

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Universitäres Herzzentrum
Klinik und Poliklinik für Gefäßmedizin

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

Die Expression des Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptors 1 in Plaque humaner A. iliaca und A. femoralis Eine histologische Untersuchung

Dissertation

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

vorgelegt von:

Priska Kleinbercher
aus Münster

Hamburg 2019

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 15.08.19**

**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. Renate Bonin-Schnabel

für meine Eltern

1	Einleitung	1
1.1	Aufbau einer Arterie	1
1.2	Atherosklerose und Arteriosklerose	2
1.2.1	Definition	2
1.2.2	Risikofaktoren	3
1.2.3	Klinische Manifestation: pAVK	3
1.2.4	Pathogenese	4
1.2.5	M1- und M2- Makrophagen	6
1.2.6	Therapie der pAVK	8
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	14
1.3.2.3	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 3	14
2	Material und Methoden	16
2.1	Material	16
2.1.1	Proben	16
2.2	Methoden	18
2.2.1	Aufarbeitung der Präparate	18
2.2.2	Färbungen	20
2.2.2.1	Histologie	20
2.2.2.2	Immunfluoreszenz	21
2.2.3	Bilddokumentation	29
2.2.4	Auszählung	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Expression des S1PR1 im gesunden Gefäß	30
3.1.1	Darstellung des S1PR1 in Intima/Media	31
3.1.2	Darstellung des S1PR1 in Media/Adventitia	32
3.2	Charakterisierung der Plaques	34
3.2.1	Histologische Untersuchungen	34
3.2.2	Darstellung des S1PR1 in Intima/Media und Plaque	37
3.2.3	M1- und M2-Makrophagen	54
4	Diskussion	56
4.1	S1PR1 im gesunden Gefäß	56
4.2	S1PR1 in der Plaque	57

4.2.1	Expression des S1PR1 im Endothel	58
4.2.2	CD31/S1PR1-positive Zellen in der Intima	59
4.2.3	Expression des S1PR1 auf Makrophagen	59
4.2.4	Expression des S1PR1 in der Media	60
4.3	Limitationen.....	62
5	Fazit und Ausblick	63
6	Zusammenfassung	64
7	Summary and conclusions	65
8	Abkürzungsverzeichnis	66
9	Literaturverzeichnis.....	68
10	Abbildungsverzeichnis	76
11	Tabellenverzeichnis	81
12	Anhang	82
13	Danksagung	89
14	Lebenslauf.....	90
15	Eidesstattliche Erklärung	91

1 Einleitung

Erkrankungen des Herzkreislaufsystems stellen in der westlichen Welt die häufigsten Todesursachen dar. Bedingt durch das Alter und eine Reihe kardiovaskulärer Risikofaktoren kommt es mit der Zeit zu einer arteriellen Gefäßverkalkung, welche einen Elastizitätsverlust des Gefäßes und ggf. eine Einengung des Lumens bedingen kann. Dementsprechend kann es zur Minderdurchblutung der versorgten Organe mit Folgen wie periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), Herzinfarkt oder Apoplex kommen. Häufigste Ursache der Gefäßverkalkung ist die Atherosklerose, eine chronisch-entzündliche Reaktion der Gefäßwand auf äußere Einflüsse. Glatte Gefäßmuskelzellen und Makrophagen sind bei diesen Prozessen maßgeblich beteiligt. Eine in der Entstehung der Atherosklerose noch nicht ausreichend untersuchte Rolle spielt auch Sphingosin-1-Phosphat, ein bioaktives Lipid, das durch die Kopplung an fünf verschiedene S1P-Rezeptoren zahlreiche physiologische und pathophysiologische Prozesse, unter anderem im Herzkreislaufsystem reguliert (1). Die vorliegende Arbeit untersucht den Zusammenhang zwischen Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen und Makrophagen mit dem Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 1 im Rahmen der atherosklerotisch bedingten pAVK.

1.1 Aufbau einer Arterie

Menschliche Arterien bestehen aus drei Schichten: Tunica intima (kurz: Intima), Tunica media (Media) und Tunica adventitia (Adventitia) (s. Abbildung 1). Die Intima besitzt lumenseitig ein einschichtiges Endothel, das in direktem Kontakt zum Blut steht. Die abgeflachten und polygonalen Endothelzellen sind durch Zonulae occludentes und einzelnen Gap Junctions verbunden. Dadurch entsteht eine glatte Oberfläche, die einen optimalen Blutfluss gewährleistet und das Gefäß als innere Oberfläche vor dem Eintritt von Blutzellen und Plasmaproteinen schützt. Durch die Sekretion von vasodilatatorischen Substanzen, wie dem Stickstoffmonoxid (NO), kommt dem Endothel zusätzlich die Funktion der Regulierung des Gefäßtonus zu. Unter dem Endothel besitzt die Intima eine dünne Basalmembran, an die sich eine subendotheliale Schicht aus lockerem Bindegewebe anschließt. Die Basalmembran enthält elastische Fasern, Fibroblasten sowie vereinzelt glatte Muskelfasern. Zur Media hin grenzt sich die Intima durch eine Lamina elastica interna ab.

In der Media finden sich glatte Muskelzellen (GMZ), welche Längs- und Querfaserzüge aufweisen und durch Gap Junctions verbunden sind. Zwischen dieser zweifach geschichteten Muskulatur lagern sich elastische Fasern, Kollagen und Bindegewebszellen ein. Die Dicke der Media hängt von der Funktion des Gefäßes ab. In Arterien besteht die

Media aus einer stärkeren Muskelschicht als in Venen, da im gesamten arteriellen System ein höherer Innendruck herrscht (2). Zur äußeren Schicht, der Adventitia, grenzt sich die Media durch die Lamina elastica externa ab.

Die Adventitia besteht überwiegend aus längsverlaufenden Kollagenfibrillen, zahlreichen elastischen Fasern sowie Fibroblasten und geht in eine Bindegewebsschicht über, die das Gefäß im umliegenden Gewebe verankert. In der Bindegewebsschicht finden sich der Nervenplexus sowie Vasa vasorum, feinste Blutgefäße, die die Adventitia und Media mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen und innervieren (s. Abbildung 1).

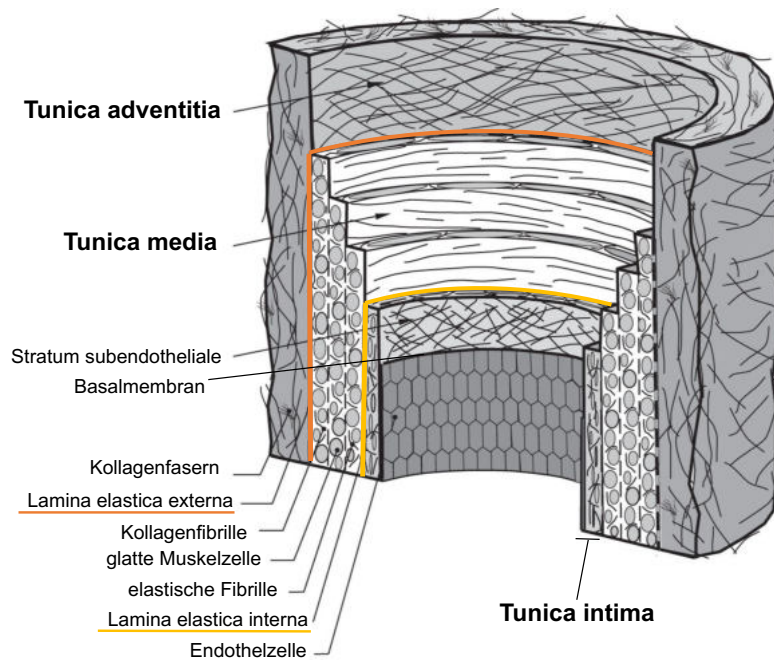


Abbildung 1: **Schematischer Aufbau der Gefäßwand einer Arterie.** Zum Lumen hin besteht das Gefäß aus einer Tunica intima, die aus einer Endothelschicht, lockerem Bindegewebe und einer Lamina elastica interna besteht. Die Tunica media schließt sich der Intima an und besteht vorwiegend aus glatten Muskelzellen, Kollagenfibrillen und elastischen Fasern. Im Bindegewebe ist das Gefäß durch die äußere Tunica adventitia abgegrenzt. *Modifiziert nach Gasser TC et al. (3)*

