Odds-Ratios (OR) und für das lineare Regressionsmodell Koeffizienten angegeben. Folgende unabhängige Variablen flossen in die Regressionsmodelle mit ein: Alter, Geschlecht, BMI, arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus, pathologischer Nierenstatus, logarithmierte Expression des S1PR1, S1PR2 und S1PR3 in der Aorta ascendens, Aorta descendens und Aorta abdominalis. Zusätzlich wurde für die logistischen Regressionsanalysen das Vorkommen von Plaque in den nicht zu analysierenden Abschnitten als unabhängige Variable miteinbezogen. Jedes Regressionsmodell wurde nach dem gleichen Prinzip erstellt. Dabei wurde zunächst eine Regressionsanalyse mit allen unabhängigen Variablen gerechnet und nach aufsteigenden P-Werten sortiert (Gesamtmodell). Die Variable mit dem höchsten P-Wert wurde aus dem Modell entfernt und die Regressionsanalyse erneut gerechnet. Dieses Vorgehen wurde solange wiederholt, bis ausschließlich signifikante Einflussvariablen im finalen Regressionsmodell verblieben (Rückwärtselimination).

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Beschreibung der Gesamtkohorte**

In dieser Arbeit wurden Gewebeproben der Aorta ascendens (AS), Aorta descendens (DE) und Aorta abdominalis (AB) von 116 Personen analysiert. Anhand der Sektionsprotokolle waren Alter und Geschlecht der Probanden bekannt, ebenso klinische Daten, deren Betrachtung im Zusammenhang mit Atherosklerose interessant sein könnten (s. 3.1.1, S.17). Bis auf zwei fehlende Einträge für den BMI, waren die Datensätze vollständig. Die Durchschnittswerte für Alter und BMI sowie der Anteil an Männern und Probanden mit arteriellem Hypertonus, Diabetes mellitus oder pathologischem Nierenstatus sind in Tab. 11 zusammengefasst.

#### **4.1.1 Einteilung in Kontroll- und Plaquegruppe**

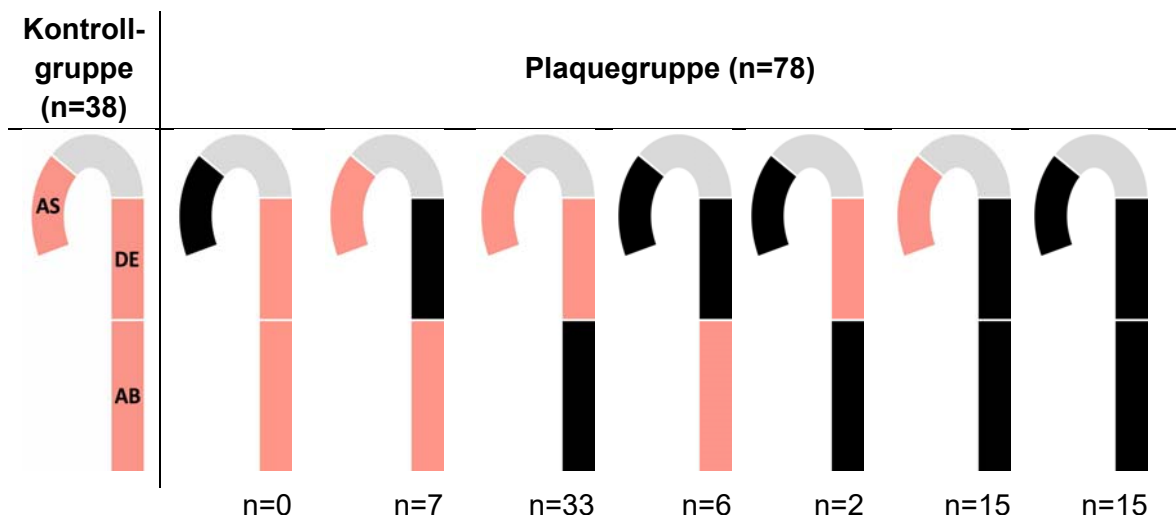
Um erste Vergleiche zwischen Kontrollen und an der Aorta erkrankten Probanden (Plaquegruppe) durchführen zu können, wurde die Gesamtkohorte in zwei Gruppen aufgeteilt. Zuvor wurden für jeden Aortenabschnitt (AS, DE und AB) zwei Gruppen (PLQ(-) und PLQ(+)) gebildet, wobei für die AB-Gruppe auch Probanden mit einer weichen Plaque (Plaquescore von 1) in die PLQ(-)-Gruppe eingeschlossen wurden, um so die Größe der beiden Untergruppen anzupassen (s. 3.1.2, Tab. 3, S. 18). Die Kontrollgruppe (n=38) umfasste nun alle Probanden, die für alle drei Aortenabschnitte ein PLQ(-) verzeichneten. In der Plaquegruppe (n=78) befanden sich die anderen Probanden, die für mindestens einen der drei Aortenabschnitte ein PLQ(+) verzeichneten. Bis auf das Geschlecht, unterschieden sich die beiden Gruppen hinsichtlich aller untersuchten Parameter, wobei die Plaquegruppe ein höheres Alter und einen höheren BMI aufwies sowie einen höheren Anteil an Hypertonikern, Diabetikern und Probanden mit pathologischem Nierenstatus (s. Tab. 11).

	Gesamtkohorte (N=116)	Kontrollgruppe (n=38)	Plaquesgruppe (n=78)
<b>Alter [Jahre]</b>	58,7 ± 18,2 (19-101)	43 ± 16,4 (19-84)	66,3 ± 13,5 (32-101)***
<b>männlich (n (Fraktion))</b>	73 (62,9%)	23 (60,5%)	50 (64,1%)
<b>BMI [kg/m<sup>2</sup>]</b>	26,9 ± 7,4	24,8 ± 6,2	28,0 ± 7,7*
<b>arterieller Hypertonus (n (Fraktion))</b>	19 (16,4%)	1 (2,6%)	18 (23,1%)**
<b>Diabetes mellitus (n (Fraktion))</b>	13 (11,2%)	0 (0%)	13 (16,7%)**
<b>pathologischer Nierenstatus (n (Fraktion))</b>	54 (46,6%)	6 (15,8%)	48 (61,5%)***

**Tab. 11: Studienkohorte und Untergruppen.** Siehe Text für Details. Daten für Alter sind in MW +/- SD (min-max) angegeben, Daten für BMI in MW +/- SD. Die Werte der Kontroll- und der Plaquesgruppe wurden mittels zweiseitigem t-Test verglichen, wobei \*P<0,05, \*\*P<0,01 und \*\*\*P<0,001.

#### 4.1.2 Lokalisation der Aortenplaques

Plaques traten am häufigsten in der AB auf (83,3%), gefolgt von der DE (55,1%) und der AS (29,5%). Die Verteilung der Plaque in den verschiedenen Abschnitten ist in Abb. 7 aufgeführt. Dabei ergab sich, dass die häufigste Konstellation das Vorhandensein einer Plaque in der AB ohne Befall der DE oder AS war (n=33, 42,3%), gefolgt von Probanden mit einer Plaque in der AB und einem Befall der DE (n=15, 19,2%) bzw. der DE und AS (n=15, 19,2%). Ein isolierter Befall der DE war vergleichsweise selten (n=7, 9,0%), ebenso wie ein Befall der DE und AS (n=6, 7,7 %). In keinem Fall war die AS isoliert betroffen, auch die Kombination aus AS und AB war äußerst selten (n=2, 2,6%).



**Abb. 7: Lokalisation von Plaque in den untersuchten Aortenabschnitten.** Die drei untersuchten Aortenabschnitte (rot) sind schematisch dargestellt, der nicht untersuchte Aortenbogen ist grau. Erkrankte Aortenabschnitte sind schwarz dargestellt. Angegeben ist die jeweilige Gruppengröße (n). AS, Aorta ascendens; DE, Aorta descendens; AB, Aorta abdominalis.



Wie oben beschrieben, gab es signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Plaquegruppe hinsichtlich Alter, BMI und Komorbiditäten (s. Tab. 11). In diesem Abschnitt wurde untersucht, inwieweit diese Unterschiede mit einer Erkrankung eines bestimmten Aortenabschnitts assoziiert sind. Wie unter 3.1.2 (ab S. 17) beschrieben, wurde hierfür die Gesamtkohorte für jeden Aortenabschnitt (AS, DE oder AB) in zwei Untergruppen unterteilt: eine Kontrollgruppe (PLQ(-)) und eine Plaquegruppe (PLQ(+)) (s. 3.1.2, Tab. 3, S. 18). Dabei ist zu beachten, dass ein Proband in einer der plaque-negativen Gruppen durchaus eine Plaque an einem anderen Aortenabschnitt aufweisen konnte.

Probanden mit PLQ(+) in den jeweiligen Abschnitten waren signifikant älter, während es keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen hinsichtlich der Geschlechterverteilung und des BMI gab (s. Tab. 12). Bezüglich der Komorbiditäten waren die Hypertoniker stets stärker in den Plaquegruppen vertreten, während dies bei den Diabetikern und den Probanden mit pathologischem Nierenstatus nur für die AB- bzw. die DE- und AB-Kohorte(n) galt (s. Tab. 12).

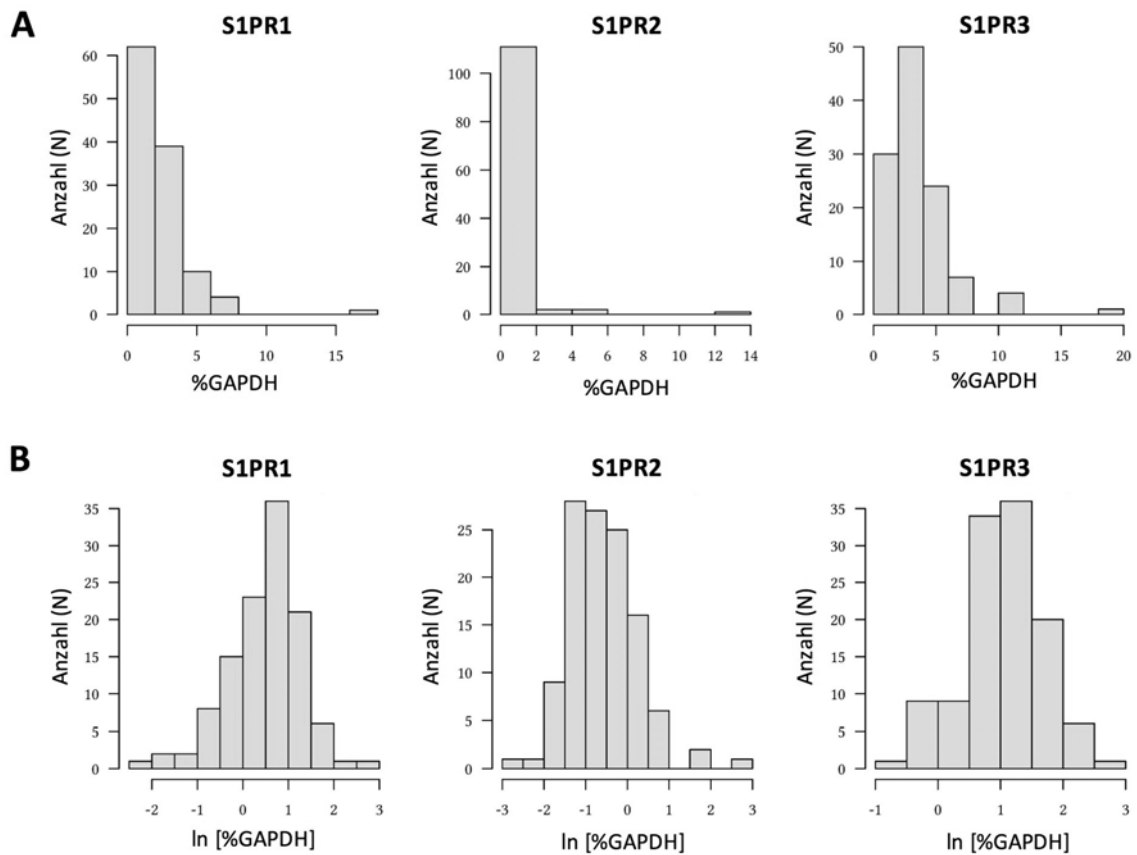
	AS		DE		AB	
	PLQ(-)	PLQ(+)	PLQ(-)	PLQ(+)	PLQ(-)	PLQ(+)
<b>Anzahl (n)</b>	93	23	73	43	51	65
<b>Alter [Jahre]</b>	56,9 ± 18,5 (19-89)	66,1 ± 15* (32-101)	53,5 ± 18,2 (19-86)	67,6 ± 14,3*** (32-101)	47,3 ± 18 (19-89)	67,6 ± 12,4*** (44-101)
<b>männlich (n (Fraktion))</b>	60 (64,5%)	13 (56,5%)	48 (65,8%)	25 (58,1%)	32 (62,7%)	41 (63,1%)
<b>BMI [kg/m<sup>2</sup>]</b>	26,8 ± 7,1	27,4 ± 8,5	26,6 ± 6,9	27,4 ± 8,1	26,0 ± 7,3	27,7 ± 7,4
<b>arterieller Hypertonus (n (Fraktion))</b>	12 (12,9%)	7 (30,4%)*	8 (11,0%)	11 (25,6%)*	3 (5,9%)	16 (24,6%)**
<b>Diabetes mellitus (n (Fraktion))</b>	10 (10,8%)	3 (13,0%)	6 (8,2%)	7 (16,3%)	0 (0,0%)	13 (20,0%)*
<b>pathologischer Nierenstatus (n (Fraktion))</b>	40 (43,0%)	14 (60,9%)	26 (35,6%)	28 (65,1%)*	10 (19,6%)	44 (67,7%)*

**Tab. 12: Vergleiche zwischen PLQ(-) und PLQ(+)-Gruppen für AS, DE und AB.** Jeder Aortenabschnitt wurde in zwei Untergruppen eingeteilt: Plaque lokal vorhanden (PLQ(+)) oder nicht (PLQ(-)). Daten für Alter sind in MW +/- SD (min-max) angegeben, Daten für BMI in MW +/- SD. Die Gruppenvergleiche wurden mittels eines zweiseitigen t-Tests auf die Signifikanz der Unterschiede getestet, wobei \*P<0,05, \*\*P<0,01 und \*\*\*P<0,001. AS, Aorta ascendens; DE, Aorta descendens; AB, Aorta abdominalis; PLQ, Plaque.

#### 4.2 Analyse der Expression der S1P-Rezeptoren

Von jedem Probanden der gesamten Studienkohorte wurde für alle drei Aortenabschnitte (AS, DE und AB) die Expression des S1PR1, S1PR2 und S1PR3 mittels qPCR gemessen (s. 3.2.4, ab S. 22). Alle unter 4.2 und 4.3 beschriebenen Analysen konnten daher mit vollständigen Datensätzen durchgeführt werden. Da die Messdaten für keinen der drei

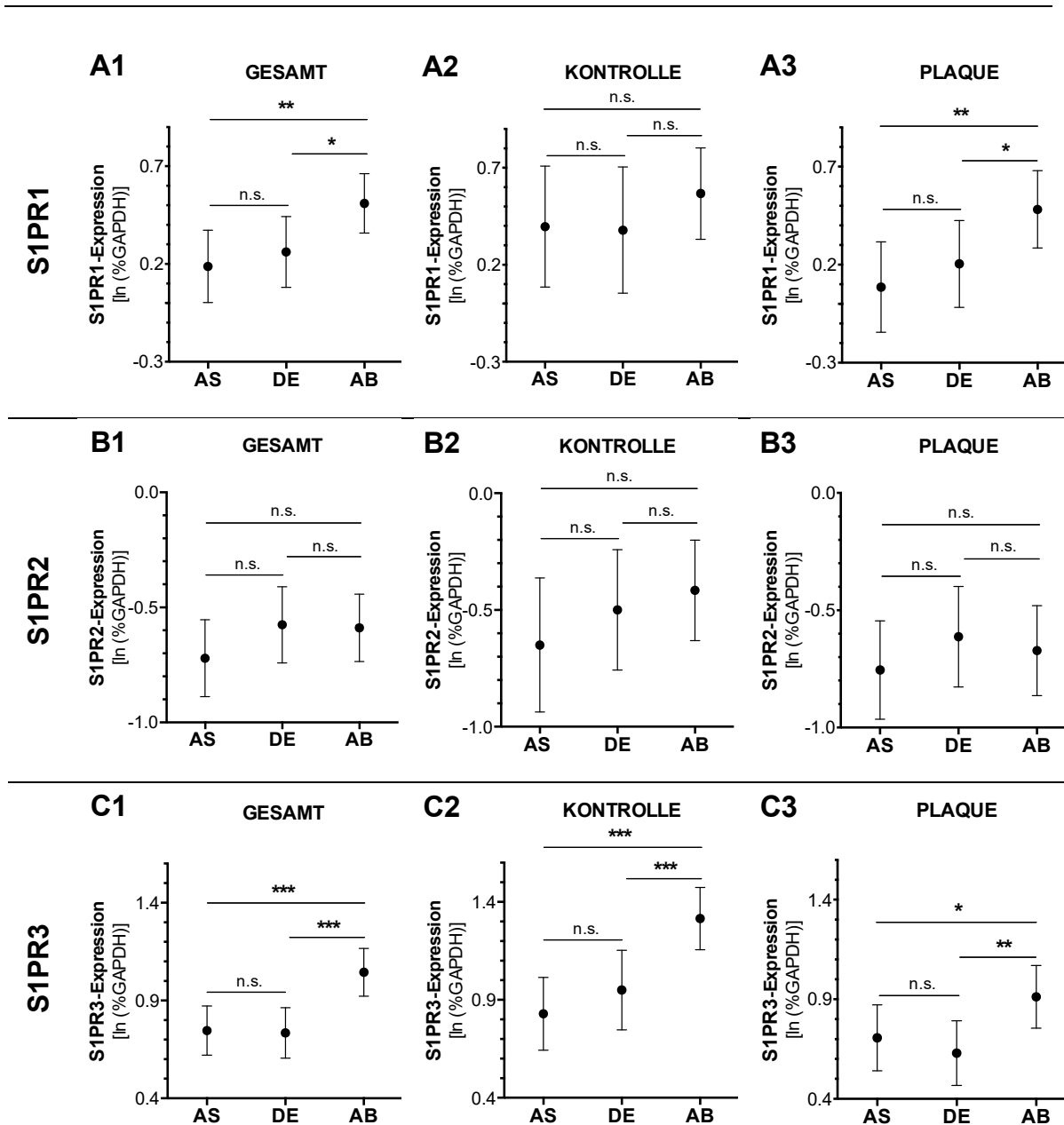
S1P-Rezeptoren normalverteilt waren, wurden für die im Folgenden beschriebenen statistischen Analysen logarithmierte Werte eingesetzt. Exemplarisch werden die Histogramme der Expressionsdaten der drei S1P-Rezeptoren für die AB vor und nach dem Logarithmieren gezeigt (s. Abb. 8 A, B).



**Abb. 8: Histogramme der Expressionsdaten der S1P-Rezeptoren der Aorta abdominalis.** Alle Expressionsdaten wurde logarithmiert (natürlicher Logarithmus). Gezeigt werden die Expressionsdaten vor (A) und nach dem Logarithmieren (B).

#### 4.2.1 Expression der S1P-Rezeptoren in den verschiedenen Aortenabschnitten in der Gesamtkohorte sowie Kontroll- und Plaquegruppe

Zunächst wurde die Frage untersucht, ob sich die Expression eines jeweiligen S1P-Rezeptors zwischen den drei Aortenabschnitten unterscheidet. Diese Analyse wurde für die Gesamtkohorte sowie für die beiden Untergruppen „Kontrolle“ und „Plaque“ durchgeführt (s. 4.1.1, S. 26 für die Gruppeneinteilung). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 9 zusammengefasst.



**Abb. 9: Vergleich der Expression des S1PR1, S1PR2 und S1PR3 zwischen den drei Aortenabschnitten AS, DE und AB in der Gesamtkohorte sowie den Untergruppen „Kontrolle“ und „Plaques“.** Die Expression der S1P-Rezeptoren wurde mittels qPCR gemessen und alle Werte logarithmiert. Verglichen wurde die Expression eines jeweiligen S1P-Rezeptors (MW und 95% Konfidenzintervalle) zwischen der Aorta ascendens (AS), Aorta descendens (DE) und Aorta abdominalis (AB) in der Gesamtkohorte (N=116) (A1, B1, C1), Kontrollgruppe (n=38) (A2, B2, C2) und der Plaquesgruppe (n=78) (A3, B3, C3). Die Expressionswerte wurden mittels eines zweiseitigen t-Tests miteinander verglichen, wobei \*P<0,05, \*\*P<0,01 und \*\*\*P<0,001.

In der Gesamtkohorte zeigt sich die S1PR1-Expression in der AB im Vergleich zur AS und DE erhöht (s. Abb. 9 A1). Diese Unterschiede sind ebenfalls in der Plaquesgruppe ersichtlich (s. Abb. 9 A3), nicht aber in der Kontrollgruppe (s. Abb. 9 A2).

Für den S1PR2 lassen sich in keiner der untersuchten Gruppen signifikante Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Aortenabschnitten feststellen (s. Abb. 9 B1-3).