1.2 Atherosklerose und Arteriosklerose

1.2.1 Definition

Der Begriff „Arteriosklerose“ wurde 1833 von dem Pathologen Johann Friedrich Lobstein geprägt, der arterielle Läsionen als sklerosierende Verdickung und Versteifung der Gefäßwand beschrieb. Die Gefäßveränderungen kategorisierte Lobstein in inflammatorisch, sklerosierend und ossifizierend (4). 1904 kreierte der Pathologe Felix Marchand aus den griechischen Wörtern „athära“ (= Grütze) und „skleros“ (=hart) den

Begriff der Atherosklerose (5, 6). Bei der Atherosklerose handelt es sich um eine chronisch entzündliche Erkrankung, die aufgrund hoher Blutfettwerte und anschließender Ablagerung pathogener Schaumzellen zur Plaquebildung und sekundär zur Sklerosierung der Arterie im Bereich der Intima führt. Die Arteriosklerose kann auch durch Krankheitsbilder wie der Mönckeberg-Sklerose, eine durch lokale Kalzifizierung ohne Lumeneinengung charakterisierte Erkrankung der Media bedingt sein (7). Da jedoch die Atherosklerose die häufigste Ursache für arterielle Gefäßveränderungen darstellt, werden die Begriffe oft synonym verwendet.

1.2.2 Risikofaktoren

Risikofaktoren wie Alter, männliches Geschlecht, Hyperlipidämie, Hypercholesterinämie, Hypertonus, Radikalbildung durch Nikotinabusus, Chlamydieninfektion, erhöhter Homocysteinspiegel und Diabetes (8-10) begünstigen die Entstehung der Atherosklerose. Weitere Umstände des Lebensstils, wie mangelnde körperliche Bewegung, übermäßiger Alkoholkonsum und psychische Einflüsse spielen ebenfalls eine Rolle (11).

Neben diesen systemischen Faktoren können anatomisch bedingte Biegungen und Verzweigungen in den Gefäßen Turbulenzen (Schubspannung, engl. „shear stress“) hervorrufen, die zu Funktionsbeeinträchtigungen des Endothels und in der Folge zu Atherosklerose führen. Daher sind Bifurkationen im Gefäßsystem prädestinierte Lokalisationen für atherosklerotische Plaquebildung.

1.2.3 Klinische Manifestation: pAVK

Bei der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) handelt es sich um ein chronisches Krankheitsbild mit Durchblutungsstörungen der Extremitäten. Mit einer Gesamtprävalenz von 3-10%, die im Alter von 70 Jahren auf 15-20% steigt, stellt die pAVK eine häufige Erkrankung dar (12-14). Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass Patienten mit einer pAVK eine erhöhte Sterblichkeit aufweisen. Ursache hierfür sind zerebrovaskuläre und koronare Komorbiditäten, die ebenfalls durch die atherosklerotische Grunderkrankung bedingt sind (13). Die pAVK wird in Abhängigkeit ihrer Symptomatik in verschiedene Stadien unterteilt (s. Tabelle 1).

Fontaine		Rutherford	
Stadium	Klinik	Klassifikation	Klinik
I	Keine Symptome	0	Keine Symptome
II	IIa: beschwerdefreie Gehstrecke > 200m IIb: beschwerdefreie Gehstrecke < 200 m	1	geringe Claudicatio intermittens, Doppler > 50mmHg
		2	mäßige Claudicatio intermittens
		3	schwere Claudicatio intermittens, Doppler < 50 mmHg
III	Ruheschmerz	4	Ruheschmerz
IV	Trophische Störungen (Nekrosen, Ulzera, Gangrän)	5	distale trophische Läsion
		6	nach proximal ausbreitende Läsion, über das metatarsale Niveau hinaus

Tabelle 1: Stadieneinteilung der pAVK nach Fontaine und nach Rutherford (15)

1.2.4 Pathogenese

Die Pathogenese der Atherosklerose ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Russell Ross prägte in den 1970er Jahren die heute allgemein anerkannte „Response-to-injury“ Hypothese. Auslöser der Atherosklerose ist demnach eine endotheliale Dysfunktion, die eine chronische Entzündungsreaktion der Gefäßwand zur Folge hat (16). Oben genannte Risikofaktoren wie u.a. arterieller Hypertonus oder „shear stress“ führen zu einer Schädigung des Endothels. Das Endothel bildet weniger Stickstoffmonoxid (NO) über die eNOS (endotheliale NO-Synthase), welches in erster Linie als Vasodilatator dient, aber auch die Thrombozytenadhäsion, Leukozytenmigration und Proliferation von GMZ hemmt (17-19). Die endotheliale Dysfunktion beinhaltet auch eine erhöhte vaskuläre Permeabilität, was die Infiltration der Gefäßwand mit Plasmabestandteilen wie Lipoproteinen und Blutzellen begünstigt (20, 21). Vor allem LDL (Low-density Lipoprotein) spielt dabei eine entscheidende Rolle, da es in der Gefäßwand oxidiert wird und als oxLDL nicht nur zellschädigend, sondern auch chemotaktisch auf Monozyten wirkt. Folglich akkumulieren

Makrophagen in der Intima, die oxLDL mittels ihrer Scavenger-Rezeptoren phagozytieren (22, 23). Darüber hinaus produzieren Makrophagen auch zahlreiche Zytokine (u.a. TNF- α), wodurch eine von Interleukinen stimulierte, inflammatorische Kaskade ausgelöst wird. Neben Makrophagen sind auch GMZ dazu befähigt, oxLDL aufzunehmen. Die mit LDL-Molekülen und Cholesterol beladenen Makrophagen und GMZ werden als Schaumzellen („foam cells“) bezeichnet. Diese Zellen schütten weiterhin inflammatorische Zytokine aus (24, 25). Letztendlich sterben die Schaumzellen durch Nekrose, wobei die frei werdenden Zellbestandteile die Inflammation verstärken.

Eine weitere Reaktion auf die Gefäßverletzung ist eine Proliferation und Migration von GMZ, welche zur Entstehung einer Intimahyperplasie beitragen. Indem sie extrazelluläre Matrix (EZM; bestehend aus Kollagen, Elastin und Proteoglykanen) produzieren, bildet sich eine die Plaque stabilisierende fibrotische Kappe (19, 26, 27). Diese dient als Deckplatte, die den nekrotischen Lipidkern vor direktem Kontakt mit im Blut zirkulierenden Thrombozyten schützt und der Plaque strukturelle Stabilität verleiht (28) (s. Abbildung 2).

Kommt es zu einer Plaqueruptur, besteht die Möglichkeit einer kompletten Okklusion des Gefäßes durch Bildung eines Thrombus (29). Entscheidend für die Plaqueruptur ist die Schulterregion, die Übergangsregion zwischen Plaque und Intima. Hier akkumulieren Makrophagen, die nach Stimulation mit Zytokinen wie IFN- γ , TNF- α oder IL-1 Matrix-degradierende Enzyme sezernieren (Matrix-Metallo-Proteinasen, Kollagenasen und Gelatinasen). Diese Proteinase destabilisieren die fibrotische Kappe (30) und erhöhen damit das Risiko einer Plaqueruptur und der Entstehung eines okkludierenden Thrombus (31). In der A. carotis kann dies einen Schlaganfall zur Folge haben, in Beinarterien kommt es zu akuten Ischämien in den betroffenen Stromgebieten.

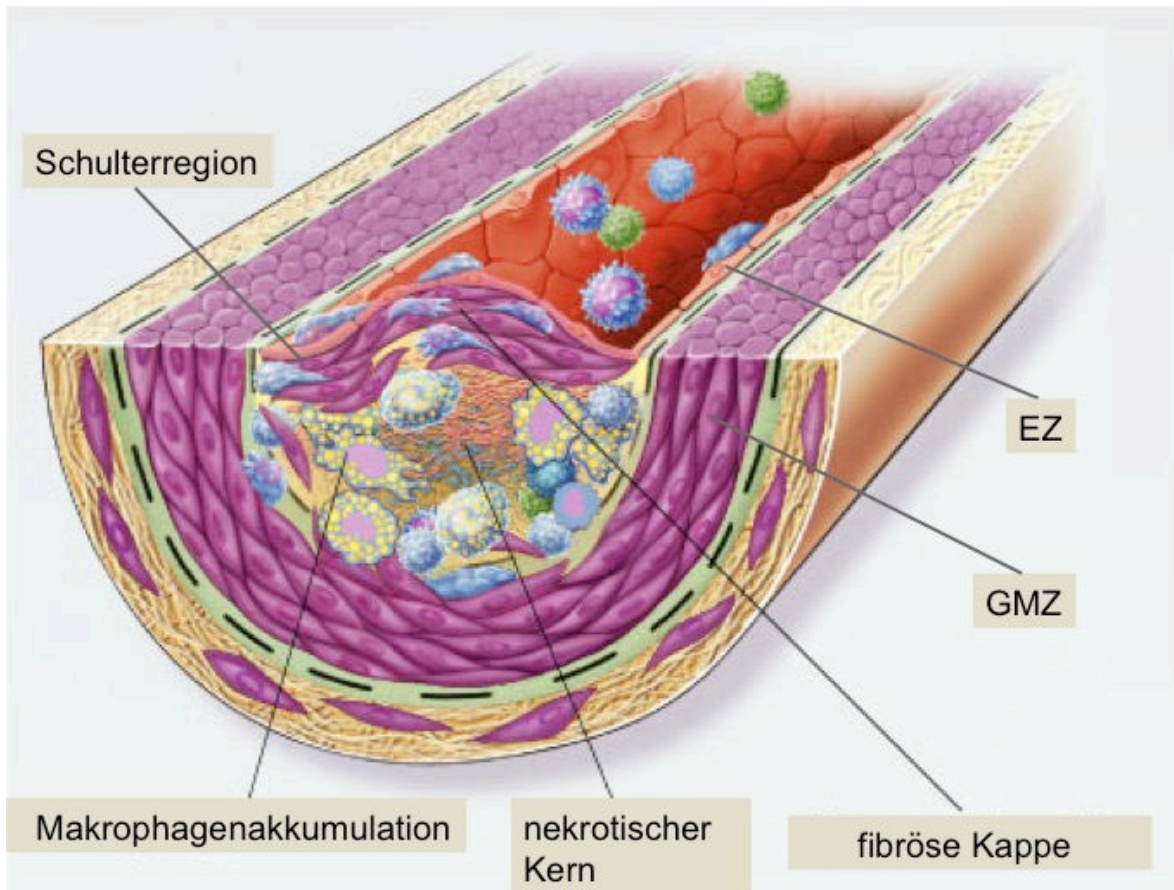


Abbildung 2: **Schematische Darstellung einer Plaque.** Details siehe Text; GMZ = glatte Muskelzellen, EZ = Endothelzellen; *modifiziert nach Ross R 1991 (32), © Massachusetts Medical Society.*

1.2.5 M1- und M2- Makrophagen

Makrophagen differenzieren sich aus Monozyten, die im Knochenmark gebildet werden und im Blut zirkulieren. Monozyten sind Teil des angeborenen Immunsystems, die sich je nach Bestimmungsort in eine spezialisierte Zelle differenzieren. Im Knochen werden sie so z.B. zu Osteoklasten, in der Leber hingegen zu Kupfferzellen. Sie spielen eine zentrale Rolle in der T-Zell vermittelten Immunantwort, indem sie Fremdproteine aufnehmen, diese prozessieren und deren Peptide an ihrer Oberfläche exprimieren, die dann von T-Zellen als Antigene erkannt werden. Eine weitere Funktion der Makrophagen ist die Phagozytose von pathogenen Mikroorganismen. Mittels Chemotaxis gelangen Makrophagen an den Ort des Geschehens und dienen dort der Aufnahme und Verarbeitung von Fremdmaterial. Auch körpereigenes Material, wie alternde Zellen und Zelldetritus werden von den Makrophagen eliminiert (33).

Unter Einsatz von Antikörpern gegen Makrophagen-spezifische Oberflächenmoleküle können diese Zellen mittels Durchflusszytometrie von anderen Blutzellen isoliert werden. Diese Oberflächenrezeptoren beinhalten Glykane (CD206), Lipopolysaccharide (LPS) (CD14), Toll-like-Rezeptoren (TLR) und Scavenger-Rezeptoren (CD68, CD163, CD204),

und sind an unterschiedlichen Funktionen beteiligt. Makrophagen lassen sich in zwei grundlegend unterschiedliche Klassen einteilen: in die klassisch aktivierten, pro-inflammatorischen M1- und die alternativ aktivierten, anti-inflammatorischen M2-Makrophagen (s. Abbildung 3).

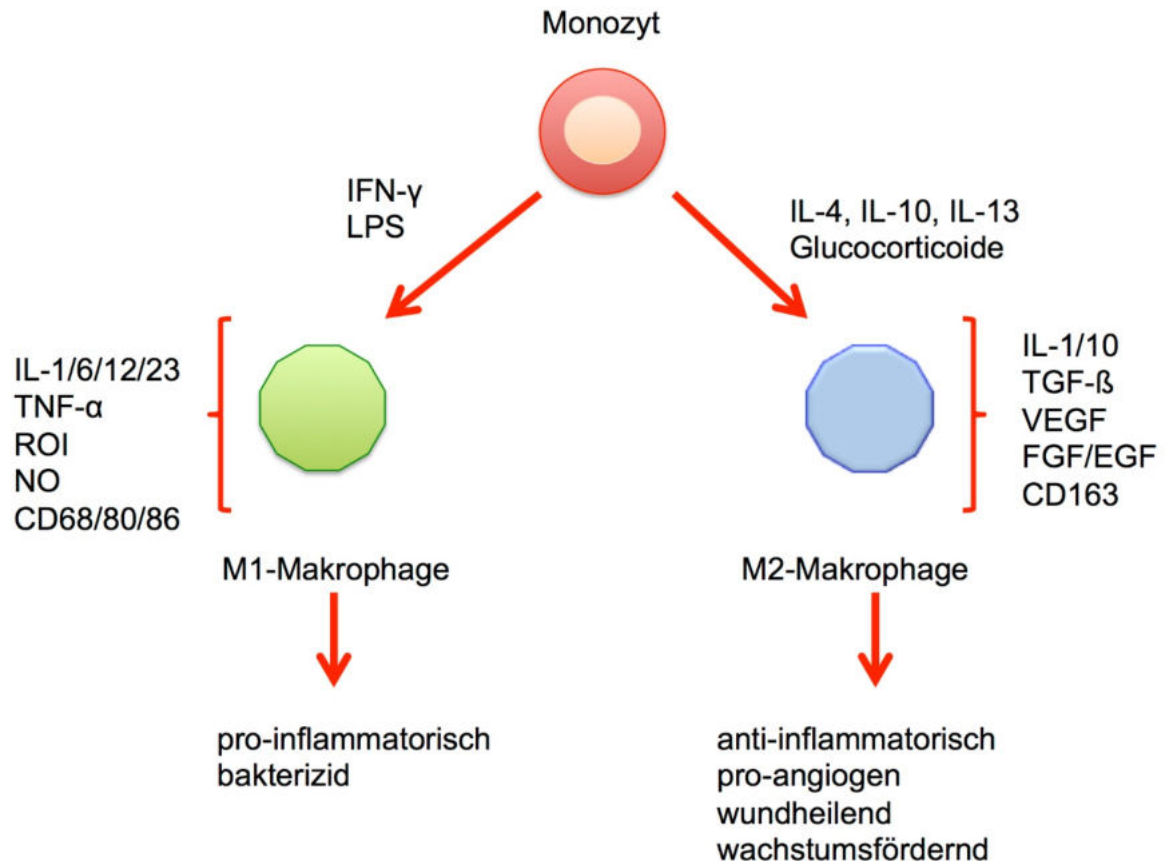


Abbildung 3: **Binäre Klassifikation von M1- und M2-Makrophagen.** Die Abbildung zeigt schematisch die Differenzierung in M1- und M2- Makrophagen. Durch die angegebenen Stimuli (Substanzen neben dem Pfeil) werden charakteristische Oberflächenrezeptoren (eckige Klammer) produziert, die dann unterschiedliche Funktionen im Gewebe auslösen. Abkürzungen: IL= Interleukin, IFN- γ = Interferon-Gamma, LPS = Lipopolysaccharide, TNF- α = Tumornekrosefaktor-alpha, ROI = Reactive Oxygen Intermediates, FGF = Fibroblast Growth Factor, EGF = Epidermal Growth Factor, *modifiziert nach Sica et al (34)*

M1-Makrophagen besitzen eine pro-inflammatorische Wirkung, indem sie Interleukine (IL-1/6/12) und TNF- α produzieren und damit eine Immunreaktion Typ-I auslösen. Durch die Ligandenbindung werden erhöht toxische Intermediate wie NO und ROI (reactive oxygen intermediates) freigesetzt, die die inflammatorische Reaktion aufrechterhalten. Zusätzlich besitzen M1-Makrophagen durch die Rezeptoren CD80 und CD86 die Fähigkeit zur Antigenpräsentierung sowie durch CD68 die Fähigkeit zur Phagozytose (s.u.) (21, 34).