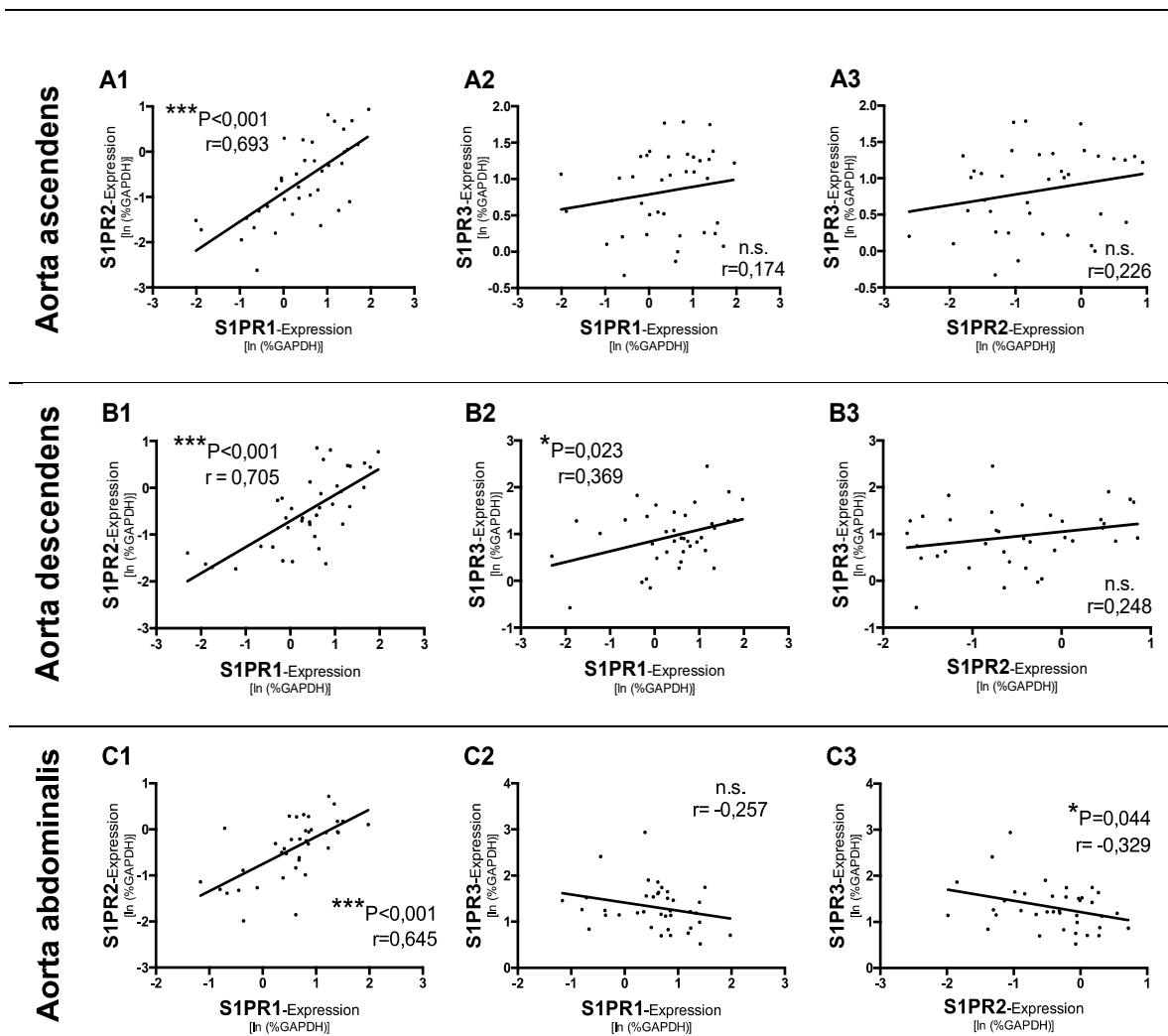
Für den S1PR3 ergibt sich ein ähnliches Bild wie für den S1PR1, dahingehend, dass die Expressionslevel des Rezeptors in der Gesamtkohorte sowie in der Plaquegruppe in der AB gegenüber der AS und DE erhöht sind (s. Abb. 9 C1, C3). Im Gegensatz zu S1PR1 werden diese Unterschiede für den S1PR3 aber auch in der Kontrollgruppe beobachtet (s. Abb. 9 C2).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in der Kontrollgruppe der S1PR3 in der AB höher exprimiert ist als in der AS bzw. DE. Dieser Unterschied wird auch in der Plaquegruppe erkennbar, hier ist zusätzlich die Expression des S1PR1 ebenfalls in der AB gegenüber der AS bzw. DE erhöht.

### **4.2.2 Korrelation der Expression der S1P-Rezeptoren untereinander in der Kontrollgruppe**

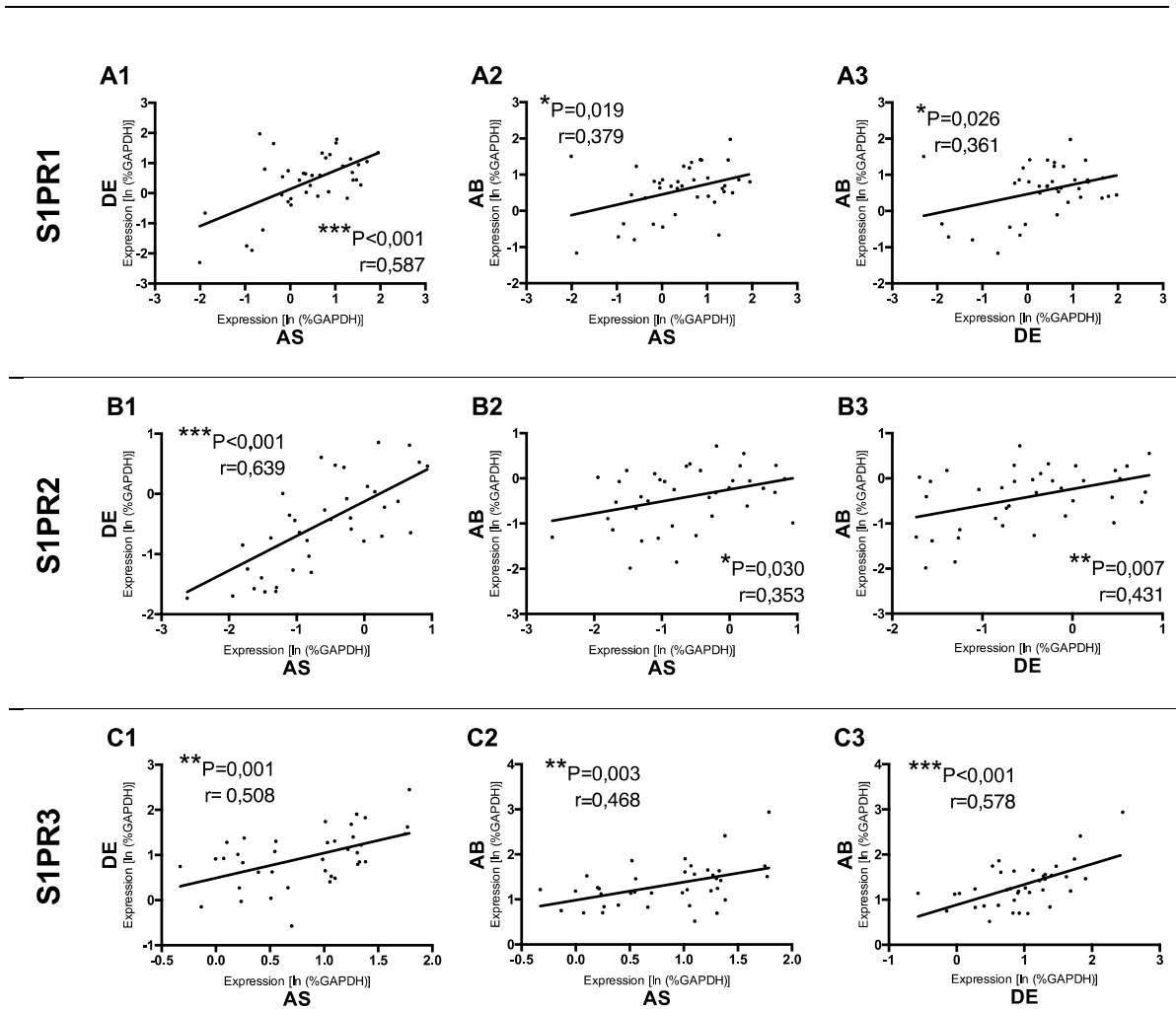
Es ist unbekannt, ob in Gefäßen die Expression eines S1P-Rezeptors an die eines anderen gekoppelt ist. Diese Frage wurde mit Hilfe der erhobenen Datensätze in der Kontrollgruppe untersucht, indem zunächst Korrelationsanalysen der Expressionsdaten der drei S1P-Rezeptoren innerhalb der jeweiligen Aortenabschnitte durchgeführt wurden.

In allen drei Aortenabschnitten ist die Expression des S1PR1 mit der des S1PR2 assoziiert (s. Abb. 10 A1, B1, C1). Zusätzlich zeigt sich eine positive Korrelation zwischen der S1PR1- und S1PR3 Expression in der DE (s. Abb. 10 B2). Eine negative Korrelation wurde zwischen der S1PR2- und S1PR3-Expression in der AB gefunden (s. Abb. 10 C3). Damit unterscheidet sich die AB signifikant von den anderen beiden Aortenabschnitten, in denen - zumindest im Trend - die S1PR2-Expression positiv mit der S1PR3-Expression korreliert (s. Abb. 10, vergl. C3 mit A3, B3).



**Abb. 10: Korrelationsanalysen zwischen der Expression der einzelnen S1P-Rezeptoren innerhalb eines Aortenabschnitts in der Kontrollgruppe (n=38).** Die Expression der S1P-Rezeptoren wurde mittels qPCR gemessen und alle Werte logarithmiert. Für jede Kombination (S1PR1/S1PR2, S1PR1/S1PR3 und S1PR2/S1PR3) wurde eine Korrelationsanalyse nach Pearson durchgeführt. r, Korrelationskoeffizient; n.s., nicht signifikant.

In einer zweiten Analyse wurde untersucht, ob die Expression eines S1P-Rezeptors in einem Aortenabschnitt mit der in einem anderen Aortensegment korreliert. Hierbei zeigte sich, dass sowohl die Expression des S1PR1 als auch die des S1PR2 und S1PR3 zwischen allen drei Aortenabschnitten positiv korreliert (s. Abb. 11).



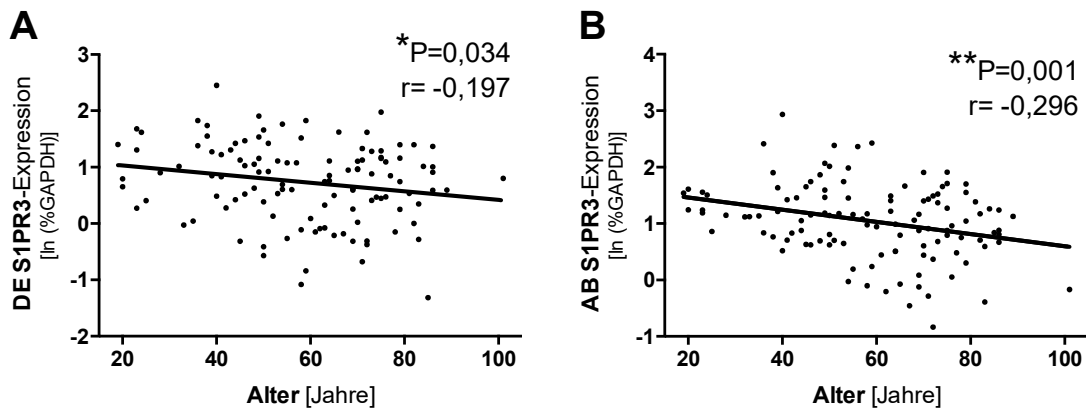
**Abb. 11: Korrelationsanalysen der Expression eines S1P-Rezeptors zwischen den einzelnen Aortenabschnitten in der Kontrollgruppe (n=38).** Die Expression der S1P-Rezeptoren wurde mittels qPCR gemessen und alle Werte logarithmiert. Für jeden S1P-Rezeptor wurden die folgenden Kombinationen unter Anwendung einer Pearson-Korrelationsanalyse getestet: AS/DE, AS/AB und DE/AB.  $r$ =Korrelationskoeffizient; AS, Aorta ascendens; DE, Aorta descendens; AB, Aorta abdominalis.

#### 4.2.3 Einfluss klinischer Parameter auf die Expression der S1P-Rezeptoren in den verschiedenen Aortenabschnitten der Gesamtkohorte

In dieser Analyse wurde untersucht, ob die Expression der einzelnen S1P-Rezeptoren in den Aortenabschnitten durch klinische Parameter (Alter, Geschlecht, BMI, Diabetes mellitus, arterieller Hypertonus, pathologischer Nierenstatus) beeinflusst wird. Für metrische Parameter (Alter, BMI) wurden die Gruppen anhand des Medians getrennt. Insgesamt zeigten sich nur für den S1PR3 signifikante Ergebnisse (s. Tab. 13). Für Geschlecht, arterieller Hypertonus und pathologischer Nierenstatus konnten keine Unterschiede in der Expression festgestellt werden. Ältere Patienten wiesen eine signifikant niedrigere Expression des S1PR3 in der DE und AB auf (s. Tab. 13 und Abb. 12). Weiterhin wurde der S1PR3 bei hohem BMI und Diabetikern in der AB signifikant weniger exprimiert.

	Alter		Geschlecht		BMI		Diabetes mellitus		arterieller Hypertonus		patho. Nierenstatus	
	<60J	>60J	m	f	<25,3	>25,3	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
Anzahl (n)	58	58	73	43	57	57	103	13	97	19	62	54
AS S1PR3	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	
DE S1PR3	0,865	0,604*	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	
AB S1PR3	1,253	0,836***	n.s.		1,197	0,895*	1,092	0,671*	n.s.		n.s.	

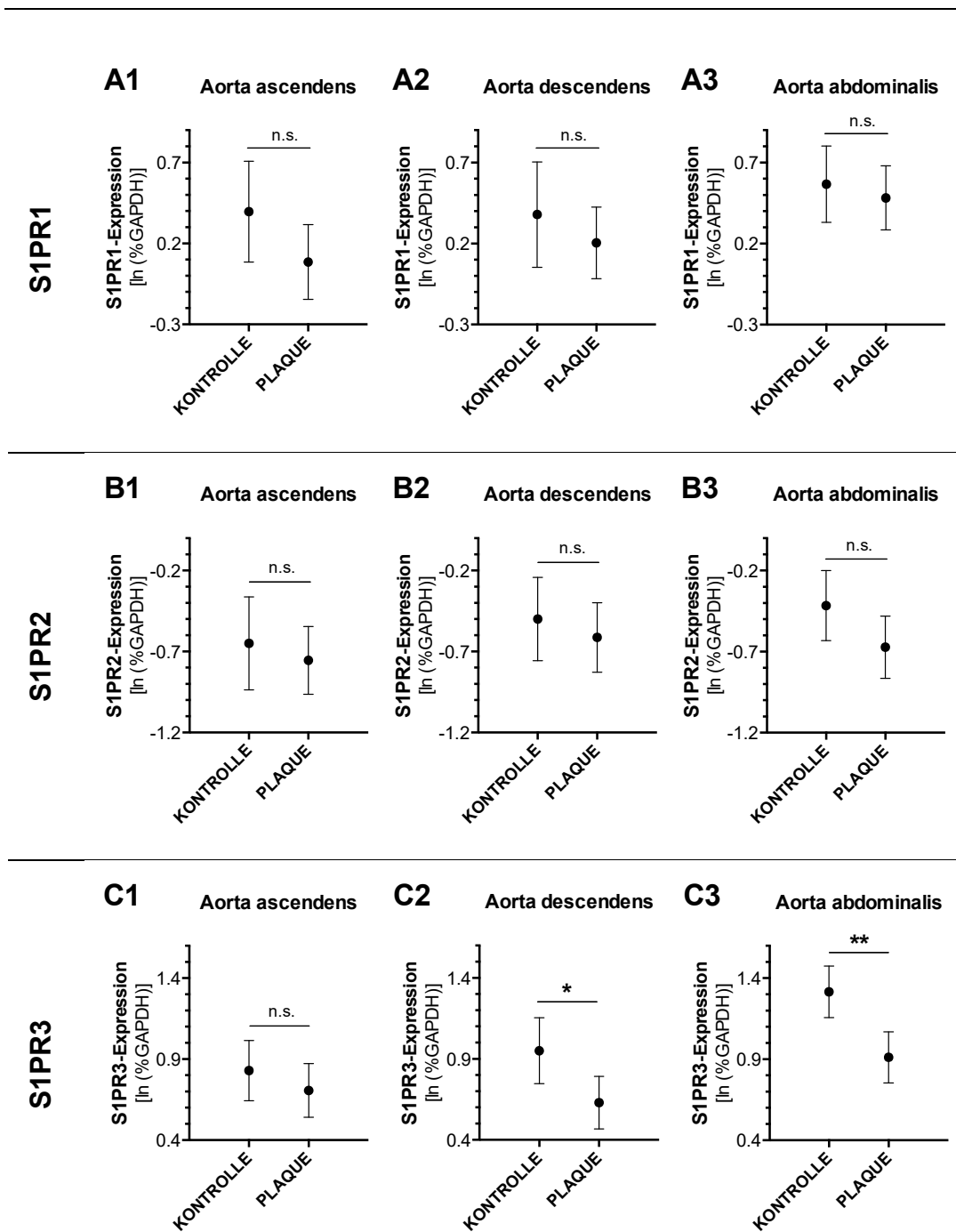
**Tab. 13: Assoziation der S1PR3 Expression mit Alter, BMI und Komorbiditäten in der Gesamtkohorte (N=116).** Die Expression der S1P-Rezeptoren wurde mittels qPCR gemessen und alle Werte logarithmiert. Gruppenvergleiche wurden mittels eines zweiseitigen t-Tests durchgeführt. Angegeben sind die jeweiligen Mittelwerte bei signifikanten Unterschieden. Weder für S1PR1 noch für S1PR2 wurden signifikante Unterschiede gefunden. \*P<0,05, \*\*\*P<0,001. AS, Aorta ascendens; DE, Aorta descendens; AB, Aorta abdominalis; n.s., nicht signifikant.



**Abb. 12: Korrelationsanalysen zwischen Alter und der Expression des S1PR3 in der DE und der AB in der Gesamtkohorte (N=116).** Die Expression von S1PR3 wurde mittels qPCR gemessen und alle Werte logarithmiert. Die Expression des S1PR3 in der Aorta descendens (DE) (A) und der Aorta abdominalis (AB) (B) wurde nach Pearson mit dem Alter der Probanden korreliert. r, Korrelationskoeffizient.

#### 4.2.4 Einfluss der Atherosklerose auf die Expression der S1P-Rezeptoren

Zunächst wurde die Expression der einzelnen S1P-Rezeptoren in der AS, DE bzw. AB der Kontrollgruppe (n=38) mit der Plaquegruppe (n=78) verglichen (s. 4.1.1, S. 26 für die Gruppeneinteilung). Im Trend ist die Expression jedes S1P-Rezeptors in allen Aortensegmenten in der Kontrollgruppe höher als in der Plaquegruppe (s. Abb. 13). Statistisch signifikant ist dieser Unterschied allerdings nur für die S1PR3-Expression in der DE und AB (s. Abb. 13 C2, C3).

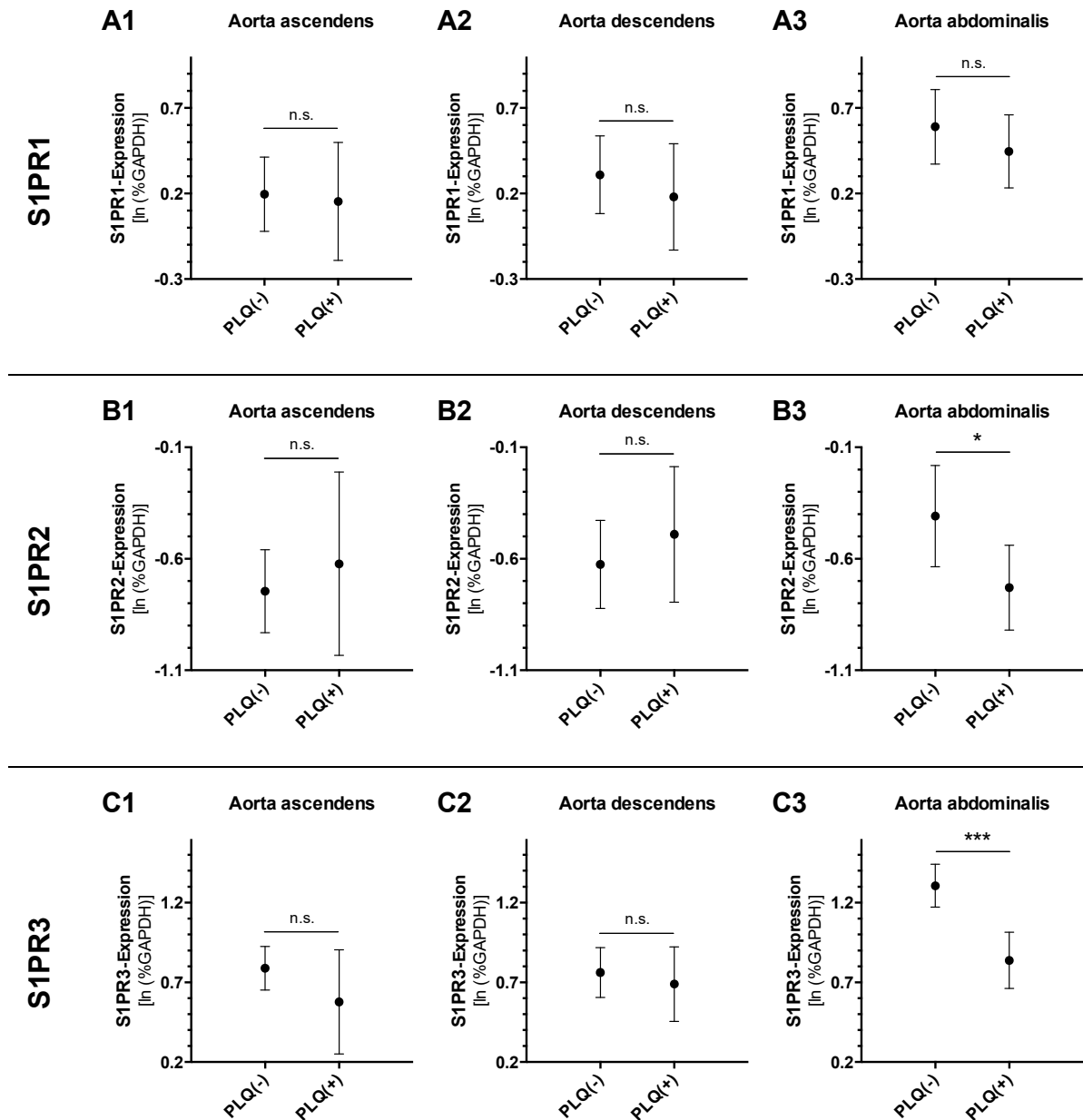


**Abb. 13: Vergleich der Expression des S1PR1, S1PR2 und S1PR3 in den drei Aortenabschnitten AS, DE und AB in der Kontrollgruppe und der Plaquegruppe.** Die Expression der S1P-Rezeptoren wurde mittels qPCR gemessen und alle Werte logarithmiert. Verglichen wurde die Expression eines jeweiligen S1P-Rezeptors (MW und 95% Konfidenzintervalle) in einem Aortenabschnitt zwischen der Kontrollgruppe (n=38) und der Plaquegruppe (n=78). Die Expressionswerte wurden mittels eines zweiseitigen t-Tests miteinander verglichen, wobei \*P<0,05 und \*\*P<0,01. AS, Aorta ascendens; DE, Aorta descendens; AB, Aorta abdominalis; n.s., nicht signifikant.

Anschließend wurde untersucht, welche Rolle der Plaquestatus im jeweiligen Aortenabschnitt spielt und hier die Expression der S1P-Rezeptoren der PLQ(-)- der PLQ(+)- Gruppen gegenübergestellt (s. auch 3.1.2, Tab. 3, S. 18). Es sei erneut vermerkt, dass Probanden in der PLQ(-)-Gruppe eines Aortenabschnitts durchaus eine Plaque an einem

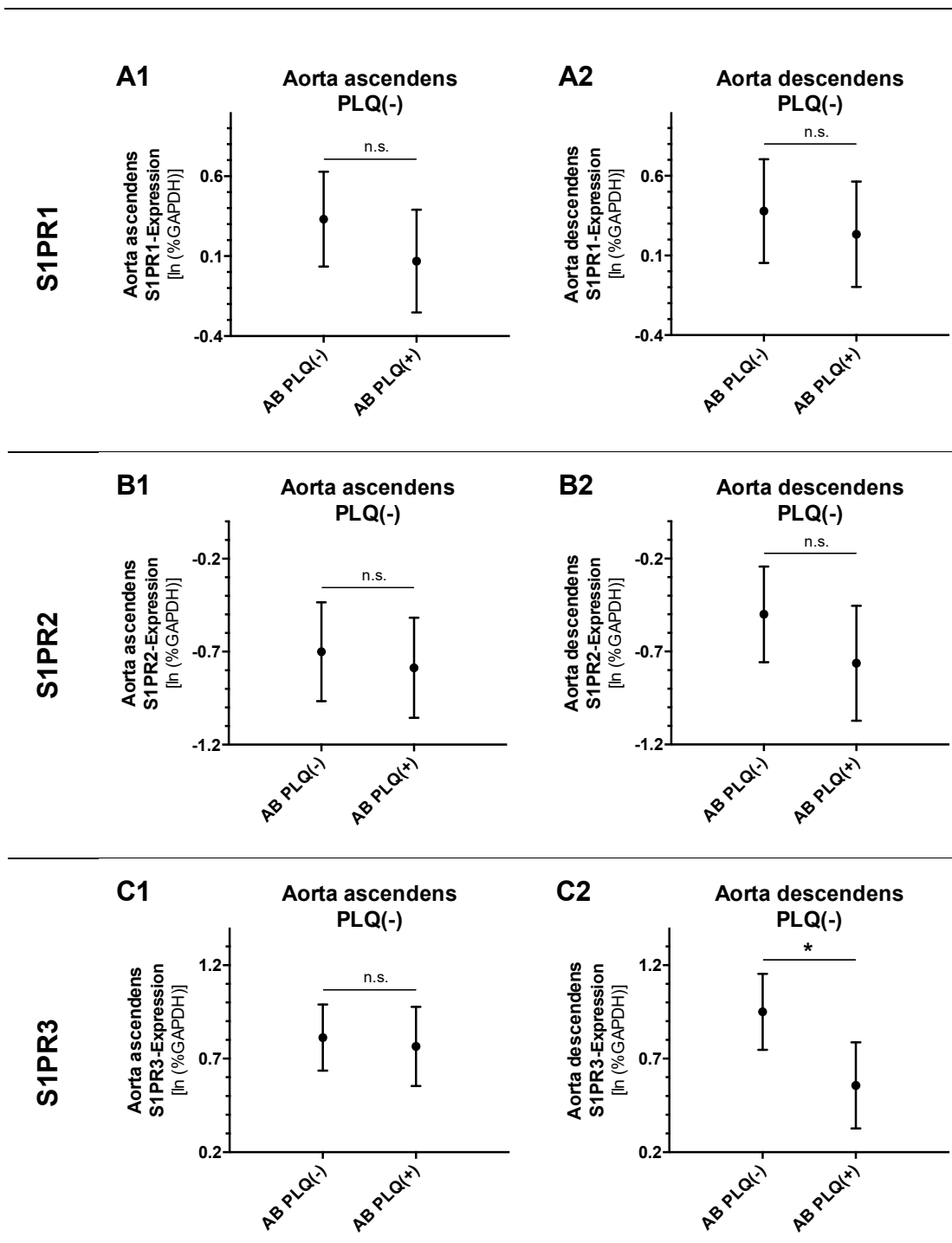


anderen Aortensegment aufweisen konnten. Signifikante Unterschiede zwischen einer PLQ(-)- und PLQ(+)-Gruppe wurden nur in der AB gefunden, und zwar für S1PR2 und S1PR3 (s. Abb. 14). Beide Rezeptoren sind in den jeweiligen PLQ(+)-Gruppen deutlich niedriger exprimiert (s. Abb. 14 B3, C3).



**Abb. 14: Vergleich der S1P-Rezeptorexpression zwischen erkrankten und nicht-erkrankten Aortenabschnitten.** Die Expression der S1P-Rezeptoren wurde mittels qPCR gemessen und alle Werte logarithmiert. Für jeden Aortenabschnitt wurden die Gesamtkohorte in zwei Untergruppen aufgeteilt, je nachdem ob eine Plaque vorlag (PLQ(+)) oder nicht (PLQ(-)). Dabei ergaben sich folgende Gruppengrößen: Aorta ascendens: PLQ(-), n=93, PLQ(+), n=23; Aorta descendens: PLQ(-), n=73, PLQ(+), n=43; Aorta abdominalis: PLQ(-), n=51, PLQ(+), n=65. Die Expressionswerte der jeweiligen S1P-Rezeptoren (MW und 95% Konfidenzintervalle) zwischen der PLQ(-)- und der PLQ(+)-Gruppe eines Aortenabschnitts wurde mittels zweiseitigem t-Test miteinander verglichen, wobei \*P<0,05 und \*\*\*P<0,001. n.s., nicht signifikant.

Aus diesen Beobachtungen ergab sich die Frage, ob die Expression von S1P-Rezeptoren in plaquefreien Abschnitten der AS und DE von einer Plaqueausbildung der AB beeinflusst wird, was auf einen systemischen Regulator der S1P-Rezeptorexpression hindeuten könnte. Hierzu wurde die PLQ(-)-Gruppe der DE (n=73) bzw. der AS (n=93) dahingehend unterteilt, ob die Probanden in der AB erkrankt waren oder nicht (s. Abb. 15). Demnach war die S1PR3-Expression in nicht-erkrankter DE deutlich niedriger, wenn die benachbarte AB erkrankt war (s. Abb. 15 C2). Auch die S1PR1- und S1PR2-Expression wiesen ein ähnliches Muster auf, allerdings erreichte der Expressionsunterschied keine statistische Signifikanz (s. Abb. 15 A2, B2). Für die AS konnte kein Einfluss einer AB-Erkrankung auf die S1P-Rezeptorexpression gefunden werden (s. Abb. 15 A1, B1, C1).



**Abb. 15: Einfluss einer Erkrankung der Aorta abdominalis (AB) auf die Expression von S1P-Rezeptoren in der Aorta ascendens (AS) und Aorta descendens (DE).** Die Expression der S1P-Rezeptoren wurde mittels qPCR gemessen und alle Werte logarithmiert. Die PLQ(-)-Gruppe der DE (n=73) bzw. der AS (n=93) wurden dahingehend unterteilt, ob die Probanden in der AB erkrankt waren (AB PLQ(+)) oder nicht (AB PLQ(-)). Dabei ergaben sich folgende Untergruppen: Für die AS: AB PLQ(-), n=45 und AB PLQ(+), n=48; für die DE: AB PLQ(-), n=38 und AB PLQ(+), n=35. Die Expressionswerte (MW und 95% Konfidenzintervalle) für S1PR1 (A1, A2), S1PR2 (B1, B2) und S1PR3 (C1, C2) zwischen der AB PLQ(-)- und der AB PLQ(+)-Gruppe der AS (A1, B1, C1) bzw. DE (A2, B2, C2) wurde mittels zweiseitigem t-Test miteinander verglichen, wobei \*P<0,05. n.s., nicht signifikant; PLQ, Plaque.

### **4.3 Regressionsanalyse: Einfluss verschiedener Parameter auf das Vorkommen von Plaque in der Aorta**

Die bisher beschriebenen Untersuchungen haben Assoziationen zwischen dem Plaquevorkommen in der Aorta und klinischen Parametern sowie der Expression bestimmter S1P-Rezeptoren aufgezeigt. Dabei wurden auch Assoziationen gefunden, die nur für bestimmte Abschnitte der Aorta zutrafen. Das Ziel der folgenden Analysen ist eine umfassende statistische Betrachtung aller erhobenen Daten, um Faktoren zu identifizieren, die Einfluss auf die Plaqueausprägung im gesamten Gefäß und auch in den einzelnen Abschnitten nehmen. Hierzu wurden zunächst mittels Regressionsanalysen unter Berücksichtigung aller erhobenen Daten (Expression der S1P-Rezeptoren in allen Aortenabschnitten, Plaquevorkommen in den einzelnen Aortenabschnitten, Alter, Geschlecht, BMI und Komorbiditäten) diejenigen Parameter identifiziert, die auf das Plaquevorkommen signifikanten Einfluss besitzen. In einer anschließenden Rückwärtselimination wurde in jedem Schritt der Parameter mit dem höchsten P-Wert eliminiert und eine erneute Regressionsanalyse durchgeführt. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis alle verbliebenen Parameter statistisch signifikanten Einfluss hatten.

#### **4.3.1 Aorta ascendens**

Unter Berücksichtigung aller unabhängigen Variablen wurde eine logistische Regressionsanalyse für die diskrete, abhängige Variable „Plaque in der Aorta ascendens“ (AS PLQ) durchgeführt. Dabei wurde gefunden, dass das Plaquevorkommen in der Aorta descendens mit einer Odds-Ratio von 138,4 die am Abstand stärkste Einflussvariable ist, gefolgt von der S1PR1 Expression in der Aorta ascendens bzw. der Aorta descendens (s. Tab. 14). Betrachtet man die Odds-Ratios fällt auf, dass das Risiko einer Plaque in der Aorta ascendens steigt, wenn auch die Expression des S1PR1 in der Aorta ascendens steigt, das Risiko aber sinkt, wenn die Expression in der Aorta descendens steigt.

Variable	OR	95% KI	P-Wert
<b>DE PLQ</b>	138,395	17,672; 2601,946	<0,001***
<b>AS In S1PR1</b>	4,730	1,175; 25,953	0,044*
<b>DE In S1PR1</b>	0,176	0,026; 0,837	0,044*
<b>AB In S1PR3</b>	0,202	0,029; 1,046	0,074
<b>AB In S1PR2</b>	2,969	0,918; 11,438	0,083
<b>DE In S1PR2</b>	4,232	0,839; 28,249	0,099
<b>AS In S1PR2</b>	0,315	0,068; 1,195	0,104
<b>Diabetes mellitus</b>	0,124	0,007; 1,612	0,121
<b>Alter</b>	0,949	0,874; 1,020	0,174
<b>arterieller Hypertonus</b>	3,925	0,546; 31,176	0,177
<b>AB In S1PR1</b>	0,402	0,089; 1,384	0,178
<b>AB PLQ</b>	3,612	0,374; 44,102	0,277
<b>Geschlecht: männlich</b>	0,415	0,059; 2,398	0,339
<b>AS In S1PR3</b>	1,392	0,348; 5,802	0,637
<b>BMI</b>	1,014	0,919; 1,128	0,777
<b>pathologischer Nierenstatus</b>	1,236	0,138; 12,109	0,848
<b>DE In S1PR3</b>	0,890	0,230; 3,452	0,863

**Tab. 14: Regressionsanalyse, um signifikante Einflussvariablen auf das Vorkommen von Plaque in der Aorta ascendens zu identifizieren.** Unter Berücksichtigung aller unabhängigen Variablen wurde eine logistische Regressionsanalyse durchgeführt für die diskrete, abhängige Variable „Plaque in der AS“. Angegeben sind die Odds-Ratio (OR), 95% Konfidenzintervalle (KI) und die P-Werte, wobei \*P<0,05 und \*\*\*P<0,001. AS, Aorta ascendens; DE, Aorta descendens; AB, Aorta abdominalis; PLQ, Plaque.

In der anschließenden Rückwärtselimination wurden von den 17 ursprünglichen Parametern die folgenden 15 sukzessiv ausgeschlossen: 1. DE In S1PR3 (P=0,863), 2. pathologischer Nierenstatus (P=0,852), 3. BMI (P=0,777), 4. AS In S1PR3 (P=0,625), 5. AB PLQ (P=0,268), 6. Alter (P=0,308), 7. Geschlecht: männlich (P=0,421), 8. AS In S1PR2 (P=0,243), 9. DE In S1PR2 (P=0,306), 10. arterieller Hypertonus (P=0,302), 11. Diabetes mellitus (P=0,460), 12. AS In S1PR1 (P=0,116), 13. DE In S1PR1 (P=0,265), 14. AB In S1PR1 (P=0,145), 15. AB In S1PR2 (P=0,168).

Das finale Regressionsmodell beinhaltet noch das Vorkommen einer Plaque in der Aorta descendens als die stärkste Einflussvariable, die Expression des S1PR1 in der Aorta ascendens bzw. descendens wurde in dem Verfahren ausgeschlossen (s. Tab. 15). Als neue Einflussvariable enthält dieses Modell die Expression des S1PR3 in der Aorta abdominalis, wobei das Risiko für eine Plaque in der Aorta ascendens sinkt, wenn die S1PR3-Expression in der Aorta abdominalis steigt (s. Tab. 15).

Variable	OR	95% KI	P-Wert
DE PLQ	44,586	10,574; 333,081	<0,001***
AB In S1PR3	0,255	0,081; 0,686	0,011*

**Tab. 15: Finales Regressionsmodell nach Rückwärtselimination für signifikante Einflussvariablen für das Vorkommen von Plaque in der Aorta ascendens.** Unter Berücksichtigung aller unabhängigen Variablen wurde eine logistische Regressionsanalyse mit anschließender Rückwärtselimination für die diskrete, abhängige Variable „Plaque in der AS“ durchgeführt. Angegeben sind die Odds-Ratio (OR), 95% Konfidenzintervalle (KI) und die P-Werte, wobei \*P<0,05 und \*\*\*P<0,001. DE, Aorta descendens; AB, Aorta abdominalis; PLQ, Plaque.

#### 4.3.2 Aorta descendens

Betrachtet wurde die diskrete, abhängige Variable „Plaque in der Aorta descendens (DE PLQ)“. Hier wurde das Plaquevorkommen in der Aorta ascendens als stärkste Einflussvariable identifiziert, gefolgt von Alter und der Expression des S1PR1 in der Aorta ascendens (s. Tab. 16).

Variable	OR	95% KI	P-Wert
AS PLQ	110,242	16,371; 1417,126	<0,001***
Alter	1,103	1,044; 1,178	0,001**
AS In S1PR1	0,216	0,063; 0,638	0,009**
AS In S1PR2	3,282	0,999; 11,892	0,056
AB PLQ	0,323	0,057; 1,515	0,170
Geschlecht: männlich	2,493	0,696; 10,144	0,177
DE In S1PR1	1,995	0,731; 5,950	0,189
AB In S1PR3	2,141	0,688; 6,966	0,190
Diabetes mellitus	3,985	0,490; 35,070	0,193
BMI	0,961	0,871; 1,055	0,414
pathologischer Nierenstatus	1,607	0,388; 7,029	0,515
DE In S1PR3	0,744	0,185; 2,878	0,667
AS In S1PR3	1,229	0,370; 4,130	0,734
DE In S1PR2	1,110	0,349; 3,524	0,857
AB In S1PR2	0,900	0,269; 2,907	0,860
AB In S1PR1	0,946	0,319; 2,865	0,919
arterieller Hypertonus	1,061	0,200; 5,548	0,943

**Tab. 16: Regressionsanalyse, um signifikante Einflussvariablen auf das Vorkommen von Plaque in der Aorta descendens zu identifizieren.** Unter Berücksichtigung aller unabhängigen Variablen wurde eine logistische Regressionsanalyse durchgeführt für die diskrete, abhängige Variable „Plaque in der DE“. Angegeben sind die Odds-Ratio (OR), 95% Konfidenzintervalle (KI) und die P-Werte, wobei \*\*P<0,01 und \*\*\*P<0,001. AS, Aorta ascendens; DE, Aorta descendens; AB, Aorta abdominalis; PLQ, Plaque.

In der anschließenden Rückwärtselimination wurden von den 17 ursprünglichen Parametern die folgenden 15 sukzessiv ausgeschlossen: 1. arterieller Hypertonus (P=0,943), 2. AB In S1PR1 (P=0,918), 3. DE In S1PR2 (P=0,841), 4. AB In S1PR2

(P=0,793), 5. DE In S1PR3 (P=0,737), 6. AS In S1PR3 (P=0,702), 7. pathologischer Nierenstatus (P=0,478), 8. BMI (P=0,417), 9. DE In S1PR1 (P=0,376), 10. AB PLQ (P=0,353), 11. Geschlecht: männlich (P=0,269), 12. Diabetes mellitus (P=0,256), 13. AB In S1PR3 (P=0,110), 14. AS In S1PR1 (P=0,056), 15. AS In S1PR2 (P=0,440).

Das finale Regressionsmodell beinhaltetete noch das Plaquevorkommen in der Aorta ascendens sowie das Alter als signifikante Einflussvariablen, während die Expression des S1PR1 in der Aorta ascendens in dem Verfahren ausgeschlossen wurde (s. Tab. 17).

Variable	OR	95% KI	P-Wert
AS PLQ	33,116	8,220; 229,162	<0,001***
Alter	1,053	1,022; 1,089	0,001**

**Tab. 17: Finales Regressionsmodell nach Rückwärtselimination für signifikante Einflussvariablen für das Vorkommen von Plaque in der Aorta descendens.** Unter Berücksichtigung aller unabhängigen Variablen wurde eine logistische Regressionsanalyse mit anschließender Rückwärtselimination für die diskrete, abhängige Variable „Plaque in der DE“ durchgeführt. Angegeben sind die Odds-Ratio (OR), 95% Konfidenzintervalle (KI) und die P-Werte, wobei \*\*P<0,01 und \*\*\*P<0,001. AS, Aorta ascendens; PLQ, Plaque.

### 4.3.3 Aorta abdominalis

Für die diskrete, abhängige Variable „Plaque in der Aorta abdominalis (AB PLQ)“ wurde das Alter als stärkste Einflussvariable identifiziert, gefolgt von der Expression des S1PR1 in der Aorta descendens und Aorta ascendens, der Expression des S1PR3 in der Aorta descendens sowie männlichem Geschlecht und pathologischem Nierenstatus (s. Tab. 18). Hinsichtlich der Expression von S1P-Rezeptoren fällt auf, dass mit einem Anstieg der S1PR1-Expression in der Aorta descendens das Risiko für eine Plaque in der Aorta abdominalis steigt, während ein Anstieg der S1PR1-Expression in der Aorta ascendens bzw. ein Anstieg der S1PR3-Expression in der Aorta descendens das Risiko einer Plaque in der Aorta abdominalis verringert (s. Tab. 18).

Variable	OR	95% KI	P-Wert
Alter	1,112	1,049; 1,201	0,002**
DE In S1PR1	6,883	2,012; 31,384	0,005**
AS In S1PR1	0,164	0,038; 0,559	0,007**
DE In S1PR3	0,131	0,024; 0,537	0,009**
Geschlecht: männlich	6,957	1,456; 45,295	0,025*
pathologischer Nierenstatus	6,772	1,217; 49,227	0,038*
AS In S1PR3	3,461	0,935; 15,171	0,076
AS PLQ	10,996	0,866; 222,994	0,085
DE PLQ	0,186	0,023; 1,201	0,093
arterieller Hypertonus	8,050	0,594; 169,925	0,143
AS In S1PR2	2,544	0,649; 11,467	0,195
AB In S1PR3	0,500	0,132; 1,785	0,285
DE In S1PR2	0,490	0,113; 1,906	0,314
AB In S1PR1	0,561	0,156; 1,886	0,355
AB In S1PR2	0,749	0,222; 2,326	0,623
BMI	0,973	0,866; 1,086	0,627
Diabetes mellitus <sup>♦</sup>	-	-	-

♦Da in der AB PLQ(-)-Gruppe kein Proband einen Diabetes mellitus hatte, wurde die Variable aus dem Modell entfernt.