M2-Makrophagen exprimieren Rezeptoren für anti-inflammatorisch wirkende Zytokine wie IL-10. Nach Bindung von Wachstumsfaktoren wie dem VEGF (vascular endothelial growth factor) oder FGF/EGF (fibroblast growth factor/endothelial growth factor) stimulieren sie die

Wundheilung, wirken pro-angiogen und fördern die Gewebsreparatur (s. Abbildung 3) (34). Im Gegensatz zu den M1-Makrophagen hemmen sie durch Induktion der Arginase 1 (Arg I) die Produktion von NO.

M1- und M2-Makrophagen exprimieren unterschiedliche Antigene und lassen sich so in Gewebeschnitten immunhistochemisch unterscheiden. Diese Klassifizierung repräsentiert allerdings nicht das volle Ausmaß der funktionellen Stadien der Makrophagen und stellt lediglich eine Vereinfachung dar.

CD68 ist ein lysosomal assoziiertes Glykoprotein (LAMP = lysosomal associated membrane protein), das auf allen humanen Monozyten und Gewebsmakrophagen aber auch in Langerhanszellen, Kupferzellen, Mikroglia, Osteoklasten, Histozyten und plasmazytoid dendritischen Zellen exprimiert wird. Es gehört zur Familie der Scavenger Rezeptoren und befindet sich besonders bei den Makrophagen intrazellulär, kann jedoch auch mit seiner glykolysierten Domäne an der Zelloberfläche gebunden vorkommen. Oxidiertes LDL, sowie Lektine und Selektine sind Liganden für CD68. Aufgabe CD68-positiver Zellen ist die Beseitigung von Zelldebris und die Förderung der Phagozytose. Außerdem vermitteln sie die Rekrutierung und Aktivierung von Makrophagen.

CD163 gehört ebenfalls der Familie der Scavenger Rezeptoren an. Durch die Anwesenheit von pro-inflammatorischen Mediatoren (LPS, IFN- γ , TNF- α) wird die CD163-Expression herunterreguliert, wohingegen sie unter Stimulation von IL10 hochreguliert wird (s. Abbildung 3). Es spielt eine wesentliche Rolle in der anti-inflammatorischen Wirkung der Makrophagen (35).

Die Rolle der Makrophagen bei den molekularen Prozessen der Plaquebildung ist äußerst komplex, da das Differenzierungspotential von Makrophagen weit über das vereinfachte Modell in M1- und M2-Makrophagen hinausgeht. Man kann jedoch vermuten, dass M1-Makrophagen mittels ihrer pro-inflammatorischen Wirkung Plaques destabilisieren, während das Gegenteil für die anti-inflammatorischen M2-Makrophagen zutrifft (36).

1.2.6 Therapie der pAVK

Neben konservativen Maßnahmen stehen bei der Behandlung der pAVK revaskularisierende Optionen zur Verfügung. Man kann hierbei zwischen offen-operativen und perkutanen, endovaskulären Therapien unterscheiden. Das hauptsächlich angewandte, endovaskuläre Verfahren stellt die Ballonangioplastie dar (PTA, perkutane transluminale Angioplastie), bei der das betroffene Gefäß mittels eines Ballonkatheters erweitert wird und ggf. durch eine Stentversorgung unterstützt wird.

Offen-operativ stehen ebenfalls verschiedene Optionen zur Verfügung. Im Rahmen der Bypass-Chirurgie wird der erkrankte Gefäßabschnitt mittels künstlicher Prothese oder

körpereigenem Material überbrückt. Meist werden langstreckige Verschlüsse in dieser Form behandelt (37).

Für kurzstreckige Pathologien wie bei isoliertem Befall der Leistengefäße bietet sich die Thrombendarteriektomie (TEA) an. Erstmals erfolgreich wurde die TEA 1946 von dem portugiesischen Chirurgen Jiao Cid Dos Santos durchgeführt, nachdem zuvor Versuche von Severeanu (1880), Jianu (1909) und Delbet (1906) scheiterten. Bei dieser Technik wird der erkrankte Gefäßanteil in der Media entfernt. Im Rahmen der direkten TEA wird das Gefäß längs eröffnet, sodass die stenosierende Plaque mit einem proximalen und distalen Sicherheitsabstand zum gesunden Gefäßabschnitt herausgeschält werden kann. Die indirekte TEA, auch halboffene oder geschlossene Ringdesobliteration genannt, wird vorzugsweise bei langstreckigen Läsionen sowie im Bereich der A. iliaca durchgeführt. Hierbei wird über einen distalen oder proximalen Zugang ein Ringstripper eingeführt, um den Verschlusszylinder in der Media unter Rotationsbewegungen zu entfernen. Nach Längseröffnung einer Arterie erfolgt der Verschluss in der Regel mit einem Flicker (Patch) aus autogenem Venenmaterial, Kunststoff oder Rinderperikard.

1.3 Sphingosin-1-Phosphat und seine Rezeptoren

1.3.1 Sphingosin-1-Phosphat

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) gehört der Gruppe der Sphingolipide an und übt vielfältige Funktionen in der Zelle aus. Sphingolipide sind einerseits strukturelle Bestandteile der Zellmembran, können andererseits aber auch verschiedene zelluläre Prozesse regulieren. S1P entsteht intrazellulär aus Sphingomyelin. Die Sphingomyelinase spaltet einen Phosphocholinrest ab, wodurch Ceramid entsteht (s. Abbildung 4). Die Ceramidase deazetyliert Ceramid, wodurch Sphingosin entsteht. Sphingosin wird durch die Sphingosinkinasen (SPHK1 und SPHK2) zu S1P phosphoryliert (38). S1P kann aber auch durch eine *de-novo*-Synthese aus Serin und Palmitoyl-CoA entstehen, wobei auf diesem Syntheseweg als Zwischenprodukt ebenfalls Ceramid gebildet wird. Der erste Schritt besteht in einer Kondensationsreaktion von Palmitoyl-CoA und Serin, die von der Serin-Palmitoyltransferase katalysiert wird (s. Abbildung 4).

S1P kann auf unterschiedlichen Wegen abgebaut werden. Dabei wird es entweder durch die S1P-Lyase irreversibel in Phosphoethanolamin und 2-Hexadecenal gespalten oder durch S1P-Phosphatasen dephosphoryliert (39).