**Tab. 18: Regressionsanalyse, um signifikante Einflussvariablen auf das Vorkommen von Plaque in der Aorta abdominalis zu identifizieren.** Unter Berücksichtigung aller unabhängigen Variablen wurde eine logistische Regressionsanalyse durchgeführt für die diskrete, abhängige Variable „Plaque in der AB“. Angegeben sind die Odds-Ratio (OR), 95% Konfidenzintervalle (KI) und die P-Werte, wobei \*P<0,05 und \*\*P<0,01. AS, Aorta ascendens; DE, Aorta descendens; AB, Aorta abdominalis; PLQ, Plaque.

In der anschließenden Rückwärtselimination wurden von den 17 ursprünglichen Parametern die folgenden 13 sukzessiv ausgeschlossen: 1. Diabetes mellitus, 2. BMI (P=0,767), 3. AB In S1PR2 (P=0,642), 4. DE In S1PR2 (P=0,306), 5. AB In S1PR1 (P=0,253), 6. AS In S1PR2 (P=0,332), 7. AS PLQ (P=0,182), 8. DE PLQ (P=0,468), 9. arterieller Hypertonus (P=0,173), 10. AS In S1PR3 (P=0,137), 11. AB In S1PR3 (P=0,110), 12. AS In S1PR1 (P=0,116), 13. DE In S1PR1 (P=0,153).

Das finale Regressionsmodell beinhaltetete noch das Alter, das männliche Geschlecht, einen pathologischen Nierenstatus und die Expression des S1PR3 in der Aorta descendens als signifikante Einflussvariablen, während die Expression des S1PR1 in der Aorta ascendens bzw. Aorta descendens in dem Verfahren ausgeschlossen wurden (s. Tab. 19).



Variable	OR	95% KI	P-Wert
Alter	1,079	1,038; 1,128	<0,001***
Geschlecht: männlich	5,722	1,772; 22,054	0,006**
pathologischer Nierenstatus	5,295	1,597; 19,909	0,009**
DE In S1PR3	0,401	0,173; 0,852	0,023*

**Tab. 19: Finales Regressionsmodell nach Rückwärtselimination für signifikante Einflussvariablen für das Vorkommen von Plaque in der Aorta abdominalis.** Unter Berücksichtigung aller unabhängigen Variablen wurde eine logistische Regressionsanalyse mit anschließender Rückwärtselimination für die diskrete, abhängige Variable „Plaque in der AB“ durchgeführt. Angegeben sind die Odds-Ratio (OR), 95% Konfidenzintervalle (KI) und die P-Werte, wobei \*P<0,05, \*\*P<0,01 und \*\*\*P<0,001. DE, Aorta descendens.

#### 4.3.4 Plaquescore der Gesamtaorta

Zuletzt wurde ein Modell erstellt, in dem die Plaquebelastung der gesamten Aorta untersucht wurde. Hierzu wurde, basierend auf den Plaqueausprägungen der drei Aortenabschnitte, für jede Person der Gesamtkohorte ein individueller Plaquescore (0-6) der Aorta erstellt (s. 3.1.2, Tab. 4, S. 18). Unter Berücksichtigung aller unabhängigen Variablen wurde dann eine lineare Regressionsanalyse für die metrische Variable „Plaquebelastung“ durchgeführt. Dabei wurde gefunden, dass erhöhtes Alter sowie eine erhöhte Expression des S1PR2 in der Aorta ascendens bzw. eine verringerte Expression des S1PR1 in der Aorta abdominalis die Plaquebelastung der Aorta signifikant fördern (s. Tab. 20).

## Ergebnisse

Variable	Koeffizient	95% KI	P-Wert
<b>Alter</b>	0,044	0,026; 0,063	<0,001***
<b>AS In S1PR2</b>	0,537	0,063; 1,011	0,027*
<b>AB In S1PR1</b>	-0,477	-0,928; -0,026	0,038*
<b>AB In S1PR2</b>	0,462	-0,006; 0,931	0,053
<b>arterieller Hypertonus</b>	0,587	-0,153; 1,326	0,119
<b>pathologischer Nierenstatus</b>	0,505	-0,157; 1,167	0,133
<b>AS In S1PR1</b>	-0,279	-0,712; 0,154	0,204
<b>DE In S1PR3</b>	-0,315	-0,832; 0,201	0,229
<b>Diabetes mellitus</b>	0,462	-0,505; 1,429	0,346
<b>Geschlecht: männlich</b>	0,264	-0,292; 0,820	0,349
<b>BMI</b>	-0,011	-0,049; 0,027	0,580
<b>DE In S1PR1</b>	0,114	-0,330; 0,558	0,612
<b>DE In S1PR2</b>	-0,107	-0,614; 0,399	0,675
<b>AB In S1PR3</b>	-0,071	-0,571; 0,429	0,778
<b>AS In S1PR3</b>	0,009	-0,489; 0,507	0,971

**Tab. 20: Regressionsanalyse, um signifikante Einflussvariablen auf die Plaquebelastung der gesamten Aorta zu identifizieren.** Unter Berücksichtigung aller unabhängigen Variablen wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt für die metrische, abhängige Variable „Plaquebelastung der gesamten Aorta“. Angegeben sind die Odds-Ratio (OR), 95% Konfidenzintervalle (KI) und die P-Werte, wobei \*P<0,05 und \*\*\*P<0,001. AS, Aorta ascendens; DE, Aorta descendens; AB, Aorta abdominalis.

In der anschließenden Rückwärtselimination wurden von den 15 ursprünglichen Parametern die folgenden 10 sukzessiv ausgeschlossen: 1. AS In S1PR3 (P=0,971), 2. AB In S1PR3 (P=0,777), 3. DE In S1PR2 (P=0,685), 4. DE In S1PR1 (P=0,741), 5. BMI (P=0,574), 6. Diabetes mellitus (P=0,314), 7. AS In S1PR1 (P=0,308), 8. Geschlecht: männlich (P=0,179), 9. pathologischer Nierenstatus (P=0,085), 10. DE In S1PR3 (P=0,087). Das finale Regressionsmodell beinhaltet noch das Alter, die Expression des S1PR1 in der Aorta abdominalis sowie die S1PR2-Expression in der Aorta ascendens. Hinzugekommene Faktoren sind die Expression des S1PR2 in der Aorta abdominalis (wobei eine erhöhte Expression die Plaquebelastung begünstigt) sowie der arterielle Hypertonus (s. Tab. 21).

## Ergebnisse

Variable	Koeffizient	95% KI	P-Wert
<b>Alter</b>	0,053	0,039; 0,067	<0,001***
<b>AB In S1PR1</b>	-0,485	-0,868; -0,103	0,013*
<b>AB In S1PR2</b>	0,458	0,069; 0,847	0,022*
<b>AS In S1PR2</b>	0,325	0,044; 0,606	0,024*
<b>arterieller Hypertonus</b>	0,743	0,077; 1,409	0,029*

**Tab. 21: Finales Regressionsmodell nach Rückwärtselimination für signifikante Einflussvariablen für die Plaquebelastung der gesamten Aorta.** Unter Berücksichtigung aller unabhängigen Variablen wurde eine lineare Regressionsanalyse mit anschließender Rückwärtselimination für die diskrete, abhängige Variable „Plaquebelastung der gesamten Aorta“ durchgeführt. Angegeben sind die Koeffizienten, 95% Konfidenzintervalle (KI) und die P-Werte, wobei \*P<0,05 und \*\*\*P<0,001. AS, Aorta ascendens, AB, Aorta abdominalis.

## 5 Diskussion

S1P ist ein bioaktives Sphingolipid und agiert mit seinen ubiquitär im Organismus vorkommenden S1P-Rezeptoren (S1PR) als Regulator von vielen physiologischen und pathophysiologischen Reaktionen [41]. Auch im Prozess der Atherosklerose scheinen S1P und seine Rezeptoren eine Rolle zu spielen [41, 49, 92], wobei je nach betroffenem Rezeptor und Zelltyp sowohl pro- als auch antiatherogene Effekte beschrieben wurden [83, 92, 96, 104]. Diese Erkenntnisse basieren dabei vornehmlich auf Versuchen mit Tieren und Zellen. Inwieweit S1P und seine Rezeptoren die Atherosklerose im Menschen regulieren, ist bisher nicht bekannt. Auf Grund dessen wurde in dieser Arbeit die Expression des S1PR1, S1PR2 und S1PR3 in humanen Gewebeproben der Aorta ascendens, Aorta descendens und Aorta abdominalis bestimmt. Ziel war es, das Expressionsmuster der Rezeptoren auf mögliche Unterschiede innerhalb der drei Aortenabschnitte sowie im Hinblick auf die Ausbildung der Atherosklerose zu analysieren.

### 5.1 Beschreibung der Studienkohorte

Die epidemiologisch erhobenen Daten der ausgewählten Studienkohorte, wie Angaben zum BMI, zu Diabetes mellitus, arteriellem Hypertonus und pathologischem Nierenstatus, werden im Folgenden auf ihre Validität diskutiert. Der durchschnittliche BMI der Probanden betrug 26,9 kg/m<sup>2</sup>. Dies deckt sich annähernd mit Daten der Gesamtbevölkerung aus dem Jahr 2013 - hier lag der durchschnittliche BMI bei 25,9 kg/m<sup>2</sup> [113]. Ergebnisse einer Studie (DEGS1) des Robert-Koch-Instituts zeigen, dass bei 7,2% der Erwachsenen im Alter von 18-79 Jahren jemals ein Diabetes mellitus diagnostiziert wurde [114]. Vor dem Hintergrund, dass in dieser Arbeit auch Probanden >79 Jahre berücksichtigt wurden und die Prävalenz des Diabetes mellitus im Alter proportional ansteigt, scheint dessen Häufigkeit von 11,2% in der Gesamtkohorte den Status der deutschen Gesamtbevölkerung widerzuspiegeln [114, 115]. Die in den Sektionsprotokollen aufgeführten Angaben bezüglich eines arteriellen Hypertonus der Probanden müssen hingegen kritisch hinterfragt werden. Von den 116 Probanden, die im Mittelwert 58,7 Jahre alt waren, litten den Protokollen zu Folge lediglich 16,4% an einem bekannten arteriellen Hypertonus. Neuhauser *et al.* konnten in einer Langzeitstudie in Deutschland zeigen, dass jeder dritte Erwachsene an einer arteriellen Hypertonie leidet und in der Altersgruppe der 70- bis 79-Jährigen sogar drei von vier Erwachsenen [116]. Somit kann vermutet werden, dass mit großer Wahrscheinlichkeit eine höhere Anzahl der Probanden an einem arteriellen Hypertonus litt, dies jedoch nicht im Sektionsprotokoll vermerkt war. Der Tatsache geschuldet, dass in dieser Arbeit jegliche Normabweichung der Niere (z.B. Niereninsuffizienz, Schrumpfniere, Nierenzysten) als „pathologischer Nierenstatus“ zusammengefasst wurde, erklärt die relativ hohe Prävalenz

von 46,6% in der Gesamtkohorte. Auf Grund dieser vorgenommenen Klassifizierung wird auf einen Vergleich zu Daten der einzelnen Nierenpathologien in der deutschen Gesamtbevölkerung verzichtet.

Zu den Risikofaktoren für die Entstehung einer Atherosklerose zählen neben steigendem Lebensalter, männlichem Geschlecht und einem Übergewicht auch Erkrankungen wie die arterielle Hypertonie und der Diabetes mellitus [20]. Nach Einteilung in Kontroll- (n=38) und Plaquegruppe (n=78) wurde gefunden, dass Probanden der Plaquegruppe älter waren, einen höheren BMI hatten und vermehrt unter Begleiterkrankungen (arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus, pathologischer Nierenstatus) litten. Das männliche Geschlecht als Risikofaktor für ein vermehrtes Vorkommen von Plaque konnte nicht bestätigt werden (s. Tab. 11, S. 27). Auch nach der Einteilung der Aortenabschnitte in plaque-positive und plaque-negative Gruppen zeigte sich, dass Probanden in den plaque-positiven Gruppen mehr Komorbiditäten aufwiesen. Dies war insbesondere für die Aorta abdominalis der Fall. Hier waren Probanden mit Plaque älter, litten häufiger an arteriellem Hypertonus, Diabetes mellitus und hatten einen auffälligeren Nierenstatus (s. Tab. 12, S. 28). Somit ist es wahrscheinlich, dass die Unterschiede zwischen der Kontroll- und Plaquegruppe vornehmlich auf Veränderungen in der Aorta abdominalis zurückzuführen sind: So waren Probanden der Plaquegruppe zu 29,5% in der Aorta ascendens, zu 55,1% in der Aorta descendens und zu 83,3% in der Aorta abdominalis von Plaque betroffen (s. Abb. 7, S. 27). Dass in der Aorta abdominalis, als Prädilektionsstelle, die Atherosklerose im Alter zunimmt, konnte bereits in mehreren Studien mit Hilfe von multimodaler Bildgebung gezeigt werden [117, 118].

### **5.2 Expressionsunterschiede der S1P-Rezeptoren zwischen den einzelnen Aortenabschnitten**

Die Expressionsdaten haben gezeigt, dass in der Aorta abdominalis sowohl der S1PR1 als auch der S1PR3 im Vergleich zur Aorta ascendens und Aorta descendens höher exprimiert waren (s. Abb. 9, S. 30). Dies konnte für die Gesamtkohorte und die Plaquegruppe nachgewiesen werden. Gleiches war aber auch in der Kontrollgruppe für die S1PR3-Expression signifikant und für die S1PR1-Expression im Trend ersichtlich. Die S1PR2-Expression hingegen unterschied sich in den drei analysierten Gruppen zwischen den Aortenabschnitten nicht. Vergleichbare Studien mit Aortenproben konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Shimizu *et al.* untersuchten die Expression der S1P-Rezeptoren in der A. carotis und A. iliaca. Dabei fiel auf, dass sowohl in murinen als auch in humanen Aa. iliaca der S1PR3 im Vergleich zur A. carotis signifikant höher exprimiert wurde [105]. Vor dem Hintergrund, dass die glatten Muskelzellen (GMZ) der Aorta abdominalis und A. iliaca ihren embryonalen Ursprung im splanchnischen Mesoderm

finden und die Aorta ascendens und A. carotis von der Neuralleiste abstammen [119], könnte die höhere Expression des S1PR1 und S1PR3 in der Aorta abdominalis in einer unterschiedlichen embryonalen Vaskulogenese der verschiedenen Aortenabschnitte liegen. Da sowohl in dieser als auch in der Arbeit von Shimzu *et al.* ausschließlich Vollwandproben analysiert wurden, können jedoch keine genaueren Rückschlüsse auf den dominierenden S1PR-exprimierenden Zelltypen gezogen werden. Genauso denkbar wäre, dass die höhere Expression des S1PR1 und S1PR3 in der Aorta abdominalis durch die Expression im Endothel oder in der Adventitia verursacht wird.

Darüber hinaus könnten auch lokale Faktoren, wie spezifische Blutflussbedingungen, für die unterschiedlichen Expressionsmuster verantwortlich sein [32]. Die Blutströmung erzeugt Schubspannungen, welche direkt auf die Gefäßwände wirken. Dabei wird zwischen laminaren und turbulenten Strömungen unterschieden. Turbulente Strömungen entstehen an Biegungen (z.B. Arcus aortae), Verzweigungen und Bifurkationen, wohingegen laminare Strömungen in geraden Gefäßabschnitten ohne Verzweigungen zu finden sind (z.B. Aorta descendens) [120]. In der Aorta descendens konnten Jung *et al.* zeigen, dass der S1PR1 auf der Plasmamembran des Endothels exprimiert wird, wohingegen in Bereichen mit turbulenten Strömungen (kleine Krümmung des Arcus aortae) der S1PR1 internalisiert und in endozytotischen Vesikeln lokalisiert war [121]. Somit könnte die Expression im Endothel eine entscheidende Rolle spielen. Im Endothel kommen dem S1PR1 nämlich vorrangig protektive Effekte zu, indem mitunter die endotheliale Barriere verstärkt wird [61]. Hierzu würde passen, dass die Aorta descendens weniger von Plaque betroffen war als die Aorta abdominalis, in der eher turbulente Strömungen vorherrschen [122]. Warum jedoch der S1PR1 und S1PR3 in der Aorta abdominalis stärker exprimiert wird (s. Abb. 9, S. 30), kann an dieser Stelle nicht geklärt werden und deutet darauf hin, dass womöglich nicht nur ein Zelltyp für die Expressionsunterschiede verantwortlich ist. Des Weiteren ist durchaus denkbar, dass sich die Expression mit Zunahme von Atherosklerose verändert bzw. eine veränderte Expression die Atherosklerose bedingt. Der Einfluss der einzelnen S1P-Rezeptoren auf die Atherosklerose wird im weiteren Verlauf diskutiert (s. 5.4, ab S. 50).

### **5.3 Wechselbeziehungen der S1P-Rezeptorexpression in der Kontrollgruppe**

Mit den Untersuchungen der S1P-Rezeptorexpression in der Kontrollgruppe sollte analysiert werden, ob in Gefäßen die Expression eines S1P-Rezeptors an die eines anderen gekoppelt ist und ob die Expression eines S1P-Rezeptors in einem Aortenabschnitt mit der in einem anderen Aortensegment korreliert. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass sowohl die Expression des S1PR1 als auch des S1PR2 und S1PR3 zwischen den drei Aortenabschnitten positiv korreliert waren (s. Abb. 11, S. 33). Somit ging

beispielsweise eine erhöhte Expression des S1PR1 in der Aorta ascendens auch mit einer erhöhten Expression in der Aorta descendens und Aorta abdominalis einher. Auf Grund der Tatsache, dass die S1P-Rezeptoren im Gefäßsystem ubiquitär exprimiert werden, wäre ein denkbare Szenario, dass die einzelnen S1P-Rezeptoren in der Aorta systemischen Regulationsmechanismen unterliegen könnten. Dem gegenüber könnte innerhalb der einzelnen Abschnitte die Expression der drei S1P-Rezeptoren aber auch durch lokale Regulationsmechanismen gesteuert werden. Interessanterweise fanden sich nämlich positive Korrelationen für die eher antagonistisch wirkenden S1PR1 und S1PR2 in allen drei Aortenabschnitten (s. Abb. 10 A1, B1, C1, S. 32). Laut aktuellem Wissensstand bewirkt S1PR1 die Migration und Proliferation von Endothelzellen (EZ) und stärkt die endotheliale Barriere, wohingegen S1PR2 die endotheliale Barriere schwächt, antimigratorisch und antiproliferativ wirkt (s. auch Tab. 1, S. 16) [61, 92, 123]. Somit könnte die positive Korrelation dieser primär antagonistisch wirkenden Rezeptoren darauf hindeuten, dass sie für ein physiologisches Gleichgewicht der S1P-vermittelten Funktionen sorgen. Eine ähnliche Erklärung wäre auch für die positive Korrelation zwischen der Expression des S1PR1 und S1PR3 in der Aorta descendens denkbar (s. Abb. 10 B2, S. 32): Der S1PR3 wirkt bezüglich der endothelialen Barriere ähnlich wie der S1PR2, indem er diese hemmt und damit konträr zum S1PR1 funktioniert [99-101]. In Bezug auf die EZ können der S1PR2 und der S1PR3 aber auch antagonistische Funktionen ausüben. Während der S1PR3 das Überleben von EZ fördert [65], wirkt der S1PR2 proapoptotisch auf diese Zellen [61]. Dementsprechend würde eine erhöhte S1PR3-Expression und eine verminderte S1PR2-Expression die EZ schützen. Eine negative Korrelation zwischen der S1PR2- und S1PR3-Expression konnte in der Aorta abdominalis tatsächlich gezeigt werden (s. Abb. 10 C3, S. 32). Wie bereits weiter oben erwähnt, wurden in dieser Arbeit allerdings ausschließlich Vollwandproben verwendet, so dass die Frage offen bleibt, inwieweit EZ zur gemessenen Expression der einzelnen S1P-Rezeptoren tatsächlich beigetragen haben.

#### **5.4 Veränderungen der S1P-Rezeptorexpression bei Atherosklerose**

Im Folgenden wird die S1P-Rezeptorexpression im Hinblick auf die Risikofaktoren und auf das Vorkommen von Plaque diskutiert. Für die Probanden der Gesamtkohorte konnten keine Unterschiede in der S1P-Rezeptorexpression hinsichtlich des Geschlechts, pathologischem Nierenstatus und arteriellem Hypertonus festgestellt werden. Allerdings war die S1PR3-Expression bei Diabetikern und Probanden mit einem BMI >25 kg/m<sup>2</sup> in der Aorta abdominalis erniedrigt (s. Tab. 13, S. 34). Neben einer verringerten S1PR3-Expression bei Diabetikern scheint auch das Alter eine Rolle zu spielen, da mit zunehmenden Alter eine verringerte S1PR3-Expression sowohl in der Aorta descendens als auch in der Aorta abdominalis nachgewiesen werden konnte (s. Tab. 13, S. 34 und

Abb. 12, S. 34). Da mit steigendem Alter und bei Diabetikern auch das Vorkommen der Atherosklerose steigt [20], wurden Regressionsanalysen durchgeführt (s. 4.3, ab S. 39). Mittels dieser Regressionsanalysen wurde getestet, welche Parameter das Vorkommen der Atherosklerose beeinflussen. Die Ergebnisse dieser Regressionsanalysen werden im weiteren Verlauf diskutiert (s. 5.4.1, ab S. 51). Ein Vergleich der S1PR3-Expression zwischen der Plaque- und Kontrollgruppe ergab tatsächlich, dass die S1PR3-Expression in der Aorta descendens und Aorta abdominalis der Plaquegruppe niedriger war (s. Abb. 13 C2 und C3, S. 35). Diese Beobachtungen konnten mitunter auch in der abschnittspezifischen Plaqueeinteilung der Gesamtkohorte bestätigt werden. Personen mit Plaque in der Aorta abdominalis wiesen nämlich gegenüber Personen ohne Plaque in der Aorta abdominalis eine geringere S1PR3-Expression auf (s. Abb. 14 C3, S. 36).

Wie bereits erwähnt, wurden bislang keine Studien publiziert, die sich mit dem Expressionsmuster der S1P-Rezeptoren in der humanen Aorta beschäftigten und damit direkt mit dieser Arbeit hätten verglichen werden können. Qu *et al.* untersuchten mittels Western-Blot- und immunhistochemischen Analysen humane Proben von abdominalen Aneurysmen (n=40) und verglichen diese mit Aortenproben einer Kontrollgruppe (n=20) [124]. Hierbei fiel auf, dass die Aneurysmaproben eine geringere S1PR2- und höhere S1PR3-Expression im Vergleich zu den Kontrollen aufwiesen, wobei die S1PR3-Expression in den Kontrollproben kaum zu detektieren war [124]. Während sich die geringere S1PR2-Expression in den Aneurysmaproben mit der verminderten S1PR2-Expression in der atherosklerotisch veränderten Aorta abdominalis deckt (s. Abb. 14 C2, S. 36), steht die höhere S1PR3-Expression in den Aneurysmaproben im Gegensatz zu den Untersuchungen in dieser Arbeit (s. Abb. 14 C3, S. 36). Die Expression des S1PR1 konnten Qu *et al.* überhaupt nicht detektieren [124]. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten darauf basieren, dass Qu *et al.* vor der Bestimmung der S1P-Rezeptorexpression die Tunica intima der Gewebeproben entfernten und somit vorrangig die Tunica media betrachteten. Eine weitere Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte in den ungleichen Untersuchungsmethoden liegen, da die Ergebnisse dieser Arbeit auf qPCR-Analysen beruhen.

#### **5.4.1 Einfluss der S1P-Rezeptorexpression und klinischen Parameter auf Atherosklerose**

Um einen potentiellen Einfluss der S1P-Rezeptoren auf die Entstehung von Plaque nachzuweisen, wurde für jeden Aortenabschnitt sowie die Gesamtaorta eine multivariate Regressionsanalyse unter Berücksichtigung der S1P-Rezeptorexpression, klinischer Parameter (Alter, Geschlecht, BMI) und Komorbiditäten (u.a. Risikofaktoren) durchgeführt (s. 4.3, ab S. 39). Die multivariate Regressionsanalyse für die Aorta ascendens ergab zum



einen, dass das Vorhandensein von Plaque in der Aorta descendens das Risiko für die Entstehung von Plaque deutlich erhöht und zum anderen, dass die S1PR3-Expression in der Aorta abdominalis dies ebenfalls beeinflussen kann (s. Tab. 15, S. 41). Je stärker der S1PR3 in der Aorta abdominalis exprimiert wird, desto geringer ist das Risiko für die Entstehung von Plaque in der Aorta ascendens. Die Regressionsanalyse für die Aorta descendens ergab, dass auch Plaque in der Aorta ascendens das Risiko für die Entstehung von Plaque in der Aorta descendens deutlich erhöht. Es könnte somit vermutet werden, dass diesen benachbarten Abschnitten (AS/DE) gemeinsame pathologische Prozesse zugrunde liegen. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass mit steigendem Alter das Risiko für die Entstehung von Plaque in der Aorta descendens steigt (s. Tab. 17, S. 42). Das Risiko für die Entstehung von Plaque in der Aorta abdominalis steigt ebenfalls mit zunehmendem Alter, mit einem pathologischen Nierenstatus und mit dem männlichen Geschlecht. Interessanterweise beeinflusst in der Aorta abdominalis ebenfalls die S1PR3-Expression in einem anderen Aortenabschnitt das Risiko für die Entstehung von Plaque. Eine höhere S1PR3-Expression in der Aorta descendens geht nämlich mit einem geringeren Risiko für die Entstehung von Plaque in der Aorta abdominalis einher. Diese Ergebnisse suggerieren, dass dem S1PR3 potentiell systemische Effekte zugeschrieben werden könnten und im Prozess der Atherosklerose herunterreguliert werden könnte. Interessant ist ebenfalls, dass bei Probanden mit Plaque in der Aorta abdominalis gezeigt werden konnte, dass die S1PR3-Expression in der Aorta descendens bereits geringer war, obwohl die Aorta descendens frei von Plaque war (s. Abb. 15 C2, S. 38). Somit wäre denkbar, dass eine niedrige S1PR3-Expression in plaque-negativen Abschnitten auf Atherosklerose in anderen Abschnitten hinweist (systemischer Effekt). Eine negative Korrelation zwischen der S1PR3-Expression und dem Plaquevorkommen könnte auf antiatherogene Eigenschaften des S1PR3 hindeuten. Laut aktuellem Wissenstand kann dem S1PR3 aber keine klare Rolle im Prozess der Atherosklerose zugeordnet werden. Versuche von Keul *et al.* zeigten, dass sich die Größe von atherosklerotischen Läsionen in ApoE-S1PR3-Doppelknockout-Mäusen verglichen mit ApoE-KO-Mäusen nicht unterscheidet, obwohl es zu einer drastischen Reduktion von Monozyten und Makrophagen in der Läsion kam [104]. Neben dem promigratorischen Einfluss des S1PR3 auf Makrophagen, scheint er ebenfalls promigratorisch auf GMZ zu wirken sowie die Intimahyperplasie zu beeinflussen [105]. Es wurden unterschiedliche Versuche durchgeführt, in denen Läsionen der Gefäßwand in S1PR3-defizienten-Mäusen untersucht wurden. Je nach Verletzungsmodell wurden dabei gegensätzliche Effekte beschrieben: Nach Ligatur der A. carotis zeigten S1PR3-defiziente Mäuse eine stärkere Neointimabildung [104, 105], wohingegen nach Denudation der Iliofemoralarterie kleinere neointimale Läsionen im Vergleich zu den Kontrollen nachgewiesen wurden [105]. In

weiteren Versuchen wurden dem S1PR3 antiatherogene Wirkungen auf das Endothel zugeschrieben. S1P kommt im Plasma hauptsächlich an HDL bzw. Albumin gebunden vor [49]. Der S1PR3 auf EZ vermag hierbei über an HDL-gebundenes S1P die eNOS zu aktivieren, woraufhin es zu einer Vasodilatation kommt. In *in vitro* Versuchen von Nofer *et al.* mit murinen Aorten konnte gezeigt werden, dass die vasodilatorischen Effekte von HDL bei den S1PR3-KO-Mäusen bis zu 60% reduziert waren [55]. Keul *et al.* zeigten zusätzlich, dass in ApoE-KO-Mäusen unter Behandlung mit FTY720 - neben einer geringeren Anzahl an Makrophagen und Kollagen in der atherosklerotischen Läsion - die Freisetzung des inflammatorischen Zytokins MCP-1 in GMZ über S1PR3 inhibiert wurde [104].

Im Gegensatz zu der Aorta descendens und Aorta abdominalis, war für die Aorta ascendens interessanterweise das Alter keine Einflussgröße für das Plaquevorkommen. Das könnte einerseits an der kleinen Anzahl der betroffenen Probanden gelegen haben, andererseits aber auch auf eine unterschiedliche Pathogenese der Plaquebildung zwischen den einzelnen Aortenabschnitten hindeuten. In einer Studie von Craiem *et al.* konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. Hier zeigte sich in der Aorta ascendens am seltensten Plaque, wobei sich dies mit zunehmendem Alter auch nur geringfügig änderte. In der Aorta descendens hingegen konnte eine erhebliche Zunahme von Plaque mit zunehmenden Alter festgestellt werden [125]. Majesky postulierte, dass das Auftreten von Atherosklerose in der Aorta abdominalis nicht nur in den dort vorherrschenden turbulenten Blutströmungen (Schubspannung) begründet liegt, sondern auch auf genetische Unterschiede der Gefäßwandzellen an verschiedenen Orten des Gefäßsystems beruht [119]. Diese Vermutung wird durch Versuche von Haimovici *et al.* unterstützt [126]. Dabei wurde Hunden in die Aorta descendens ein Teil der Aorta abdominalis (Allograft) und in die Aorta abdominalis ein Teil der Aorta descendens (Allograft) transplantiert. Nach einem Jahr atherogener Diät war das Aorta-descendens-Transplantat in der Aorta abdominalis läsionsfrei, wohingegen in dem Aorta-abdominalis-Transplantat in der Aorta descendens schwere Läsionen nachweisbar waren. Auch in dieser Arbeit war die Aorta abdominalis von allen Abschnitten am häufigsten von Atherosklerose betroffen. Während in unserer Studie 42,3% der Probanden der Plaquegruppe ausschließlich Plaque in der Aorta abdominalis aufwiesen, waren es in der Aorta descendens lediglich 9% und keiner der Probanden wies in der Aorta ascendens isoliert eine Plaque auf. Allerdings waren 48,7% der Probanden dieser Gruppe in mehr als einem Aortenabschnitt von Plaque betroffen (s. Abb. 7, S. 27), was wiederum zeigt, dass es sich bei der Atherosklerose um eine systemische Erkrankung handelt [127]. Auf Grund dessen wurde zusätzlich zu der isolierten Betrachtung der drei Aortenabschnitte auch eine Regressionsanalyse für die Gesamtaorta durchgeführt, um Einflussfaktoren auf die Atheroskleroselast zu identifizieren. Hierzu wurde jeder Person ein

individueller Plaquescore (0-6) zugeteilt, der sich aus der Summe der einzelnen Plaqueausprägungen (0,1,2) pro Aortenabschnitt zusammensetzt (s. 3.1.2, Tab. 4, S. 18). Diese Regressionsanalyse ergab, dass der Plaquescore neben dem Alter und arteriellem Hypertonus auch durch die S1PR1- und S1PR2-Expression beeinflusst wird (s. Tab. 21, S. 46). Während der Plaquescore mit zunehmender S1PR1-Expression in der Aorta abdominalis sinkt, steigt er mit der S1PR2-Expression in der Aorta ascendens bzw. Aorta abdominalis an. Die S1PR3-Expression hatte, im Gegensatz zu den vorherigen Regressionsanalysen (isolierte Betrachtung der drei Aortenabschnitte), keinen Einfluss auf den Plaquescore. Insgesamt lassen diese Ergebnisse vermuten, dass der S1PR1 antiatherogene und der S1PR2 proatherogene Effekte vermitteln könnte. Die Rolle der S1P-Rezeptoren im Prozess der Atherosklerose wurde auch in Mausmodellen untersucht. So wiesen Versuche von Galvani *et al.* ebenfalls auf eine potentielle antiatherogene Funktion des S1PR1 hin. In diesen Studien wurde gezeigt, dass ApoE-KO-Mäuse mit einem endothel-spezifischen S1PR1-KO unter fettreicher Ernährung verglichen mit der Kontrolle über höhere Level der proatherogenen Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 verfügen, mehr Makrophagen in atherosklerotischen Aortenläsionen aufwiesen und auch eine erhöhte Plaquebelastung in der Aorta descendens präsentierten [128]. Es wurde angenommen, dass der S1PR1 *in vivo* antiinflammatorisch wirkt und das Fortschreiten von Atherosklerose in Bereichen mit laminaren Blutflüssen inhibiert [128, 129]. Eine antiinflammatorische Wirkung des S1PR1 konnte auch in NOD-Mäusen (Non-Obese Diabetic) gezeigt werden. Diese Mäuse sind dadurch gekennzeichnet, dass sie einen spontanen Diabetes mellitus Typ I entwickeln. In der Aorta dieser Mäuse kam es nach Aktivierung des S1PR1 durch S1P zu einer verminderten Adhäsion von Monozyten an das Endothel [130], was bereits in *in vitro* Experimenten zuvor nachgewiesen werden konnte [131]. Der endotheliale S1PR1 ist für die Barrierefunktion von großer Bedeutung. Nach Aktivierung kommt es zur stärkeren Expression von Adhäsionsmolekülen (u.a. VE-Cadherin), wodurch die endothelialen Zell-Zell-Verbindungen verstärkt werden und die Gefäßpermeabilität sinkt. Auch die Versuche von Poti *et al.* deuten darauf hin, dass der S1PR1 antiatherogene Wirkungen vermittelt [82]. Poti *et al.* applizierten LDL-KO-Mäusen unter hochkalorischer Diät den S1PR1-Agonisten KRP-203. In Querschnitten der Aorta descendens und Aorta abdominalis dieser Mäuse zeigten sich deutlich kleinere atherosklerotische Läsionen verglichen mit den Kontrollen. Dabei fiel auf, dass sowohl die Anzahl der Makrophagen als auch die der T-Zellen in der Läsion vermindert waren, nicht jedoch die Anzahl der GMZ. In den KRP-203 behandelten Mäusen kam es neben einer Lymphozytopenie zu einer deutlichen Verminderung von Entzündungsmediatoren (TNF- $\alpha$ , RANTES), welche üblicherweise von Makrophagen und Lymphozyten sezerniert werden. In der Läsion konnte ebenfalls eine verminderte Expression dieser Entzündungsmediatoren

nachgewiesen werden. Parallel zeigten Poti *et al.* in *in vitro* Experimenten, dass KRP-203 neben einer Inhibition der Makrophagenaktivität auch einen Einfluss auf die EZ hat. KRP-203 führte zu einer verminderten Adhäsion von Monozyten ans Endothel und erniedrigte die endotheliale Permeabilität [82], was entscheidend für das geringere Ausmaß der atherosklerotischen Läsionen in den KRP-203 behandelten LDL-KO-Mäusen sein könnte. Auch Versuche mit FTY720 zeigten eine Beeinflussung auf das Ausmaß der atherosklerotischen Läsionen. FTY720 stellt in phosphorylierter Form (FTY720P) einen nicht-spezifischen Agonisten für den S1PR1, S1PR3, S1PR4 und S1PR5 dar [79, 132]. FTY720P koppelt an S1PR1 auf Lymphozyten und wirkt dort als funktioneller Antagonist, indem S1PR1 internalisiert und schließlich abgebaut wird [133]. Normalerweise wandern die Lymphozyten über den S1PR1 anhand eines S1P-Gradienten aus den lymphatischen Organen ins Blut aus, was aber durch den Einsatz von FTY720 vermindert wird [77, 134]. FTY720 führt somit zu einer peripheren Lymphozytopenie, was auch im entzündlichen Prozess der Atherosklerose eine Rolle spielen könnte. Sowohl in LDL-Rezeptor-KO-Mäusen [83] als auch in ApoE-KO-Mäusen [135] konnte bereits gezeigt werden, dass die Behandlung mit FTY720 bei hochkalorischer Ernährung zu kleineren atherosklerotischen Läsionen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen führte. Die Versuche von Nofer *et al.* mit LDL-Rezeptor-KO-Mäusen zeigten, dass es durch den Einsatz von FTY720 neben einer Lymphozytopenie auch zu einer verminderten Proliferation der Lymphozyten und zu einem Übergewicht von antiinflammatorischen Makrophagen kam [83]. Auf Grund der Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit Vollwandproben analysiert wurden, ist es nicht möglich, die Ergebnisse der Regressionsanalysen einem bestimmten Zelltypen zuzuordnen. Da jedoch sowohl *in vivo* als auch *in vitro* bereits gezeigt werden konnte, dass EZ den S1PR1 exprimieren [129] und der S1PR1 auf GMZ von adulten Mäusen nur äußerst schwach exprimiert wird [136], könnten die potentiell atheroprotektiven Effekte des S1PR1 auf dessen Expression im Endothel zurückzuführen sein. Dementsprechend wäre ein denkbare Szenario, dass die gesteigerte Expression des endothelialen S1PR1 die Adhäsion von Entzündungszellen hemmt sowie die endotheliale Barriere stärkt, so dass diese antiatherogenen Effekte für einen niedrigeren Plaquescore bei erhöhter Expression verantwortlich sein könnten (s. Tab. 21, S. 46).

Im Gegensatz zur S1PR1- korreliert die S1PR2-Expression in der Aorta ascendens und Aorta abdominalis mit einer erhöhten Plaquebelastung der Gesamtaorta (s. Tab. 21, S. 46), was auf eine proatherogene Wirkung des S1PR2 hindeuten könnte. Tatsächlich konnten Skoura *et al.* zeigen, dass im Vergleich zu ApoE-KO-Mäusen ApoE-S1PR2-Doppelknockout-Mäuse kleinere atherosklerotische Läsionen mit einer geringeren Anzahl von Makrophagen aufwiesen. Zusätzlich präsentierten diese Mäuse eine

verminderte Konzentration von inflammatorischen Zytokinen im Blutserum [96]. Auch Grimm *et al.* belegten in *in vivo* Versuchen mit Mäusen, dass eine selektive Inhibition von G<sub>12/13</sub> zu kleineren atherosklerotischen Läsionen führte und es zu einer gesteigerten Expression von antiinflammatorischen Genen in aortalen Makrophagen kam [85]. Ein Grund für die kleineren Läsionen in den S1PR2-defizienten Mäusen könnte primär auf die S1PR2-vermittelte Funktion der EZ zurückzuführen sein. Der S1PR2 wirkt in Bezug auf das Endothel antagonistisch zum S1PR1, indem es nach Aktivierung zu einer gesteigerten Gefäßpermeabilität [86] und zu einem proinflammatorischem Phänotyp des Endothels kommt [84]. In der vorliegenden Arbeit konnte für die Kontrollgruppe eine positive Korrelation der S1PR1- und S1PR2-Expression in allen Aortenabschnitten gefunden werden. Dies deutet einmal mehr darauf hin, dass in „gefäßgesunden“ Patienten der S1PR1 und S1PR2, durch die antagonistischen Wirkweisen, für ein physiologisches Gleichgewicht sorgen. Somit könnte die Abwesenheit von S1PR2 in S1PR2-KO-Mäusen dazu führen, dass die protektiven Effekte des S1PR1 im Endothel überwiegen, wodurch die Entwicklung der Atherosklerose aufgehalten wird. Bezogen auf Makrophagen zeigten *in vitro* Versuche von Michaud *et al.*, dass S1PR2 die Migration von Makrophagen inhibiert. In *in vivo* Versuchen fanden sie zusätzlich heraus, dass S1PR2 während einer Peritonitis die Makrophagenrekrutierung hemmt sowie die Akkumulation von Makrophagen negativ reguliert [109]. Ob die antiproliferativen und antimigratorischen Effekte des S1PR2 auf Makrophagen für eine pro- oder antiatherogene Wirkung des Rezeptors stehen, ist daher noch nicht vollständig verstanden. Ebenso wenig ist erforscht, inwiefern der S1PR2 die GMZ im Prozess der Atherosklerose beeinflusst. Bekannt ist, dass GMZ der Media adulter Mäuse S1PR2 exprimieren und der S1PR2 dabei antiproliferativ und antimigratorisch wirkt [92-94]. Zunächst scheint dies eine antiatherogene Wirkung inne zu haben, indem der Rezeptor einer Intimahyperplasie entgegenwirkt. Doch GMZ sind auch für die Stabilität der Plaque verantwortlich, indem sie eine fibrotische Kappe über dieser bilden [137]. Daher könnte S1PR2 auch proatherogen wirken, indem eine fehlende Migration und Proliferation für eine vulnerablere Plaque sorgen könnten.

## 5.5 Limitationen

In dieser Arbeit gibt es verschiedene Limitationen, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden sollten.

Die Gewebeproben wurden im Rahmen von Obduktionen gewonnen. Da die Dauer vom Eintritt des Todes bis zur eigentlichen Probenentnahme nicht konsequent identisch war, könnte die Qualität der Proben trotz festgelegter Kriterien variiert haben, so dass signifikante Unterschiede nicht gesehen werden konnten. Die Angaben aus den Sektionsprotokollen zum Gefäßstatus basieren auf der makroskopischen Einschätzung der Obduzenten und konnten nicht weiter überprüft werden. Da der Gefäßstatus daher rein subjektiv eingeschätzt wurde, ist von einer gewissen Varianz in der Beurteilung der Pathologien auszugehen. Somit könnten Proben falsch kategorisiert worden sein, wodurch signifikante Unterschiede verloren gegangen sein könnten. Ebenfalls ist nicht auszuschließen, dass Proben falsch kategorisiert worden sind, weil Erkrankungen in den Sektionsprotokollen nicht aufgeführt waren.

Bei der Klassifizierung der Proben der Aorta abdominalis wurde eine weiche Gefäßwand mit gelben Fetteinlagerungen als plaque-negativ gewertet, um ähnliche Gruppengrößen zu generieren (s. 3.1.2, ab S. 17). In der Aorta ascendens und Aorta descendens wurden diese Proben jedoch als plaque-positiv gekennzeichnet. Daraus ergab sich, dass Probanden mit einer als plaque-negativ klassifizierten Aorta abdominalis (n=51) bereits zu 58,8% (n=30) atherosklerotische Veränderungen in selbiger aufwiesen. In der Kontrollgruppe (n=38) war dies bei 44,7% der Probanden (n=17) der Fall. Es sollte somit berücksichtigt werden, dass diese Probanden zwar nicht frei von Atherosklerose in der Aorta abdominalis waren, der Grad der Ausprägung jedoch deutlich geringer war. Dennoch könnten durch diese Klassifizierung signifikante Unterschiede nicht festgestellt worden sein.

Um die S1P-Rezeptorexpression zu ermitteln, wurde zunächst aus den Gewebeproben die mRNA der S1P-Rezeptoren isoliert, in cDNA umgeschrieben und dann mittels qPCR analysiert. In dieser Arbeit wird davon ausgegangen, dass eine erhöhte mRNA-Expression der S1P-Rezeptoren mit einer erhöhten Funktion der S1P-Rezeptoren einhergeht. Da es sich bei den zu analysierenden Gewebeproben um Vollwand handelte, können die gemessenen S1P-Rezeptorexpressionen keinem Zelltypen zugeordnet werden.