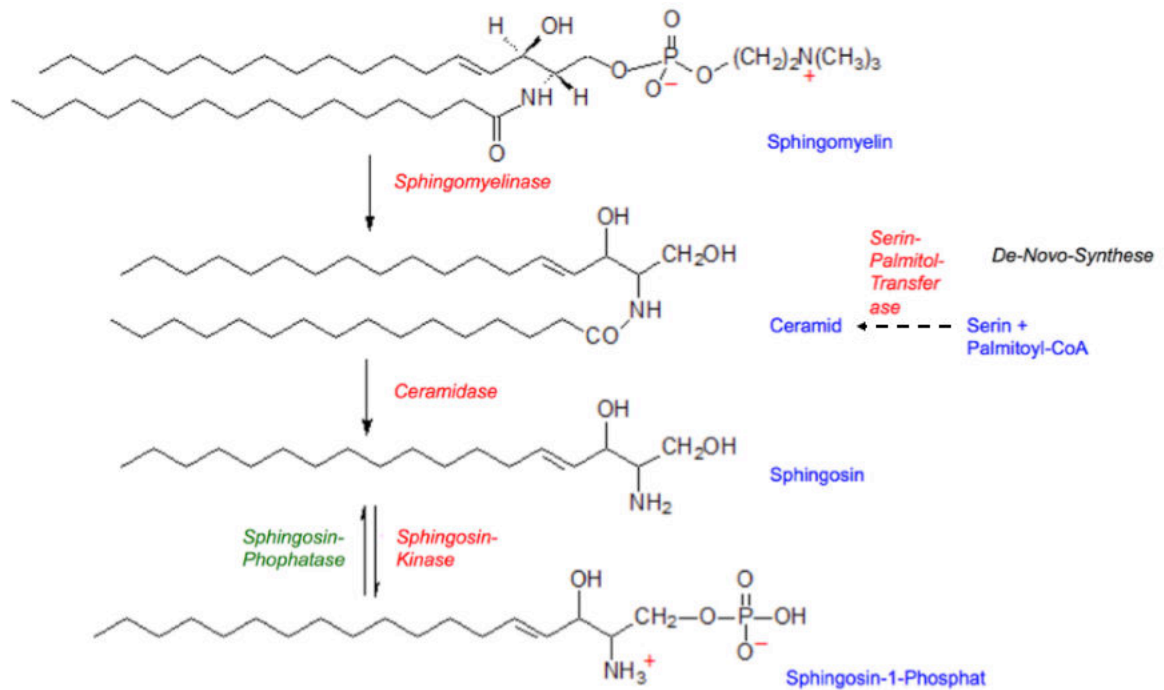


Abbildung 4: **Biosynthese von S1P**. Gezeigt werden der Syntheseweg aus Sphingomyelin und die *de-novo*-Synthese aus Serin und Palmitoyl-CoA. In beiden Wegen wird Ceramid gebildet, welches nachfolgend zu Sphingosin deacetyliert wird. Sphingosin wird von Sphingosinkinasen zu S1P phosphoryliert (38, 40).

S1P wird unter physiologischen Bedingungen vor allem von Erythrozyten, Thrombozyten und Endothelzellen synthetisiert und sezerniert (41, 42) (s. Abbildung 5). Im Blut kommt es am häufigsten an HDL (High-density-Lipoprotein) gebunden vor (ca. 60%), gefolgt von Albumin (ca. 30%), LDL und VLDL (ca. 10%) (41, 43, 44). Das Bindepotein des S1P im HDL ist Apolipoprotein M (ApoM) (s. Abbildung 5).

Im Plasma herrschen S1P-Konzentrationen von ca. 1 μmol vor, wohingegen die Konzentrationen in Lymphknoten (femtomolarer Bereich) sowie in der Lymphflüssigkeit (pikomolarer Bereich) deutlich geringer sind. Dadurch entsteht ein S1P-Gradient, der essentiell für den Lymphozytenegress von lymphatischem Gewebe ins Blut ist (42, 45). Es wurde gezeigt, dass der Level an S1P im Serum an pAVK erkrankter Patienten sowie im Serum von Patienten mit relevanter Karotisstenose im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe (Blutspender) erniedrigt ist (46).

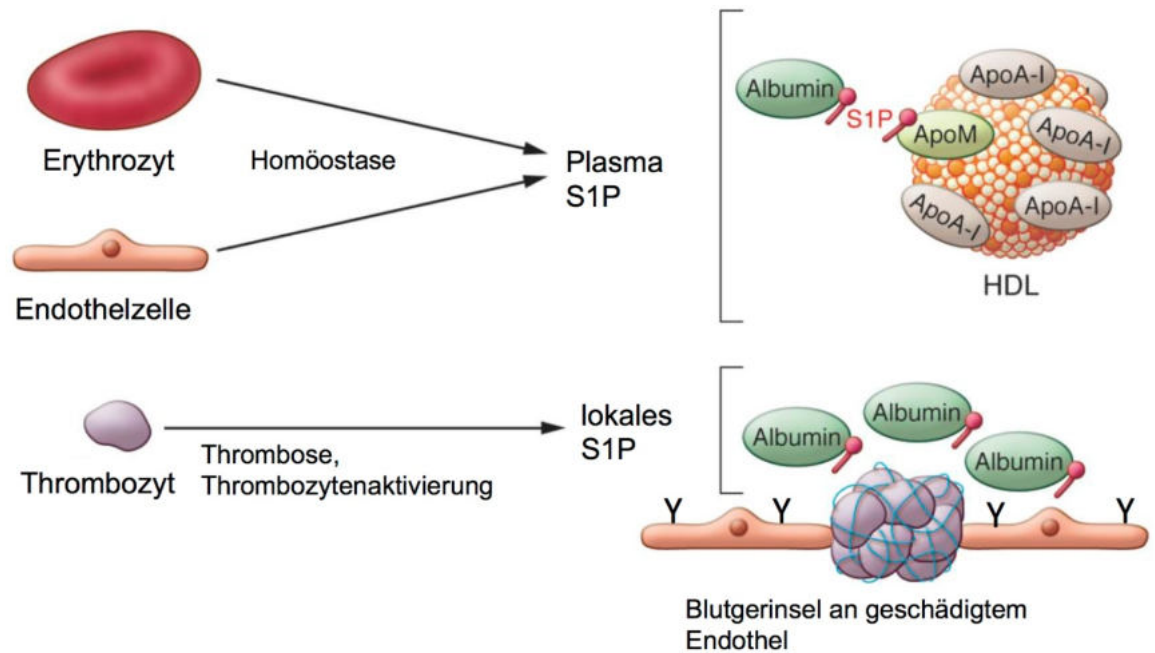


Abbildung 5: **Zelluläre Quellen des Plasma-S1P**: Endothelzellen und Erythrozyten setzen S1P frei, welches im Plasma an Albumin und ApoM, einem Bestandteil des HDL, gebunden vorliegt. Eine Schädigung des Endothels führt zu einer Thrombozytenaktivierung und Aggregation, wobei S1P freigesetzt wird. ApoM = Apolipoprotein M; *modifiziert nach Proia und Hla (44)*

1.3.2 Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren

S1P entfaltet seine biologische Wirkung über Bindung an fünf spezifische Rezeptoren S1PR1, S1PR2, S1PR3, S1PR4 und S1PR5. S1PR1, -2 und -3 werden ubiquitär exprimiert, wohingegen S1PR4 und -5 lediglich in der Lunge, der Haut, dem Gehirn und in lymphoidem Gewebe, wie das der Milz und des Thymus nachweisbar sind.

S1P-Rezeptoren gehören der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) an. GPCR bestehen aus sieben Transmembranhelices und liegen im nicht-aktivierten Zustand gebunden an ein G-alpha Protein vor. Anhand ihrer Aminosäuresequenzen und unterschiedlichen Funktionen lassen sich die α -Untereinheiten in drei Gruppen unterteilen: $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ und $G\alpha_{12/13}$. Während S1PR1 ausschließlich an das $G\alpha_i$ -Protein koppelt, koppeln S1PR2 und S1PR3 hauptsächlich an $G\alpha_{12/13}$ bzw. $G\alpha_q$. Damit wird offensichtlich, dass die biologische Wirkung von S1P auf Zellen davon abhängt, welcher S1P-Rezeptor dominant exprimiert wird. Die wichtigsten Signalwege der S1PR1, S1PR2 und S1PR3 sind in Abbildung 6 zusammengefasst (47).