## **6 Fazit und Ausblick**

Die vorliegende Arbeit erbringt erstmalig Erkenntnisse über das Expressionsmuster des S1PR1, S1PR2 und S1PR3 in humanen Vollwandproben der Aorta ascendens, Aorta descendens und Aorta abdominalis. Dabei wurden Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Aortenabschnitten gefunden, ebenso wie Veränderungen der Expression bestimmter S1P-Rezeptoren, die mit atherosklerotischen Gefäßveränderungen einhergehen. Diese Beobachtungen lassen zum einen vermuten, dass S1P unterschiedliche Funktionen in verschiedenen Abschnitten des Gefäßsystems ausübt und zum anderen, dass S1P Einfluss auf die Pathogenese der Atherosklerose nimmt. Somit wäre es vorstellbar, dass S1P-Rezeptoren Ziele für eine medikamentöse Intervention zur Behandlung von Gefäßpatienten darstellen. Dieses setzt allerdings voraus, dass die Funktionen der einzelnen S1P-Rezeptoren im Gefäßsystem genauer untersucht werden.

## 7 Zusammenfassung

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) ist ein bioaktives Sphingolipid, welches über Bindung an fünf G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren (S1PR1-5) zahlreiche physiologische und pathophysiologische Prozesse reguliert. Im Gefäßsystem werden der S1PR1, S1PR2 und S1PR3 exprimiert. Experimentelle Arbeiten an S1PR-KO-Mäusen lassen den Schluss zu, dass diese S1P-Rezeptoren bei der Pathogenese der Atherosklerose eine Rolle spielen. In dieser Arbeit wurde nun erstmalig das Expressionsmuster der S1P-Rezeptoren in der humanen Aorta einer größeren Studienkohorte untersucht, welche neben „gefäßgesunden“ auch „gefäßkranke“ Probanden aufwies. Dazu wurden Proben der Aorta ascendens (AS), Aorta descendens (DE) und Aorta abdominalis (AB) von 116 Verstorbenen asserviert, prozessiert und mittels qPCR hinsichtlich der Expression des S1PR1, S1PR2 und S1PR3 analysiert. Anhand der Sektionsprotokolle wurden die Gefäßproben als „gesund“ bzw. „erkrankt“ kategorisiert. So konnte eine Kontrollgruppe (n=38; keiner der drei Abschnitte war erkrankt) und eine Plaquegruppe (n=78; zumindest einer der drei Aortenabschnitte war erkrankt) miteinander verglichen werden. Zusätzlich wurde jedem Probanden ein individueller Plaquescore zugeschrieben, errechnet aus der Summe der einzelnen Plaqueausprägungen der drei Aortenabschnitte. Des Weiteren wurde für jeden der drei Aortenabschnitte eine eigene Kontrollgruppe sowie eine Plaquegruppe gebildet. Neben Vergleichen der einzelnen Gruppen, wurden auch Regressionsanalysen durchgeführt, um den Einfluss der einzelnen S1P-Rezeptoren sowie klinisch relevanter Parameter (z.B. Alter) auf das Vorkommen von Plaque zu untersuchen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass neben bekannten Risikofaktoren wie z.B. Alter oder arterieller Hypertonie auch die Expression bestimmter S1P-Rezeptoren signifikant mit Plaquevorkommen assoziiert war. So war die Gesamtbelastung der Aorta negativ mit der Expression des S1PR1 in der Aorta abdominalis assoziiert, korrelierte aber positiv mit der Expression des S1PR2 in der Aorta ascendens bzw. Aorta abdominalis. Daraus lässt sich die Theorie ableiten, dass der S1PR1 protektive Funktionen besitzt, während der S1PR2 proatherogen wirkt. Zudem wurde beobachtet, dass sich die einzelnen Aortenabschnitte in ihrem S1PR-Expressionsmuster unterscheiden, was bedeuten könnte, dass S1P gefäßspezifische Funktionen hat.

Insgesamt lassen die Ergebnisse dieser Arbeit den Schluss zu, dass die S1P-Rezeptoren eine Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose spielen und somit potentielle Ziele für pharmakologische Interventionen darstellen. Durch diese Maßnahmen könnte dem Beginn bzw. der Progression atherosklerotischer Gefäßveränderungen entgegengewirkt werden.



## 8 Summary

Sphingosine-1 phosphate is a bioactive sphingolipid regulating various physiological as well as pathophysiological processes by binding to five cognate G-protein coupled receptors (S1PR1-5). In the vascular system, S1PR1, S1PR2 and S1PR3 are expressed. By using knock out mice, it has been concluded that these S1P receptors play a role in the pathogenesis of atherosclerosis. This work is the first to investigate the expression pattern of aortic S1P receptors in a larger group of human subjects with or without vascular disease. Tissue samples from the ascending aorta, the descending aorta and the abdominal aorta were collected from deceased human beings and analyzed by qPCR for the expression of S1PR1, S1PR2 and S1PR3. According to autopsy records, samples were categorized into “healthy” and “diseased”, respectively. This way two groups were formed, a “control group” with no diseased aortic section (n=38) and a “plaque group” with at least one aortic section diseased (n=78). In addition, for every human subject, an individual plaque score was calculated by adding the scores for each individual aortic section. At least, two groups (healthy and diseased) were formed for each individual aortic section. Data analysis consisted of various group comparisons as well as regression analyses including clinical parameters such as age in order to determine the effect of S1P receptor expression on the presence of atherosclerotic plaques.

Besides known risk factors for atherosclerosis such as old age and hypertension, we also found significant associations between the expression of individual S1P receptors and plaque burden. Regarding total aortic plaque burden, a negative correlation was observed for the expression of S1PR1 in the abdominal aorta, while a positive correlation was found for the expression of S1PR2 in the ascending as well as abdominal aorta. From these observations, one may conclude that S1PR1 has protective effects while S1PR2 is proatherogenic. Moreover, the S1P receptor expression pattern differs between the three aortic sections investigated, suggesting S1P may have specific functions depending on the aortic section.

In summary, from this work may be concluded that S1P receptors play a role in regulating the pathogenesis of atherosclerosis and may therefore present potential targets for pharmacological interventions to inhibit the onset and/or progression of this disease.

## 9 Abkürzungsverzeichnis

AB	Aorta abdominalis
AC	Adenylatcyclase
ApoE	Apolipoprotein E
ApoM	Apolipoprotein M
AS	Aorta ascendens
BMI	Body-Mass-Index
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA
CoA	Coenzym A
COX-2	Cyclooxygenase-2
C <sub>T</sub>	cycle threshold
DE	Aorta descendens
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
EZ	Endothelzellen
FTY720P	phosphoryliertes Fingolimod
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G <sub>i</sub>	inhibitorisches G-Protein
GMZ	glatte Muskelzellen
HDL	High-Density Lipoprotein
HDL-S1P	High-Density Lipoprotein-gebundenes Sphingosin-1-Phosphat
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
KI	Konfidenzintervall
KO	Knockout
LDL	Low-Density Lipoprotein
MCP-1	Monozyten-Chemoattraktives Protein-1
MMP	Matrixmetalloproteasen
MMS	Mönckeberg'sche Mediasklerose
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
NO	Nitric Oxide (Stickstoffmonoxid)
NOD-Mäuse	Non-Obese Diabetic-Mäuse
OD	Optische Dichte
OR	Odds-Ratio
oxHDL	oxidiertes High-Density Lipoprotein

## Abkürzungsverzeichnis

---

oxLDL	oxidiertes Low-Density Lipoprotein
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLQ	Plaque
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
RANTES	Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed & Secreted
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1PR	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
SphK	Sphingosinkinase
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VE-Cadherin	Vascular Endothelial Cadherin
VLDL	Very-Low-Density Lipoprotein

## 10 Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt. Die 10 häufigsten Todesursachen - Sterbefälle insgesamt nach der ICD-10 im Jahr 2013. [Online im Internet] URL: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabelle/HaeufigsteTodesursachen.html> [Stand: 29.06.2015, 16:04]
2. Kortmann H. Aorta abdominalis. In: Luther B, Hrsg. Techniken der offenen Gefäßchirurgie: Standards, Taktiken, Tricks. 1. Auflage. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg. 2014;153-98.
3. Frick H, Leonhardt H, Strack D. Spezielle Anatomie II. 3. Auflage. Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York. 1987;470.
4. Aumüller G, Aust G, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayrhofer A, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spaniel-Borowski K, Wennemuth G, Wolff W, Wurzinger LJ, Zilch H-G. Duale Reihe Anatomie. 3. Auflage. Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York. 2014;152-154,863-867.
5. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K. Prometheus LernAtlas der Anatomie - Innere Organe. 3. Auflage. Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York. 2012;10-11,202-205.
6. Gasser TC, Ogden RW, Holzapfel GA. Hyperelastic modelling of arterial layers with distributed collagen fibre orientations. *Journal of The Royal Society Interface*. 2006;3(6):15-35.
7. Majesky MW, Dong XR, Hognlund V, Mahoney WM, Daum G. The Adventitia: A Dynamic Interface Containing Resident Progenitor Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2011;31(7):1530-9.
8. Debus ES, Torsello G, Schmitz-Rixen T, Flessenkämper I, Storck M, Wenk H, Grundmann RT. Ursachen und Risikofaktoren der Arteriosklerose. *Gefäßchirurgie*. 2013;18(6):544-50.
9. Sucker C, Lanzer P. Arteriosklerose und Mediasklerose. Eine Gegenüberstellung zweier kalzifizierender Gefäßerkrankungen. *Medizinische Klinik*. 2000;95(4):207-10.
10. Gotto AM, Jr. Evolving concepts of dyslipidemia, atherosclerosis, and cardiovascular disease: the Louis F. Bishop Lecture. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;46(7):1219-24.
11. World Health Organization. Classification of atherosclerotic lesions; report of a study group. *World Health Organization Technical Report Series*. 1958;57(143):1-20.
12. Weichel P. Topographie von Caveolae und Caveolin-1, -2 und -3 im Herz- und Skelettmuskel von Ratten. *Medizinische Dissertation*. Universität Münster. 2007;4-5.
13. Debus ES, Torsello G, Schmitz-Rixen T, Hupp T, Lang W, Noppeney T, Oberhuber A, Grundmann RT. Manifestationen und Prävention der Arteriosklerose. *Gefäßchirurgie*. 2013;18(7):644-51.
14. Kreuzer J, Tiefenbacher C. Atherosklerose - Taschenatlas spezial. 1. Auflage. Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York. 2003;62-100.

15. Schwartz BG, Kloner RA. Cardiovascular Implications of Erectile Dysfunction. *Circulation*. 2011;123(21):e609-11.
16. Chade AR, Lerman A, Lerman LO. Kidney in Early Atherosclerosis. *Hypertension*. 2005;45(6):1042-9.
17. Golledge J, Norman PE. Atherosclerosis and Abdominal Aortic Aneurysm: Cause, Response, or Common Risk Factors? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2010;30(6):1075-7.
18. Weigang E, Nienaber CA, Rehders TC, Ince Hs, Vahl C-F, Beyersdorf F. Management von Patienten mit Aortendissektion. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2008;105(38):639-45.
19. Munro JM, Cotran RS. The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. *Laboratory Investigation*. 1988;58(3):249-61.
20. Herold G, et al. *Innere Medizin 2014*. 1. Auflage. Gerd Herold: Köln. 2014;236-47.
21. McCully KS. Homocysteine and the pathogenesis of atherosclerosis. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 2015;8(2):211-9.
22. Latif F, Khalid MM, Khan F, Omar Z, Ali FA. Role of hyperphosphatemia-mediated vascular calcification in cardiovascular outcomes and its management: a review. *Journal of Cardiovascular Medicine (Hagerstown)*. 2013;14(6):410-5.
23. Mottillo S, Filion KB, Genest J, Joseph L, Pilote L, Poirier P, Rinfret S, Schiffrin EL, Eisenberg MJ. The Metabolic Syndrome and Cardiovascular Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010;56(14):1113-32.
24. Ross R, Glomset JA. The Pathogenesis of Atherosclerosis (first of two parts). *New England Journal of Medicine*. 1976;295(7):369-77.
25. Ross R, Glomset JA. The Pathogenesis of Atherosclerosis (second of two parts). *New England Journal of Medicine*. 1976;295(8):420-5.
26. Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. *The American Journal of Pathology*. 1977;86(3):675-84.
27. Gimbrone MA. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherosclerosis. *Thrombosis and Haemostasis*. 1999;82(2):722-6.
28. Resnick N, Yahav H, Schubert S, Wolfowitz E, Shay A. Signalling pathways in vascular endothelium activated by shear stress: relevance to atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology*. 2000;11(2):167-77.
29. Gimbrone MA, García-Cardeña G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circulation Research*. 2016;118(4):620-36.
30. Ross R. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. *New England Journal of Medicine*. 1999;340(2):115-26.
31. Yurdagul A, Finney AC, Woolard MD, Orr AW. The arterial microenvironment: the where and why of atherosclerosis. *Biochemical Journal*. 2016;473(10):1281-95.

32. Keul P. Die Rolle der Sphingosin-1-Phosphat Rezeptoren in der Pathogenese der Atherosklerose. Medizinische Dissertation. Universität Duisburg-Essen. 2010;1-17.
33. Allahverdian S, Pannu PS, Francis GA. Contribution of monocyte-derived macrophages and smooth muscle cells to arterial foam cell formation. *Cardiovascular Research*. 2012;95(2):165-72.
34. Raines E, Rosenfeld M, Ross R. The Role of Macrophages. In: Fuster V, Ross R, Topol EH, Hrsg. *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease*. 1. Auflage. Lippencott-Raven: Philadelphia. 1996;1:539-55.
35. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *Journal of Clinical Investigation*. 1994;94(6):2493-503.
36. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis: A Report From the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1995;92(5):1355-74.
37. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1994;89(5):2462-78.
38. Winkler MS, Nierhaus A, Holzmann M, Mudersbach E, Bauer A, Robbe L, Zahrte C, Geffken M, Peine S, Schwedhelm E, Daum G, Kluge S, Zoellner C. Decreased serum concentrations of sphingosine-1-phosphate in sepsis. *Critical Care*. 2015;19:372.
39. Futerman AH, Hannun YA. The complex life of simple sphingolipids. *EMBO reports*. 2004;5(8):777-82.
40. Spiegel S, Milstien S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2003;4(5):397-407.
41. Maceyka M, Harikumar KB, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends in Cell Biology*. 2012;22(1):50-60.
42. Kunkel GT, Maceyka M, Milstien S, Spiegel S. Targeting the sphingosine-1-phosphate axis in cancer, inflammation and beyond. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2013;12(9):688-702.
43. Moritz E, Wegner D, Gross S, Bahls M, Dorr M, Felix SB, Ittermann T, Oswald S, Nauck M, Friedrich N, Boger RH, Daum G, Schwedhelm E, Rauch BH. Reference intervals for serum sphingosine-1-phosphate in the population-based Study of Health in Pomerania. *Clinical Chimica Acta*. 2017;468:25-31.
44. Deutschman DH, Carstens JS, Klepper RL, Smith WS, Page MT, Young TR, Gleason LA, Nakajima N, Sabbadini RA. Predicting obstructive coronary artery disease with serum sphingosine-1-phosphate. *American Heart Journal*. 2003;146(1):62-8.
45. Sattler KJ, Elbasan S, Keul P, Elter-Schulz M, Bode C, Graler MH, Brocker-Preuss M, Budde T, Erbel R, Heusch G, Levkau B. Sphingosine 1-phosphate levels in plasma and HDL are altered in coronary artery disease. *Basic Research in Cardiology*. 2010;105(6):821-32.

46. Soltau I, Mudersbach E, Geissen M, Schwedhelm E, Winkler MS, Geffken M, Peine S, Schoen G, Debus ES, Larena-Avellaneda A, Daum G. Serum-Sphingosine-1-Phosphate Concentrations Are Inversely Associated with Atherosclerotic Diseases in Humans. *PLoS ONE*. 2016;11(12).
47. Olivera A, Allende ML, Proia RL. Shaping the landscape: metabolic regulation of S1P gradients. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013;1831(1):193-202.
48. Ito K, Anada Y, Tani M, Ikeda M, Sano T, Kihara A, Igarashi Y. Lack of sphingosine 1-phosphate-degrading enzymes in erythrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007;357(1):212-7.
49. Proia RL, Hla T. Emerging biology of sphingosine-1-phosphate: its role in pathogenesis and therapy. *Journal of Clinical Investigation*. 2015;125(4):1379-87.
50. Venkataraman K, Lee Y-M, Michaud J, Thangada S, Ai Y, Bonkovsky HL, Parikh NS, Habrukowich C, Hla T. Vascular Endothelium As a Contributor of Plasma Sphingosine 1-Phosphate. *Circulation Research*. 2008;102(6):669-76.
51. Blaho VA, Galvani S, Engelbrecht E, Liu C, Swendeman SL, Kono M, Proia RL, Steinman L, Han MH, Hla T. HDL-bound sphingosine-1-phosphate restrains lymphopoiesis and neuroinflammation. *Nature*. 2015;523(7560):342-6.
52. Sattler K, Levkau B. Sphingosine-1-phosphate as a mediator of high-density lipoprotein effects in cardiovascular protection. *Cardiovascular Research*. 2009;82(2):201-11.
53. Sattler K, Graler M, Keul P, Weske S, Reimann CM, Jindrova H, Kleinbongard P, Sabbadini R, Brocker-Preuss M, Erbel R, Heusch G, Levkau B. Defects of High-Density Lipoproteins in Coronary Artery Disease Caused by Low Sphingosine-1-Phosphate Content: Correction by Sphingosine-1-Phosphate-Loading. *Journal of the American College of Cardiology*. 2015;66(13):1470-85.
54. Levkau B. HDL-S1P: cardiovascular functions, disease-associated alterations, and therapeutic applications. *Frontiers in Pharmacology*. 2015;6(243):1-7.
55. Nofer JR, van der Giet M, Tolle M, Wolinska I, von Wnuck Lipinski K, Baba HA, Tietge UJ, Godecke A, Ishii I, Kleuser B, Schafers M, Fobker M, Zidek W, Assmann G, Chun J, Levkau B. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *Journal of Clinical Investigation*. 2004;113(4):569-81.
56. Kimura T, Tomura H, Mogi C, Kuwabara A, Damirin A, Ishizuka T, Sekiguchi A, Ishiwarra M, Im DS, Sato K, Murakami M, Okajima F. 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. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(49):37457-67.
57. Wilkerson BA, Grass GD, Wing SB, Argraves WS, Argraves KM. 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. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(53):44645-53.
58. Rivera J, Proia RL, Olivera A. The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2008;8(10):753-63.

59. Olivera A, Rosenfeldt HM, Bektas M, Wang F, Ishii I, Chun J, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine kinase type 1 induces G12/13-mediated stress fiber formation, yet promotes growth and survival independent of G protein-coupled receptors. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(47):46452-60.
60. Meyer zu Heringdorf D, Jakobs KH. Lysophospholipid receptors: Signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007;1768(4):923-40.
61. Blaho VA, Hla T. An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors. *Journal of Lipid Research*. 2014;55(8):1596-608.
62. Nagahashi M, Takabe K, Terracina KP, Soma D, Hirose Y, Kobayashi T, Matsuda Y, Wakai T. Sphingosine-1-Phosphate Transporters as Targets for Cancer Therapy. *BioMed Research International*. 2014;1-7.
63. Ishii I, Fukushima N, Ye X, Chun J. Lysophospholipid Receptors: Signaling and Biology. *Annual Review of Biochemistry*. 2004;73(1):321-54.
64. Brinkmann V. Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. *Pharmacology & Therapeutics*. 2007;115(1):84-105.
65. Takuwa Y, Du W, Qi X, Okamoto Y, Takuwa N, Yoshioka K. Roles of sphingosine-1-phosphate signaling in angiogenesis. *World Journal of Biological Chemistry*. 2010;1(10):298-306.
66. Camerer E, Regard JB, Cornelissen I, Srinivasan Y, Duong DN, Palmer D, Pham TH, Wong JS, Pappu R, Coughlin SR. Sphingosine-1-phosphate in the plasma compartment regulates basal and inflammation-induced vascular leak in mice. *Journal of Clinical Investigation*. 2009;119(7):1871-9.
67. Sammani S, Moreno-Vinasco L, Mirzapourzadeh T, Singleton PA, Chiang ET, Evenoski CL, Wang T, Mathew B, Husain A, Moitra J, Sun X, Nunez L, Jacobson JR, Dudek SM, Natarajan V, Garcia JG. Differential effects of sphingosine 1-phosphate receptors on airway and vascular barrier function in the murine lung. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2010;43(4):394-402.
68. Wang L, Sammani S, Moreno-Vinasco L, Letsiou E, Wang T, Camp SM, Bittman R, Garcia JG, Dudek SM. FTY720 (s)-phosphonate preserves sphingosine 1-phosphate receptor 1 expression and exhibits superior barrier protection to FTY720 in acute lung injury. *Critical Care Medicine*. 2014;42(3):e189-99.
69. Kimura T, Watanabe T, Sato K, Kon J, Tomura H, Tamama K, Kuwabara A, Kanda T, Kobayashi I, Ohta H, Ui M, Okajima F. Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of human endothelial cells possibly through the lipid receptors, Edg-1 and Edg-3. *Biochemical Journal*. 2000;348(Pt 1):71-6.
70. Allende ML, Yamashita T, Proia RL. G-protein-coupled receptor S1P1 acts within endothelial cells to regulate vascular maturation. *Blood*. 2003;102(10):3665-7.
71. Krump-Konvalinkova V, Yasuda S, Rubic T, Makarova N, Mages J, Erl W, Vosseler C, Kirkpatrick CJ, Tigyi G, Siess W. Stable knock-down of the sphingosine 1-phosphate receptor S1P1 influences multiple functions of human endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2005;25(3):546-52.



72. Liu Y, Wada R, Yamashita T, Mi Y, Deng CX, Hobson JP, Rosenfeldt HM, Nava VE, Chae SS, Lee MJ, Liu CH, Hla T, Spiegel S, Proia RL. Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *Journal of Clinical Investigation*. 2000;106(8):951-61.
73. Gaengel K, Niaudet C, Hagikura K, Lavina B, Muhl L, Hofmann JJ, Ebarasi L, Nystrom S, Rymo S, Chen LL, Pang MF, Jin Y, Raschperger E, Roswall P, Schulte D, Benedito R, Larsson J, Hellstrom M, Fuxe J, Uhlen P, Adams R, Jakobsson L, Majumdar A, Vestweber D, Uv A, Betsholtz C. The sphingosine-1-phosphate receptor S1PR1 restricts sprouting angiogenesis by regulating the interplay between VE-cadherin and VEGFR2. *Developmental Cell*. 2012;23(3):587-99.
74. Kwon Y-G, Min J-K, Kim K-M, Lee D-J, Billiar TR, Kim Y-M. Sphingosine 1-Phosphate Protects Human Umbilical Vein Endothelial Cells from Serum-deprived Apoptosis by Nitric Oxide Production. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(14):10627-33.
75. Tolle M, Klockl L, Wiedon A, Zidek W, van der Giet M, Schuchardt M. Regulation of endothelial nitric oxide synthase activation in endothelial cells by S1P1 and S1P3. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2016;476(4):627-34.
76. Sensken SC, Nagarajan M, Bode C, Graler MH. Local inactivation of sphingosine 1-phosphate in lymph nodes induces lymphopenia. *Journal of Immunology*. 2011;186(6):3432-40.
77. Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL, Cyster JG. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature*. 2004;427(6972):355-60.
78. Goetzl EJ, Liao JJ, Huang MC. Regulation of the roles of sphingosine 1-phosphate and its type 1 G protein-coupled receptor in T cell immunity and autoimmunity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2008;1781(9):503-7.
79. Cyster JG, Schwab SR. Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annual Review of Immunology*. 2012;30:69-94.
80. Brinkmann V, Cyster JG, Hla T. FTY720: sphingosine 1-phosphate receptor-1 in the control of lymphocyte egress and endothelial barrier function. *American Journal of Transplantation*. 2004;4(7):1019-25.
81. Roberts E, Guerrero M, Urbano M, Rosen H. Sphingosine 1-phosphate receptor agonists: a patent review (2010-2012). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2013;23(7):817-41.
82. Poti F, Gualtieri F, Sacchi S, Weissen-Plenz G, Varga G, Brodde M, Weber C, Simoni M, Nofer JR. KRP-203, sphingosine 1-phosphate receptor type 1 agonist, ameliorates atherosclerosis in LDL-R<sup>-/-</sup> mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2013;33(7):1505-12.
83. Nofer JR, Bot M, Brodde M, Taylor PJ, Salm P, Brinkmann V, van Berkel T, Assmann G, Biessen EA. FTY720, a synthetic sphingosine 1 phosphate analogue, inhibits development of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation*. 2007;115(4):501-8.

84. Zhang G, Yang L, Kim GS, Ryan K, Lu S, O'Donnell RK, Spokes K, Shapiro N, Aird WC, Kluk MJ, Yano K, Sanchez T. Critical role of sphingosine-1-phosphate receptor 2 (S1PR2) in acute vascular inflammation. *Blood*. 2013;122(3):443-55.
85. Grimm M, Tischner D, Troidl K, Albarran Juarez J, Sivaraj KK, Ferreiros Bouzas N, Geisslinger G, Binder CJ, Wettschureck N. S1P2/G12/13 Signaling Negatively Regulates Macrophage Activation and Indirectly Shapes the Atheroprotective B1-Cell Population. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2016;36(1):37-48.
86. Sanchez T, Skoura A, Wu MT, Casserly B, Harrington EO, Hla T. Induction of vascular permeability by the sphingosine-1-phosphate receptor-2 (S1P2R) and its downstream effectors ROCK and PTEN. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007;27(6):1312-8.
87. Park SW, Kim M, Brown KM, D'Agati VD, Lee HT. Inhibition of sphingosine 1-phosphate receptor 2 protects against renal ischemia-reperfusion injury. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2012;23(2):266-80.
88. Skoura A, Sanchez T, Claffey K, Mandala SM, Proia RL, Hla T. Essential role of sphingosine 1-phosphate receptor 2 in pathological angiogenesis of the mouse retina. *Journal of Clinical Investigation*. 2007;117(9):2506-16.
89. Lorenz JN, Arend LJ, Robitz R, Paul RJ, MacLennan AJ. Vascular dysfunction in S1P2 sphingosine 1-phosphate receptor knockout mice. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2007;292(1):R440-6.
90. Kimizuka K, Kawai Y, Maejima D, Ajima K, Kaidoh M, Ohhashi T. Sphingosine 1-phosphate (S1P) induces S1P2 receptor-dependent tonic contraction in murine iliac lymph vessels. *Microcirculation*. 2013;20(1):1-16.
91. Kono M, Belyantseva IA, Skoura A, Frolenkov GI, Starost MF, Dreier JL, Lidington D, Bolz SS, Friedman TB, Hla T, Proia RL. Deafness and stria vascularis defects in S1P2 receptor-null mice. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(14):10690-6.
92. Daum G, Grabski A, Reidy MA. Sphingosine 1-Phosphate: A Regulator of Arterial Lesions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2009;29(10):1439-43.
93. Wamhoff BR, Lynch KR, Macdonald TL, Owens GK. Sphingosine-1-phosphate receptor subtypes differentially regulate smooth muscle cell phenotype. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2008;28(8):1454-61.
94. Mack CP. Signaling mechanisms that regulate smooth muscle cell differentiation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2011;31(7):1495-505.
95. Shimizu T, Nakazawa T, Cho A, Dastvan F, Shilling D, Daum G, Reidy MA. Sphingosine 1-phosphate receptor 2 negatively regulates neointimal formation in mouse arteries. *Circulation Research*. 2007;101(10):995-1000.
96. Skoura A, Michaud J, Im DS, Thangada S, Xiong Y, Smith JD, Hla T. Sphingosine-1-phosphate receptor-2 function in myeloid cells regulates vascular inflammation and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2011;31(1):81-5.
97. Watters RJ, Wang H-G, Sung S-S, Loughran TP, Liu X. Targeting Sphingosine-1-Phosphate Receptors in Cancer. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2011;11(9):810-7.

98. Tolle M, Levkau B, Keul P, Brinkmann V, Giebing G, Schonfelder G, Schafers M, von Wnuck Lipinski K, Jankowski J, Jankowski V, Chun J, Zidek W, Van der Giet M. Immunomodulator FTY720 Induces eNOS-dependent arterial vasodilatation via the lysophospholipid receptor S1P3. *Circulation Research*. 2005;96(8):913-20.
99. Spiegel S, Milstien S. The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2011;11(6):403-15.
100. Marsolais D, Rosen H. Chemical modulators of sphingosine-1-phosphate receptors as barrier-oriented therapeutic molecules. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2009;8(4):297-307.
101. Rosen H, Gonzalez-Cabrera PJ, Sanna MG, Brown S. Sphingosine 1-phosphate receptor signaling. *Annual Review of Biochemistry*. 2009;78:743-68.
102. Peters SL, Alewijnse AE. Sphingosine-1-phosphate signaling in the cardiovascular system. *Current Opinion in Pharmacology*. 2007;7(2):186-92.
103. Nussbaum C, Bannenberg S, Keul P, Graler MH, Goncalves-de-Albuquerque CF, Korhonen H, von Wnuck Lipinski K, Heusch G, de Castro Faria Neto HC, Rohwedder I, Gothert JR, Prasad VP, Haufe G, Lange-Sperandio B, Offermanns S, Sperandio M, Levkau B. Sphingosine-1-phosphate receptor 3 promotes leukocyte rolling by mobilizing endothelial P-selectin. *Nature Communications*. 2015;6:6416.
104. Keul P, Lucke S, von Wnuck Lipinski K, Bode C, Graler M, Heusch G, Levkau B. Sphingosine-1-phosphate receptor 3 promotes recruitment of monocyte/macrophages in inflammation and atherosclerosis. *Circulation Research*. 2011;108(3):314-23.
105. Shimizu T, De Wispelaere A, Winkler M, D'Souza T, Caylor J, Chen L, Dastvan F, Deou J, Cho A, Larena-Avellaneda A, Reidy M, Daum G. Sphingosine-1-phosphate receptor 3 promotes neointimal hyperplasia in mouse iliac-femoral arteries. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2012;32(4):955-61.
106. Waeber C, Blondeau N, Salomone S. Vascular sphingosine-1-phosphate S1P1 and S1P3 receptors. *Drug News & Perspectives*. 2004;17(6):365-82.
107. Karupuchamy T, Behrens EH, Gonzalez-Cabrera P, Sarkisyan G, Gima L, Boyer JD, Bamias G, Jedlicka P, Veny M, Clark D, Peach R, Scott F, Rosen H, Rivera-Nieves J. Sphingosine-1-phosphate receptor-1 (S1P1) is expressed by lymphocytes, dendritic cells, and endothelium and modulated during inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunology*. 2016;10(1):162-71.
108. Hughes JE, Srinivasan S, Lynch KR, Proia RL, Ferdek P, Hedrick CC. Sphingosine-1-phosphate induces an antiinflammatory phenotype in macrophages. *Circulation Research*. 2008;102(8):950-8.
109. Michaud J, Im DS, Hla T. Inhibitory Role of Sphingosine 1-Phosphate Receptor 2 in Macrophage Recruitment during Inflammation. *Journal of Immunology*. 2010;184(3):1475-83.
110. Perkampus H-H. UV-VIS-Spektroskopie und ihre Anwendungen. 1. Auflage. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, Tokio. 1986;3-4.
111. Gallagher SR. Quantitation of DNA and RNA with Absorption and Fluorescence Spectroscopy. *Current Protocols in Neuroscience*. 2001;56:A.1K.1-14.

112. Pfaffl MW. Quantification strategies in real-time PCR. In: Bustin SA, Hrsg. A-Z of quantitative PCR. 1. Auflage. International University Line (IUL): La Jolla. 2004;87-112.
113. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Verteilung der Bevölkerung auf Body-Mass-Index-Gruppen in Prozent. 2013. [Online im Internet] URL: [http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/WS0100/\\_XWD\\_FORMPROC?TARGET=&PAGE=\\_XWD\\_2&OINDEX=1&HANDLER=XS\\_ROTATE\\_ADVANCED&DATACUBE=\\_XWD\\_30&D.000=PAGE&D.002=DOWN&D.003=PAGE&D.470=ACROSS](http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/WS0100/_XWD_FORMPROC?TARGET=&PAGE=_XWD_2&OINDEX=1&HANDLER=XS_ROTATE_ADVANCED&DATACUBE=_XWD_30&D.000=PAGE&D.002=DOWN&D.003=PAGE&D.470=ACROSS) [Stand: 23.08.2017, 19:32]
114. Robert Koch Institut. Studie DEGS1: Prävalenz von Diabetes mellitus (Erhebung 2008-2011). 2016. [Online im Internet] URL: [http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Themen/Chronische\\_Erkrankungen/Diabetes/Diabetes\\_node.html](http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Themen/Chronische_Erkrankungen/Diabetes/Diabetes_node.html) [Stand: 02.09.2016, 11:03]
115. Tamayo T, Brinks R, Hoyer A, Kuss OS, Rathmann W. The Prevalence and Incidence of Diabetes in Germany. *Deutsches Ärzteblatt international*. 2016;113(11):177-82.
116. Neuhauser HK, Adler C, Rosario AS, Diederichs C, Ellert U. Hypertension prevalence, awareness, treatment and control in Germany 1998 and 2008-11. *Journal of Human Hypertension*. 2015;29(4):247-53.
117. Cecelja M, Hussain T, Greil G, Botnar R, Preston R, Moayyeri A, Spector TD, Chowienczyk P. Multimodality Imaging of Subclinical Aortic Atherosclerosis: Relation of Aortic Stiffness to Calcification and Plaque in Female Twins. *Hypertension*. 2013;61(3):609-14.
118. Qazi S, Gona PN, Oyama-Manabe N, Salton CJ, O'Donnell CJ, Manning WJ, Chuang ML. Abstract P238: Distribution of Aortic Plaque by Sex and Age Among Community-dwelling Adults: A Framingham Magnetic Resonance Study. *Circulation*. 2016;133(Suppl 1):AP238.
119. Majesky MW. Developmental Basis of Vascular Smooth Muscle Diversity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007;27(6):1248-58.
120. Davies PF. Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. *Nature Clinical Practice - Cardiovascular Medicine*. 2009;6(1):16-26.
121. Jung B, Obinata H, Galvani S, Mendelson K, Ding BS, Skoura A, Kinzel B, Brinkmann V, Rafii S, Evans T, Hla T. Flow-regulated endothelial S1P receptor-1 signaling sustains vascular development. *Developmental Cell*. 2012;23(3):600-10.
122. Boyd AJ, Kuhn DCS, Lozowy RJ, Kulbisky GP. Low wall shear stress predominates at sites of abdominal aortic aneurysm rupture. *Journal of Vascular Surgery*. 2016;63(6):1613-9.
123. Lee MJ, Thangada S, Claffey KP, Ancellin N, Liu CH, Kluk M, Volpi M, Sha'afi RI, Hla T. Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell*. 1999;99(3):301-12.
124. Qu Z, Cheuk BL, Cheng SW. Differential expression of sphingosine-1-phosphate receptors in abdominal aortic aneurysms. *Mediators of Inflammation*. 2012;1-7.
125. Craiem D, Chironi G, Casciaro ME, Graf S, Simon A. Calcifications of the Thoracic Aorta on Extended Non-Contrast-Enhanced Cardiac CT. *PLoS ONE*. 2014;9(10).

126. Haimovici H, Maier N. Fate of Aortic Homografts in Canine Atherosclerosis: 3. Study of Fresh Abdominal and Thoracic Aortic Implants Into Thoracic Aorta: Role of Tissue Susceptibility in Atherogenesis. *Archives of Surgery*. 1964;89(6):961-9.
127. Lahoz C, Mostaza JM. Atherosclerosis as a systemic disease. *Revista Espanola de Cardiologia*. 2007;60(2):184-95.
128. Galvani S, Sanson M, Blaho VA, Swendeman SL, Obinata H, Conger H, Dahlback B, Kono M, Proia RL, Smith JD, Hla T. HDL-bound sphingosine 1-phosphate acts as a biased agonist for the endothelial cell receptor S1P1 to limit vascular inflammation. *Science Signaling*. 2015;8(389):ra79.
129. Sanchez T. Sphingosine-1-Phosphate Signaling in Endothelial Disorders. *Current Atherosclerosis Reports*. 2016;18(6):31.
130. Whetzel AM, Bolick DT, Srinivasan S, Macdonald TL, Morris MA, Ley K, Hedrick CC. Sphingosine-1 phosphate prevents monocyte/endothelial interactions in type 1 diabetic NOD mice through activation of the S1P1 receptor. *Circulation Research*. 2006;99(7):731-9.
131. Bolick DT, Srinivasan S, Kim KW, Hatley ME, Clemens JJ, Whetzel A, Ferger N, Macdonald TL, Davis MD, Tsao PS, Lynch KR, Hedrick CC. Sphingosine-1-phosphate prevents tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated monocyte adhesion to aortic endothelium in mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2005;25(5):976-81.
132. Brinkmann V, Davis MD, Heise CE, Albert R, Cottens S, Hof R, Bruns C, Prieschl E, Baumruker T, Hiestand P, Foster CA, Zollinger M, Lynch KR. The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(24):21453-7.
133. Oo ML, Thangada S, Wu MT, Liu CH, Macdonald TL, Lynch KR, Lin CY, Hla T. Immunosuppressive and anti-angiogenic sphingosine 1-phosphate receptor-1 agonists induce ubiquitinylation and proteasomal degradation of the receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(12):9082-9.
134. Mandala S, Hajdu R, Bergstrom J, Quackenbush E, Xie J, Milligan J, Thornton R, Shei GJ, Card D, Keohane C, Rosenbach M, Hale J, Lynch CL, Rupprecht K, Parsons W, Rosen H. Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science*. 2002;296(5566):346-9.
135. Keul P, Tolle M, Lucke S, von Wnuck Lipinski K, Heusch G, Schuchardt M, van der Giet M, Levkau B. The sphingosine-1-phosphate analogue FTY720 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007;27(3):607-13.
136. Kluk MJ, Hla T. Role of the sphingosine 1-phosphate receptor EDG-1 in vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Circulation Research*. 2001;89(6):496-502.
137. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105(9):1135-43.

## 11 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Aortenabschnitte mit abgehenden Gefäßen.....	2
Abb. 2: Typischer Wandaufbau einer Arterie.....	4
Abb. 3: Darstellung einer atherosklerotischen Läsion. ....	7
Abb. 4: Darstellung einer komplexen atherosklerotischen Läsion .....	8
Abb. 5: Synthese und Abbau von S1P .....	10
Abb. 6: Signalwege des S1PR1, S1PR2 und S1PR3.....	12
Abb. 7: Lokalisation von Plaque in den untersuchten Aortenabschnitten.....	27
Abb. 8: Histogramme der Expressionsdaten der S1P-Rezeptoren der Aorta abdominalis .....	29
Abb. 9: Vergleich der Expression des S1PR1, S1PR2 und S1PR3 zwischen den drei Aortenabschnitten AS, DE und AB in der Gesamtkohorte sowie den Untergruppen „Kontrolle“ und „Plaque“.....	30
Abb. 10: Korrelationsanalysen zwischen der Expression der einzelnen S1P-Rezeptoren innerhalb eines Aortenabschnitts in der Kontrollgruppe (n=38).....	32
Abb. 11: Korrelationsanalysen der Expression eines S1P-Rezeptors zwischen den einzelnen Aortenabschnitten in der Kontrollgruppe (n=38) .....	33
Abb. 12: Korrelationsanalysen zwischen Alter und der Expression des S1PR3 in der DE und der AB in der Gesamtkohorte (N=116) .....	34
Abb. 13: Vergleich der Expression des S1PR1, S1PR2 und S1PR3 in den drei Aortenabschnitten AS, DE und AB in der Kontrollgruppe und der Plaquegruppe. ....	35
Abb. 14: Vergleich der S1P-Rezeptorexpression zwischen erkrankten und nicht- erkrankten Aortenabschnitten.....	36
Abb. 15: Einfluss einer Erkrankung der Aorta abdominalis (AB) auf die Expression von S1P-Rezeptoren in der Aorta ascendens (AS) und Aorta descendens (DE).....	38

## 12 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Effekte der S1P-Rezeptoren im Gefäßsystem .....	16
Tab. 2: Plaqueausprägung in den drei Aortenabschnitten.....	18
Tab. 3: Vorkommen von Plaque in den drei Aortenabschnitten .....	18
Tab. 4: Plaquescore der Aorta.....	18
Tab. 5: Chemikalien.....	19
Tab. 6: Kits.....	19
Tab. 7: Geräte.....	20
Tab. 8: Primer (qPCR).....	23
Tab. 9: Pipettierschema (qPCR).....	24
Tab. 10 Protokoll der qPCR-Reaktion .....	24
Tab. 11: Studienkohorte und Untergruppen .....	27
Tab. 12: Vergleiche zwischen PLQ(-)- und PLQ(+)-Gruppen für AS, DE und AB .....	28
Tab. 13: Assoziation der S1PR3 Expression mit Alter, BMI und Komorbiditäten in der Gesamtkohorte (N=116).....	34
Tab. 14: Regressionsanalyse, um signifikante Einflussvariablen auf das Vorkommen von Plaque in der Aorta ascendens zu identifizieren.....	40
Tab. 15: Finales Regressionsmodell nach Rückwärtselimination für signifikante Einflussvariablen für das Vorkommen von Plaque in der Aorta ascendens. ....	41
Tab. 16: Regressionsanalyse, um signifikante Einflussvariablen auf das Vorkommen von Plaque in der Aorta descendens zu identifizieren.....	41
Tab. 17: Finales Regressionsmodell nach Rückwärtselimination für signifikante Einflussvariablen für das Vorkommen von Plaque in der Aorta descendens. ....	42
Tab. 18: Regressionsanalyse, um signifikante Einflussvariablen auf das Vorkommen von Plaque in der Aorta abdominalis zu identifizieren.....	43
Tab. 19: Finales Regressionsmodell nach Rückwärtselimination für signifikante Einflussvariablen für das Vorkommen von Plaque in der Aorta abdominalis .....	44
Tab. 20: Regressionsanalyse, um signifikante Einflussvariablen auf die Plaquebelastung der gesamten Aorta zu identifizieren. ....	45
Tab. 21: Finales Regressionsmodell nach Rückwärtselimination für signifikante Einflussvariablen für die Plaquebelastung der gesamten Aorta. ....	46

13 Anhang



LUDWIG-  
MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

ETHIKKOMMISSION BEI DER LMU MÜNCHEN



Ethikkommission · Pettenkoferstr. 8 · 80336 München

ERBEGANGEN AM 28. FEB. 2014

Herrn  
Prof. Dr. Wolfgang Keil  
Institut f. Rechtsmedizin der Univ. München  
Nußbaumstr. 26  
80336 München

Vorsitzender:  
Prof. Dr. W. Eisenmenger  
Telefon+49 (0)89 5160 - 5191  
Telefax+49 (0)89 5160 - 5192  
Ethikkommission@  
med.uni-muenchen.de  
[www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de](http://www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de)

Anschrift:  
Pettenkoferstr. 8a  
D-80336 München

München, 17.02.2014 Hb/ck

Unser Zeichen: 20-14 (bitte bei Schriftwechsel angeben)

**Titel: Molekulare Kartierung des menschlichen Gefäßsystems**  
Antragsteller: Prof. Dr. med. Wolfgang Keil, Institut f. Rechtsmedizin der Univ. München,  
Nußbaumstr. 26, 80336 München

Sehr geehrter Herr Prof. Keil,


besten Dank für Ihr Schreiben vom 12.02.14 mit der Beantwortung unserer Fragen bzw. Erfüllung der Auflagen.

Die Ethikkommission (EK) kann Ihrer Studie nun die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit zuerkennen.

Vorsorglich möchte ich darauf hinweisen, dass auch bei einer positiven Beurteilung des Vorhabens durch die EK die ärztliche und juristische Verantwortung für die Durchführung des Projektes uneingeschränkt bei Ihnen und Ihren Mitarbeitern verbleibt.