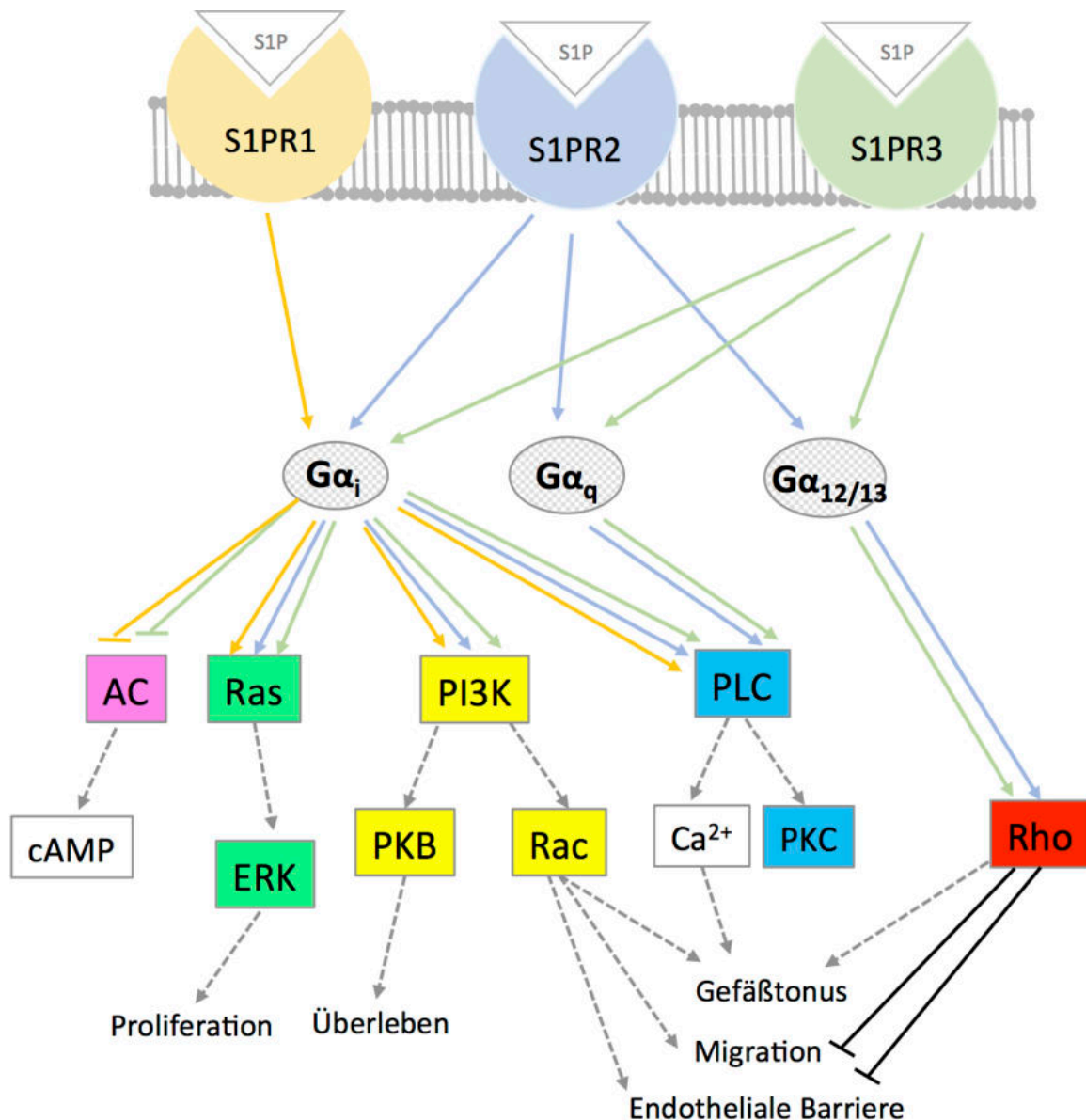


Abbildung 6: **S1P-Rezeptoren 1-3, Signaltransduktionswege.** Durch die unterschiedliche Kopplung der S1PR1-3 an Gα_i, Gα_q und Gα_{12/13} werden verschiedene Signaltransduktionswege stimuliert: Gα_i aktiviert die GTPase Ras sowie ERK und fördert die Proliferation; die Aktivierung von Pi3K und PKB schützt vor Apoptose; die Induktion von Pi3K und Rac stimuliert die Migration und die endotheliale Barrierefunktion. Gα_q aktiviert die Phospholipase C (PLC), was zur intrazellulären Kalziumausschüttung führt und die GMZ zur Kontraktion befähigt (Gefäßtonus). Rho Aktivierung durch Gα_{12/13} erhöht die Gefäßpermeabilität durch Ausbildung von Stressfasern (kontraktile Aktinfilamentbündel) im Endothel (48) und wirkt hemmend auf die Migration der GMZ. PLC = Phospholipase C; Pi3K = Phosphatidylinositol-3-Kinase; PKB = Proteinkinase B; AC = Adenylatcyclase; cAMP = cyclisches Adenylatcyclat; PKC = Proteinkinase C; ERK = extracellular-signal regulated kinase; *modifiziert nach Brinkmann V; 2007 (47) und Nagahashi M et al.; 2014 (49).*

1.3.2.1 Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 1

Der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 1 (S1PR1) wird vor allem im ZNS, in Lymphozyten und im Endothel exprimiert und reguliert verschiedene biologische Prozesse im Immunsystem, dem kardiovaskulären System und dem zentralen Nervensystem (50).

In Mäuseversuchen wurde gezeigt, dass ein genetischer Knockout des S1PR1 aufgrund intrauteriner Blutungen embryonal letal ist. Dieser Effekt wurde in nachfolgenden Experimenten dem endothelialen S1PR1 zugeschrieben, da ein Endothel-spezifischer Knock-out zum gleichen Ergebnis führte (51).

Teil der endothelialen Barriere ist die Glykokalyx, eine Proteoglykan-reiche Schicht, die dem Endothel aufliegt. Versuche mit kultiviertem Rattenendothel zeigten, dass die Glykokalyx in Abwesenheit von Albumin instabiler wurde und sich ablöste (52). Da Albumin eines der Hauptbindepoteine für S1P ist, wurde untersucht, inwieweit S1PR1 daran beteiligt ist. Der Einsatz des selektiven S1PR1 Antagonisten W146 führte zu einer signifikanten Abnahme von CS (Chondroitinsulfat) und HS (Heparansulfat), zwei Glykosaminoglykanen, die Bestandteil der Seitenketten von Proteoglykanen sind. Dadurch konnte gezeigt werden, dass nicht Albumin, sondern S1PR1 die entscheidende Rolle bei der Stabilisierung und dem Erhalt der endothelialen Glykokalyx spielt (52). Außerdem verstärkt S1PR1 über eine Aktivierung von Rac Zell-Zell-Kontakte und damit die endotheliale Barriere (53, 54). S1P stimuliert über S1PR1 sowie S1PR3 die eNOS (55, 56) und wirkt so über den nachgeschalteten PI3/Akt-Signaltransduktionsweg anti-apoptotisch auf die Endothelzellen (57-59).

In der Immunologie spielt S1PR1 im Hinblick auf die Lymphozytenrezirkulation eine bedeutende Rolle. Der S1PR1 auf der Oberfläche von B- und T-Lymphozyten wird für das Verlassen dieser Zellen aus lymphatischen Organen benötigt. Einem S1P-Gradienten folgend, den die Zellen mittels S1PR1 detektieren, gelangen sie aus lymphatischen Geweben mit niedriger S1P-Konzentration über die Lymphflüssigkeit ins Plasma, wo eine hohe S1P-Konzentration herrscht (42, 45, 60, 61). Fingolimod (FTY720), welches heute für die Therapie der schubförmigen Multiplen Sklerose eingesetzt wird, wirkt immunsuppressiv, da es zu einer Internalisierung des S1PR1 führt. Nach Phosphorylierung von FTY720 durch die SPHK2 entsteht FTY720-Phosphat, welches als Agonist von S1PR1, -3, -4, und -5 fungiert. Nach Bindung von FTY720-Phosphat an S1PR1 wird der Rezeptor internalisiert und degradiert, was zu einem Verlust von S1PR1 auf der Zelloberfläche führt und die Zellen so den S1P Gradienten nicht mehr wahrnehmen können und im lymphatischen Gewebe verbleiben. Dies spiegelt sich im Blutbild als periphere Lymphopenie wider (60) und bewirkt eine Inhibition der autoimmunen Entzündung bei der Multiplen Sklerose (44). Da es sich bei der Atherosklerose ebenfalls um eine chronische Entzündungsreaktion handelt, könnte S1PR1 auch hier von Bedeutung sein. Die Behandlung mit FTY720-Phosphat und dem S1PR1-Agonisten KRP-203 zeigte in Studien an LDL-Rezeptor-Knockout- und ApoE-Knockout-Mäusen tatsächlich eine Reduktion atherosklerotischer Läsionen und eine verminderte Anzahl an Makrophagen in den Plaques (62-64).