Änderungen des Studienprotokolls sind der EK mitzuteilen. Für Ihre Studie wünsche ich Ihnen viel Erfolg.

Mit freundlichen Grüßen

  
Prof. Dr. W. Eisenmenger  
Vorsitzender der Ethikkommission

Mitglieder der Kommission:  
Prof. Dr. W. Eisenmenger (Vorsitzender), Prof. Dr. B. Held (stellv. Vorsitzender),  
PD Dr. Th. Beinert, Prof. Dr. H. U. Gallwas, Prof. Dr. D. Kuze, Dr. V. Manch, Prof. Dr. H. H. Müller, Prof. Dr. R. Penning, Prof. Dr. K. Hahn, Prof. Dr. K. Pfeifer, Dr. Ch. Zoch



**Tabelle A: Rohdaten der Studie**

Angegeben sind: Patientennummer, Alter, Geschlecht, Body-Mass-Index (BMI), S1P-Rezeptorenexpression in den Prozent der GAPDH-Expression in der Aorta ascendens (AS), Aorta descendens (DE) und Aorta abdominalis (AB), 3-stufige Plaqueausprägung der AS, DE und AB, Diabetes mellitus, arterieller Hypertonus, pathologischer Nierenstatus.

Patientennummer	Alter	Geschlecht: 0=M, 1=F	BMI	AS S1PR1	AS S1PR2	AS S1PR3	DE S1PR1	DE S1PR2	DE S1PR3	AB S1PR1	AB S1PR2	AB S1PR3	Aorta ascendens: PLAQUE 0/1/2	Aorta descendens: PLAQUE 0/1/2	Aorta abdominalis: PLAQUE 0/1/2	Diabetes mellitus: 0=nein 1=ja	art. Hypertonus: 0=nein 1=ja	Nieren: unauffällig=0; auffällig=1
1	50	0	25,6	0,324	0,163	2,829	0,448	0,287	1,468	6,668	1,766	1,862	0	0	2	0	0	0
2	83	1	37,7	1,229	0,348	0,694	0,612	0,309	0,755	3,428	0,724	1,807	0	0	2	0	0	1
3	20	0	22,9	3,812	0,772	2,746	3,118	0,925	1,919	1,858	0,434	4,995	0	0	0	0	0	0
4	81	1	26,2	4,067	0,772	2,125	1,636	0,622	1,706	6,470	0,589	3,992	0	0	2	1	0	1
5	50	0	14,5	2,435	0,405	5,982	1,471	0,392	5,268	1,812	0,459	7,484	0	0	2	0	0	1
6	64	0	31,0	1,534	0,383	2,628	1,516	0,416	2,139	2,241	0,428	1,659	0	0	2	0	0	0
7	75	0	24,5	2,001	0,433	2,963	2,810	0,271	1,566	2,544	0,469	5,530	0	0	2	0	0	0
8	63	0	29,3	0,568	0,270	0,720	2,215	0,198	2,105	3,420	0,666	3,380	0	0	1	0	0	0
9	53	0	36,4	0,863	0,233	1,625	2,005	0,225	3,033	0,602	0,198	1,915	0	0	2	1	1	0
10	65	0	25,1	1,107	0,343	0,859	0,295	0,245	0,809	2,374	0,381	2,215	1	1	1	0	0	0
11	41	1	20,2	4,554	0,331	1,284	2,580	0,702	2,298	7,229	1,110	2,024	0	0	0	0	0	1
12	85	1	27,5	0,957	0,181	1,924	0,744	0,089	0,268	3,965	0,573	2,314	2	2	2	0	1	1
13	79	1	23,6	0,833	1,386	2,033	2,091	0,987	1,287	2,043	0,891	2,836	1	1	2	0	0	1
14	55	0	18,8	2,029	0,347	1,246	0,672	0,107	0,767	0,826	0,399	1,215	0	0	2	0	1	0
15	59	0	25,4	0,143	0,178	0,545	0,111	0,098	0,432	2,429	0,902	1,272	0	0	2	0	0	1
16	84	1	22,2	0,544	0,073	1,226	0,295	0,177	2,758	0,450	0,272	3,532	0	0	1	0	0	1
17	83	1	31,2	0,383	0,069	2,909	0,554	0,088	1,415	0,591	0,062	0,679	0	0	2	1	1	1
18	63	1	20,3	0,953	0,204	1,897	0,975	0,560	0,925	0,861	0,290	4,076	1	1	2	0	0	1
19	48	1	45,2	1,405	0,457	1,682	1,897	0,272	1,871	1,858	0,157	6,441	0	0	1	0	0	0
20	71	1	28,9	1,629	1,070	2,671	5,292	1,577	3,089	2,532	1,065	2,480	0	0	2	0	0	1
21	69	0	32,1	1,730	0,266	2,314	0,984	0,189	1,807	4,299	0,320	3,205	0	0	2	1	0	1
22	40	1	21,1	2,347	0,196	3,005	1,049	0,207	1,625	4,114	0,933	1,679	0	0	0	0	0	0
23	46	0	22,2	4,029	0,993	5,751	1,548	0,457	4,349	2,005	0,811	5,711	0	0	1	0	1	0
24	79	1	21,2	1,115	1,402	3,118	3,220	3,733	3,191	3,318	1,252	1,351	0	1	2	0	0	1
25	71	0	28,4	0,159	0,133	0,657	0,338	0,110	0,507	0,674	0,301	0,753	0	0	2	0	0	1
27	79	0	27,7	1,302	1,335	7,313	0,513	0,418	4,048	1,146	0,213	4,715	0	2	2	0	0	1
28	75	1	21,1	0,855	0,306	6,776	1,875	0,996	3,176	0,873	0,254	3,573	0	0	2	0	1	1

Anhang

Patientennummer	Alter	Geschlecht: 0=M, 1=F	BMI	AS S1PR1	AS S1PR2	AS S1PR3	DE S1PR1	DE S1PR2	DE S1PR3	AB S1PR1	AB S1PR2	AB S1PR3	Aorta ascendens: PLAQUE 0/1/2	Aorta descendens: PLAQUE 0/1/2	Aorta abdominalis: PLAQUE 0/1/2	Diabetes mellitus: 0=nein 1=ja	art. Hypertonus: 0=nein 1=ja	Nieren: unauffällig=0; auffällig=1
30	38	0	38,2	2,288	0,546	1,762	3,459	0,573	4,726	1,184	0,257	2,149	0	1	1	0	0	0
31	48	0	20,4	1,563	1,299	3,691	1,293	0,494	2,862	1,982	0,542	2,001	0	0	1	0	0	1
32	49	0	27,5	2,771	2,256	3,674	5,292	1,694	6,722	2,480	0,991	4,328	0	0	1	0	0	0
33	45	1	42,6	7,048	2,544	3,388	3,821	1,584	3,089	2,230	0,374	5,219	0	0	1	0	0	0
34	36	1	25,0	1,019	0,348	3,974	0,675	0,282	6,221	0,639	0,267	11,162	0	0	0	0	0	0
35	79	1	28,5	1,738	0,639	4,309	2,047	0,881	2,105	4,171	0,499	5,491	0	1	2	0	0	1
36	23	0	23,7	2,810	0,741	2,998	6,009	1,555	3,699	1,499	0,658	4,748	0	0	1	0	0	0
38	49	0	25,0	4,133	1,105	5,403	13,428	1,782	4,650	17,901	1,990	4,912	0	1	1	0	0	0
39	70	0	20,3	2,671	0,693	2,010	1,534	0,833	2,640	3,870	1,401	4,056	1	2	2	0	1	1
40	89	1	24,4	1,007	0,149	3,296	0,722	0,453	1,807	1,685	0,205	3,081	0	1	1	0	0	1
41	86	0	25,3	3,955	0,419	1,077	3,725	0,857	2,733	2,475	0,626	1,951	0	1	2	0	0	1
42	62	0	35,4	0,609	0,328	1,345	1,850	0,685	0,914	0,178	0,125	0,813	0	1	2	0	0	1
43	68	1	18,8	0,721	0,243	1,097	3,075	0,443	2,580	1,581	0,242	2,889	2	2	2	0	0	1
44	76	0	30,0	3,946	4,123	4,020	3,794	2,790	2,984	0,619	0,214	1,055	2	0	2	0	0	1
45	73	1	38,8	2,702	3,569	2,758	0,643	0,505	2,418	2,230	0,514	1,973	0	2	2	1	1	1
46	86	0	22,7	5,798	2,022	5,311	1,287	1,338	3,937	1,581	0,258	2,412	0	0	2	0	0	1
48	66	1	47,5	0,466	0,507	1,690	4,200	5,504	5,077	5,811	4,602	5,274	0	1	2	1	0	1
49	25	0	27,7	1,625	0,826	2,869	1,803	0,558	1,499	3,443	2,052	2,368	0	0	0	0	0	0
50	65	0	23,4	5,317	4,770	5,982	3,311	0,711	1,644	1,928	0,325	0,931	0	1	2	0	0	0
51	57	0	28,3	1,045	0,857	2,194	1,774	0,721	2,936	1,019	0,326	2,950	0	1	2	0	0	0
52	75	1	31,1	0,652	0,211	3,946	1,290	0,476	3,228	1,201	0,274	6,761	0	1	2	0	0	1
53	71	0	34,1	1,875	0,816	3,365	2,970	2,154	3,786	1,738	0,345	4,191	0	1	1	0	0	0
54	46	0	31,2	4,618	3,682	4,230	1,667	0,584	2,797	2,095	0,181	1,862	0	0	2	0	0	1
55	36	0	29,3	3,540	0,273	1,299	0,845	0,211	3,974	0,513	0,250	2,309	0	0	0	0	0	0
56	55	1	20,3	1,226	0,251	1,726	1,537	0,481	2,936	1,978	0,515	3,191	0	0	0	0	0	0
57	75	1	21,8	0,238	0,287	1,795	0,197	0,132	3,631	1,520	1,311	2,401	2	2	2	0	0	1
58	70	0	15,4	1,141	0,290	1,338	0,393	0,240	2,616	2,314	0,418	6,714	0	1	1	0	1	1
59	64	0	19,3	0,192	0,238	1,603	0,704	0,332	3,040	0,210	0,208	1,663	0	1	2	1	1	0
60	75	0	28,7	1,854	0,194	3,334	6,999	4,419	7,213	1,534	0,642	2,210	2	2	2	1	0	1
61	49	0	32,3	1,871	0,910	3,565	2,159	0,671	3,183	5,954	0,583	7,911	0	0	2	0	0	1
62	42	0	29,6	0,845	0,440	1,946	1,730	0,354	1,317	2,261	0,779	2,293	0	0	0	0	0	0
63	82	1	n.a.	0,097	0,205	3,318	7,364	3,191	4,048	2,019	0,287	3,228	0	0	2	0	0	1
64	51	0	20,8	5,504	1,171	1,076	2,856	1,038	2,521	2,363	1,323	2,015	0	0	1	0	0	0
65	35	1	30,0	1,017	1,348	1,663	0,832	0,801	1,043	2,368	0,946	3,118	0	0	1	0	0	0

Anhang

Patientennummer	Alter	Geschlecht: 0=M, 1=F	BMI	AS S1PR1	AS S1PR2	AS S1PR3	DE S1PR1	DE S1PR2	DE S1PR3	AB S1PR1	AB S1PR2	AB S1PR3	Aorta ascendens: PLAQUE 0/1/2	Aorta descendens: PLAQUE 0/1/2	Aorta abdominalis: PLAQUE 0/1/2	Diabetes mellitus: 0=nein 1=ja	art. Hypertonus: 0=nein 1=ja	Nieren: unauffällig=0; auffällig=1
66	77	0	25,1	2,790	0,755	3,311	3,265	0,591	2,336	2,149	0,460	1,621	0	0	2	0	0	1
67	59	1	23,9	0,437	0,364	1,816	2,896	0,434	6,221	2,836	0,648	11,344	0	0	2	0	0	1
68	53	0	26,9	0,134	0,219	2,902	0,100	0,248	1,698	4,502	1,192	5,725	0	0	1	0	0	0
69	76	0	28,0	3,428	0,669	1,854	3,265	0,847	1,606	3,565	0,894	2,610	0	0	2	0	0	0
70	51	0	36,6	0,330	0,666	1,992	3,992	4,419	4,152	7,415	12,881	10,857	0	1	1	0	0	1
71	86	1	21,0	0,327	0,190	0,542	1,933	0,925	1,803	1,110	0,910	3,459	0	2	2	0	1	1
72	72	1	20,3	2,509	0,739	2,727	2,230	1,588	5,042	4,076	1,722	4,440	0	0	2	0	1	0
73	78	0	26,6	1,841	0,383	0,875	0,908	0,526	0,863	3,288	0,933	2,120	0	0	0	0	0	0
74	40	0	20,7	2,200	0,429	5,968	3,235	0,461	11,609	1,465	0,350	18,859	0	0	0	0	0	0
75	39	1	29,1	0,957	0,529	3,768	2,100	1,833	2,336	1,888	1,311	5,136	0	0	0	0	0	1
76	50	1	18,5	0,427	0,230	2,015	0,150	0,196	0,565	0,699	0,137	3,132	0	0	0	0	0	0
77	43	0	23,9	0,151	0,178	1,742	0,518	0,287	3,691	0,312	0,320	4,299	0	0	0	0	0	0
78	39	0	18,7	0,691	0,299	2,803	5,195	1,007	3,573	1,428	0,607	3,365	0	0	1	0	0	0
79	41	0	22,3	2,412	0,651	3,821	3,615	1,610	3,396	4,057	1,190	4,143	0	0	0	0	0	0
80	69	1	32,8	4,792	1,987	1,483	1,311	0,524	1,854	1,648	1,335	2,401	0	0	1	0	0	1
81	56	0	24,9	0,910	0,406	1,778	2,134	0,591	1,828	0,980	0,267	10,658	0	0	2	0	0	0
82	74	0	25,0	8,773	2,749	9,749	0,863	0,250	1,599	1,946	0,213	5,231	0	0	2	0	0	1
83	70	1	22,8	3,096	0,632	1,893	3,623	0,613	1,024	2,029	0,342	1,552	0	0	2	0	1	1
84	19	1	14,9	3,974	1,648	3,557	1,987	0,883	4,057	1,710	0,805	4,661	0	0	1	0	0	0
85	61	0	40,7	2,604	0,503	1,482	1,386	0,320	0,861	1,053	0,436	1,559	0	0	2	1	0	1
86	24	0	19,6	1,428	0,358	5,872	1,028	0,643	5,053	2,235	0,973	4,512	0	0	0	0	0	0
87	73	1	29,7	0,381	0,143	1,107	0,174	0,183	3,598	0,490	1,024	4,586	0	0	1	0	0	0
88	73	1	21,8	0,125	0,078	0,556	0,233	0,185	1,509	0,741	0,335	3,937	0	1	1	0	0	0
89	54	0	32,0	0,473	0,207	4,086	0,399	0,370	5,831	0,835	0,716	4,279	1	1	1	0	0	0
90	86	1	24,1	0,523	0,175	1,833	0,753	0,350	2,486	3,012	0,281	2,241	0	2	2	0	0	1
91	54	0	31,2	1,541	0,410	3,005	0,645	0,223	2,001	1,302	0,497	0,973	0	0	2	0	0	0
92	67	1	29,4	0,675	0,721	0,506	0,623	0,879	0,833	1,097	0,237	0,633	1	1	2	0	0	1
93	70	0	25,1	1,395	0,651	1,545	3,428	2,634	3,026	4,086	1,082	1,837	2	2	2	1	1	1
94	58	0	43,3	0,674	0,311	3,937	0,929	0,386	4,570	0,931	0,317	2,652	1	1	2	1	1	1
95	10 1	0	13,7	1,010	0,373	4,781	2,457	0,993	2,230	0,131	0,314	0,845	2	2	2	0	0	1
96	69	0	54,7	0,690	0,415	1,655	2,272	1,599	1,290	3,524	0,569	0,883	0	0	2	1	1	1
97	32	0	23,2	2,727	0,918	2,134	1,485	0,803	2,758	0,743	0,274	3,061	1	1	1	0	0	0
98	54	0	33,3	0,298	0,176	5,607	0,313	0,633	1,837	0,383	0,253	7,296	0	0	2	0	0	0
99	82	1	n.a.	0,709	0,234	1,290	0,370	0,233	1,000	0,633	0,428	2,024	1	1	1	0	1	1

Anhang

Patientennummer	Alter	Geschlecht: 0=M, 1=F	BMI	AS S1PR1	AS S1PR2	AS S1PR3	DE S1PR1	DE S1PR2	DE S1PR3	AB S1PR1	AB S1PR2	AB S1PR3	Aorta ascendens: PLAQUE 0/1/2	Aorta descendens: PLAQUE 0/1/2	Aorta abdominalis: PLAQUE 0/1/2	Diabetes mellitus: 0=nein 1=ja	art. Hypertonus: 0=nein 1=ja	Nieren: unauffällig=0; auffällig=1
100	44	0	30,8	0,620	0,274	0,435	1,618	0,655	1,523	2,574	1,212	2,407	0	0	2	0	0	0
101	58	0	25,9	0,381	0,167	0,649	0,585	0,512	0,895	0,481	0,591	0,902	0	0	2	0	0	0
102	64	1	22,2	4,349	1,050	3,983	1,555	1,132	2,341	4,076	0,951	2,689	0	0	1	0	0	1
103	60	1	51,0	3,296	1,812	3,557	3,125	1,937	1,092	2,330	1,499	2,568	1	1	1	0	0	0
104	33	0	21,2	0,953	0,556	1,263	0,753	0,765	0,973	2,154	1,379	3,075	0	0	0	0	0	0
105	44	0	27,8	2,159	1,239	2,843	0,595	0,430	4,143	3,089	2,115	2,869	1	1	1	0	0	0
106	49	0	27,2	1,933	1,234	0,998	1,814	2,347	2,498	3,821	1,734	3,273	0	0	1	0	0	0
107	72	0	26,4	1,434	0,335	1,287	0,421	0,225	0,690	1,165	0,889	1,444	0	2	2	1	0	1
108	23	0	15,5	3,220	1,955	3,492	2,457	2,246	5,378	1,272	0,736	3,288	0	0	0	0	0	0
109	52	0	24,3	1,160	0,996	1,527	0,803	0,729	1,139	1,332	0,714	3,243	1	1	2	0	1	0
110	63	0	22,3	0,281	0,262	2,492	0,739	0,197	1,386	1,342	0,423	4,430	0	1	2	0	0	1
111	72	1	36,5	0,202	0,103	0,181	0,231	0,303	0,734	0,258	0,402	0,433	2	0	2	0	0	0
112	20	0	20,1	0,828	0,165	3,708	0,951	0,426	2,215	0,691	0,411	3,475	0	0	0	0	0	0
113	50	0	26,2	0,160	0,143	0,871	0,272	0,236	0,663	2,159	0,442	2,235	0	0	2	0	0	0
114	58	1	20,8	1,599	0,638	0,830	1,038	0,225	0,339	3,198	4,554	3,235	2	2	2	0	0	0
115	69	0	36,3	2,230	1,115	1,850	0,182	0,144	0,729	1,278	0,390	1,087	2	2	2	0	1	1
116	45	0	23,6	3,500	2,304	2,527	0,482	0,425	0,731	1,461	1,038	1,880	2	2	2	0	0	0
117	46	0	27,2	4,249	0,499	1,118	2,033	0,612	1,686	0,519	0,265	3,169	0	0	2	0	0	0
118	28	0	27,4	1,342	0,610	2,683	1,928	0,654	2,469	0,904	0,283	3,154	0	0	0	0	0	0
133	23	0	25,3	2,029	0,816	1,243	3,786	0,669	1,314	2,357	0,731	3,451	0	0	0	0	0	0
141	38	1	22,0	0,508	0,186	2,752	7,179	2,159	5,698	1,559	0,591	6,699	0	0	0	0	0	0

## 14 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Axel Larena-Avellaneda für die Überlassung des interessanten Themas und die tatkräftige Unterstützung während des Verfassens dieser Arbeit bedanken. Mein Dank gilt ebenfalls meinem Betreuer Herrn Dr. Günter Daum, der mich durch unzählige Treffen und den intensiven Gedankenaustausch stets unterstützt hat. Herzlichen Dank dafür.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. Markus Geissen für die kompetente Einführung in die Laborarbeit und bei Frau Astrid Becker für das stets offene Ohr während der Laborzeit bedanken. Ein weiterer Dank gilt Herrn Gerhard Schön aus dem Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie des UKE, für die fachkundige Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Zusätzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Keil für die Umsetzung dieser Studie und dem gesamten Team der Rechtsmedizin der LMU für die Entnahme der Proben bedanken.

Ebenfalls möchte ich mich bei meinen Mitdoktoranden Dr. Steffen Greulich für den engen Kontakt und die gegenseitige Unterstützung sowie bei Martje Odinga für die Einsicht und Zusammenfassung der Sektionsprotokolle bedanken.

Mein größter Dank gilt den Menschen, die mich in meinem Leben begleitet haben. Ohne meine Eltern hätte ich den Traum des Medizinstudiums und dieser Arbeit niemals verwirklichen können. Danke, dass ihr in allen Lebenslagen immer für mich da gewesen seid und immer an mich geglaubt habt. Ohne euch hätte ich es sicher nicht geschafft. Ebenfalls möchte ich mich bei meiner Schwester Leni für den emotionalen Beistand und bei Mario Bäcker für die mentale Unterstützung während des Erstellens der Arbeit bedanken.

Mein letzter und ein besonderer Dank gilt Prikki: Ich danke dir dafür, dass du mich durch die Promotionszeit begleitet hast und du mich dabei stets unterstützt hast. Durch deine Hilfsbereitschaft und deine optimistische Art hast du mir viel Kraft gegeben, so dass ich mein Ziel nie aus den Augen verloren habe.

## **15 Lebenslauf**

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



## **16 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: .....