1.3.2.2 Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 2

Der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 2 (S1PR2) wird im Körper bevorzugt im Nerven-, Herzkreislauf- und Immunsystem exprimiert. Ein S1PR2 Knockout in Mäusen führt 2-4 Wochen nach Geburt zu Innenohrschäden, die schließlich in einer Gehörlosigkeit der Mäuse enden (44, 65, 66). Zurückzuführen ließ sich diese Beobachtung auf die Funktion der Regulation des Gefäßtonus durch S1PR2. Indem S1PR2 über die GMZ eine Vasokonstriktion in der A. spiralis modioli bewirkt, wird die Stria vascularis des Innenohrs vor erhöhten Blutdrücken geschützt.

Auf GMZ und Makrophagen wirkt S1PR2 anti-migratorisch und anti-proliferativ. Die Aktivierung des Rho-Signalwegs führt zu einer Expression von Differenzierungsgenen und damit zu einer Hemmung der Migration und des Wachstums (57, 67, 68).

Im Gegensatz zum S1PR1 schwächt S1PR2 die endotheliale Barriere, indem er Zell-Zell-Verbindungen abschwächt und dadurch die Permeabilität erhöht (69). In *in vitro* Versuchen mit humanen Umbilikalvenen führte der Einsatz des S1PR2-Antagonisten JTE013 zu verstärkten Zell-Zell-Verbindungen und einer verminderten Gefäßpermeabilität (70).

Dem S1PR2 werden im Gegensatz zum S1PR1 pro-inflammatorische und pro-atherosklerotische Effekte zugeschrieben. Im murinen Atherosklerosemodell wurde in ApoE/S1PR2 Doppel-Knockout-Mäusen eine geringere Plauebildung im Vergleich zu ApoE-Knockout-Mäusen beobachtet, was für eine pro-atherogene Wirkung des S1PR2 spricht (71).

1.3.2.3 Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 3

In manchen Funktionen verhält sich S1PR3 synergistisch zu S1PR1. Darunter fällt unter anderem die Aktivierung der eNOS (55, 59, 72, 73). Während der endotheliale S1PR3 über Aktivierung der eNOS die Gefäßwand dilatiert, scheint er auf GMZ einen gegenteiligen Effekt auszuüben: über einen G_q vermittelten Anstieg des Kalziumspiegels in den GMZ kommt es hier zu einer Vasokonstriktion (74). Zudem besitzt S1PR3 wie auch für den S1PR1 beschrieben pro-migratorische und proliferative Effekte auf Makrophagen, EZ und GMZ (76, 77). ApoE/S1PR3-Knockout-Mäuse nach Western-Diät zeigten im Vergleich zur ApoE-Knockout-Kontrolle eine verringerte Anzahl an Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen, wohingegen das Ausmaß der Läsionen interessanterweise unbeeinflusst blieb (75). Antagonistisch zu S1PR1 und synergistisch mit S1PR2 schwächt S1PR3 die endotheliale Barriere (76).

Effekte des S1PR1, S1PR2 und S1PR3 in Bezug auf das Gefäßsystem werden in Tabelle 2 zusammengefasst.

Rezeptor	Effekte im Gefäß
S1PR1	<ul style="list-style-type: none"> • Gefäßreifung (EZ) (45, 51, 77, 78) • endotheliale Barriere ↑ (39, 52) • Lymphozyten-Egress ↑ (44, 60, 61) • Gefäßtonus (Vasodilatation über EZ; eNOS ↑) (55-57) • Zellüberleben ↑ (EZ)(57) • Migration ↑ (GMZ, Makrophagen)(57, 62, 63, 74, 79) • Proliferation ↑ (GMZ, EZ) (57, 62, 63, 74, 79) • Anti-inflammatorisch (Makrophagen) (80)
S1PR2	<ul style="list-style-type: none"> • Gefäßtonus (Vasokonstriktion über GMZ; eNOS ↓) (44, 65, 66) • endotheliale Barriere ↓ (69) • Pro-inflammatorisch (66, 71) • Migration ↓ (GMZ, Makrophagen)(57, 66, 68, 79) • Proliferation ↓ (GMZ, Makrophagen) (57, 66, 68, 79, 81)
S1PR3	<ul style="list-style-type: none"> • endotheliale Barriere ↓ (76) • Gefäßtonus (Vasodilatation über EZ (eNOS ↑) (55, 59), Vasokonstriktion über GMZ (74) • Migration ↑ (Makrophagen, EZ, GMZ) (57, 72, 75) • Proliferation ↑ (EZ, GMZ) (72, 73)

Tabelle 2: **Effekte der S1P-Rezeptoren S1PR1, S1PR2 und S1PR3 im Gefäß.** EZ = Endothelzellen, GMZ = glatte Muskelzellen, NO = Stickstoffmonoxid, eNOS = endotheliale NO-Synthase

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Proben

Untersucht wurden Proben von 18 Patienten, die zur Behandlung einer pAVK einer Thrombendarteriektomie der A. femoralis und/oder der A. iliaca zugeführt wurden. Sämtliche Eingriffe wurden in der Klinik und Poliklinik für Gefäßmedizin des Universitären Herzzentrums Hamburg durchgeführt. Bei den Präparaten handelt es sich um Plaques, die mittels einer TEA gewonnen wurden. Alter, Geschlecht und Stadium der pAVK der eingeschlossenen Patienten wurden erfasst und die Daten anschließend anonymisiert.

Als gesunde Kontrolle wurde eine Probe eines Verstorbenen 23-jährigen analysiert, der an keiner kardiovaskulären Vorerkrankung litt. Diese Probe stammt aus der Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Die Studie wurde von der Ethikkommission Hamburg genehmigt (PV 2435). Tabelle 3 führt das jeweils betroffene Gefäß, Alter, Geschlecht des Patienten und Stadium der Erkrankung für die verschiedenen Proben auf.

Probennummer	Gefäß	Geschlecht	Alter	pAVK-Stadium
1	A. iliaca	M	60	III
2	A. iliaca	W	70	IV
3	A. iliaca	M	64	III
4	A. iliaca	M	70	IIb
5	A. iliaca	W	NE	III
6	A. iliaca	M	60	II
7	A. femoralis	W	72	III
8	A. femoralis	M	61	II
9	A. femoralis	M	75	IIb
10	A. femoralis	W	71	IIb
11	A. iliaca	M	70	IIb
12	A. iliaca	M	80	IV
13	A. iliaca	M	50	II
14	A. femoralis	M	71	II
15	A. femoralis	M	76	IIb
16	A. femoralis	W	70	IIb
17	A. femoralis	M	70	IIb
18	A. femoralis	W	76	IIa

Tabelle 3: **Auflistung der Proben:** Lokalisation der Plaque, Geschlecht, Alter und pAVK Stadium; M = männlich; W = weiblich; NE = nicht erfasst

2.2 Methoden

2.2.1 Aufarbeitung der Präparate

Die Proben wurden unmittelbar nach Entnahme im Operationssaal in Formalin asserviert. Zunächst wurden die Gewebeproben mit einem Skalpell in eine für die Gewebekassette (7 mm³) passende Größe geschnitten. Harte Proben wurden zur Entkalkung 12-48 Stunden bei Raumtemperatur in Osteosoft (s. Tabelle 4) eingelegt.

Name	Hersteller
Ethanol 99 %	Walter CMP GmbH & Co. KG
Ethanol 96 %	Walter CMP GmbH & Co. KG
Ethanol 70 %	Walter CMP GmbH & Co. KG
Xylol z.A.	Avantor Performance Materials B.V.
Hämatoxylin	Medite
Eosin	Medite
Resorcinfuchsin	Waldeck GmbH und Co.
Weigert Hämatoxylin A	Carl Roth GmbH
Weigert Hämatoxylin B	Carl Roth GmbH
Pikrinsäure-Thiazinrot	Waldeck GmbH und Co.
Fluoromount-G	Southern Biotech
Eukitt ® quick hardening	Sigma Aldrich
Pap Pen	BioGenex
Dapi z.A. (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Carl Roth
Osteosoft	Merck Milpore
Avidin/Biotin Blocking Kit	Life technologies
Streptavidin-conjugated HRP	Detection kit Perkin Elmer
Thyramine Signal Amplification	Perkin Elmer
Pipetten	Eppendorf research
Surgical disposable Scalpel	Braun
Objektträger superfrost/plus	Assistent

Tabelle 4: Alkohole, gebrauchsfertige Lösungen und Färbematerialien

Paraffineinbettung

Die zurechtgeschnittenen Proben wurden in ihren Kassetten zur Weiterverarbeitung in Paraffin überführt. Dabei wurden sie zunächst in einer aufsteigenden Isopropanolreihe dehydriert und anschließend in Paraffin eingebettet (s. Tabelle 5). Verwendet wurde hierfür ein Gewebeeinbettautomat (Shandon Citadel 2000) (s. Tabelle 6).

Medium	Zeit in Minuten
70 % Isopropanol	50
70 % Isopropanol	60
80 % Isopropanol	60
85 % Isopropanol	60
90 % Isopropanol	60
96 % Isopropanol	60
96 % Isopropanol	60
100 % Isopropanol	90
100 % Isopropanol (42 °C)	90
Paraffin (42 °C)	120
Paraffin (56 °C)	180

Tabelle 5: Aufsteigende Isopropanolreihe für die Dehydrierung der Schnitte und anschließende Einbettung in Paraffin. Rechte Spalte: Dauer der Lagerung in Minuten

Gerät	Hersteller
Schlittenmikrotom HN 40	Reichert-Jung
Mikroskop BZ-8100	Keyence
BZ image analysis application	Keyence
ImageJ	Image Processing and Analysis in Java
Gewebeeinbettautomat	Shandon Citadel 2000

Tabelle 6. Verwendete Geräte/Software mit Name und Hersteller zur Anfertigung der Schnitte und zur Auswertung der Färbung

Nach Durchlauf der Isopropanol- und Paraffinreihe wurden die Proben mit 56°C heißem Paraffin in Blöcke gegossen. Die Paraffinblöcke wurden bei Raumtemperatur ausgehärtet und im Anschluss bei -20°C gefroren.

Herstellung histologischer Schnitte

Von den gefrorenen Paraffinblöcken wurden mit dem Schlittenmikrotom 2 µm dicke Schnitte angefertigt. Je nach Größe des Gefäßes wurden dabei zwei bis vier Schnitte angefertigt und in ein 50°C heißes Wasserbad überführt. Dann wurden die Schnitte auf beschichtete Objektträger gezogen, beschriftet und in Färbetrögen bei 37 °C über Nacht im Brutschrank getrocknet.

Entparaffinieren und Rehydrieren

Vor jeder Färbung wurde aus den getrockneten Schnitten das Paraffin gelöst, indem die Glasküvetten mit maximal 20 Objektträgern für 3 x 5 Minuten in Xylol gestellt wurden. Dann wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (2x 99%, 96%, 70% Ethanol) für je 5 Minuten rehydriert. Um den Alkohol anschließend vor der Färbung auszuwaschen, wurden die Schnitte noch für weitere 5 Minuten in destilliertes Wasser überführt (s. Tabelle 4 und Abbildung 7).

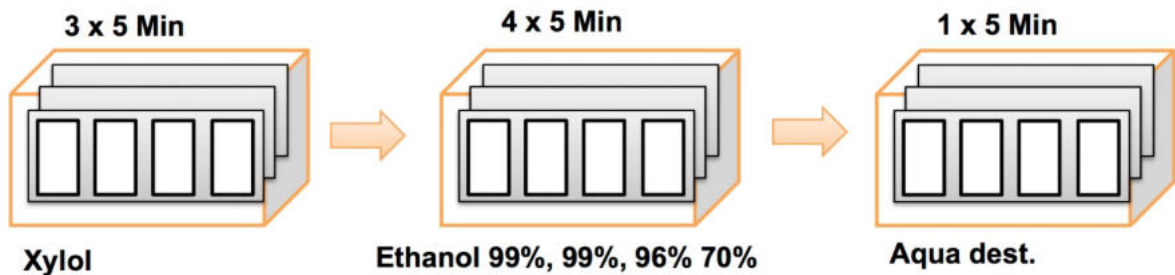


Abbildung 7: **Entparaffinieren und Rehydrieren.** Schritt 1: Entparaffinieren der Schnitte in Xylol (3 Mal für jeweils 5 Minuten) und Rehydrieren in einer absteigenden Alkoholreihe (zweimalig in 99%igem Alkohol und je einmal in 96%igem und 70%igem Alkohol für jeweils 5 Minuten). Abschließende Waschung in Aqua dest. für 5 Minuten. Dargestellt sind die Schnitte in den Küvetten. Oben: Dauer der Prozedur in Minuten; unten: verwendete Lösung.

2.2.2 Färbungen

2.2.2.1 Histologie

Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE)

Zur Übersichtsfärbung und Darstellung der Zellkerne wurden die Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Nach dem Entparaffinieren und Rehydrieren (s. Abbildung 7) erfolgte für fünf Minuten die Hämatoxylin Kernfärbung. Anschließend wurden die Schnitte für weitere zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Nach einer kurzen Überführung in Aqua dest. bedurfte es einer zehnminütigen Färbung in Eosinlösung, die für das Anfärben des Bindegewebes verantwortlich ist. Im Anschluss wurden die Schnitte in eine aufsteigende Ethanolreihe überführt (70% Ethanol, 96% Ethanol und 2 x 5 Minuten 100% Ethanol) und für 3 x 5 Minuten in Xylol gestellt. Abschließend erfolgte die Beimpfung mit dem Eindeckmittel Eukitt® quick hardening (s. Tabelle 4).

Elastica-van-Gieson-Färbung (EvG)

Zunächst wurden die Schnitte für zwanzig Minuten in Resorcinfuchsin gestellt. Danach erfolgte eine Spülung mit Leitungswasser, destilliertem Wasser und schließlich die Ausdifferenzierung in 70% Ethanol. Anschließend kamen die Schnitte für weitere 5-10 Minuten in Eisenhämatoxylin nach Weigert. Hierzu mischte man vorab zu gleichen Teilen Weigert Hämatoxylin A und Weigert Hämatoxylin B. Nach kurzem Abwaschen in destilliertem Wasser wurde die Qualität der Färbung anhand der Farbe des Zytoplasmas bewertet. Nachdem die Schnitte für ca. 10 Minuten in Leitungswasser ausgebläut wurden, inkubierte man sie für 2-5 Minuten in Pikrinsäure/Thiazinrot. Diese stellte man vorab aus 7,5 ml 1% wässriger Thiazinrot-Lösung und 100 ml gesättigter Pikrinsäure (1,2%) her. Erneut wurden die Schnitte in destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend erfolgte wie auch bei der HE-Färbung (s.o.) die Überführung in eine aufsteigende Alkoholreihe sowie in Xylol und die abschließende Konservierung.

2.2.2.2 Immunfluoreszenz

Prinzip der Immunfluoreszenzfärbung

Man unterscheidet direkte und indirekte Immunfluoreszenz. Bei der direkten Immunfluoreszenz ist der spezifische Antikörper bereits enzym-, isotyp- oder Farbstoffgekoppelt. Im Gegensatz dazu wird bei der indirekten Methode ein unkonjugierter Primärantikörper verwendet, der an das zu untersuchende Antigen der Gewebeschnitte bindet. In einem zweiten Schritt wird ein fluoreszenzfarbstoffmarkierter Sekundärantikörper hinzugegeben, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist. In dieser Arbeit wurde ausschließlich die indirekte Methode angewandt, da sie bei schwach exprimierten Antigenen generell zu besseren Färbeergebnissen führt. Da es sich um Doppelfärbungen handelt, werden jeweils zwei Primärantikörper sowie zwei Sekundärantikörper verwendet (s. Tabelle 7, Tabelle 8, Tabelle 9).

Material und Methoden

Name	Konzentration Verdünnung	Hersteller
EDG-1 Antikörper (H60) <i>Primärantikörper</i>	200 µg/ml 1:100	Santa Cruz Biotechnology
Monoclonal Anti-Actin, α Smooth muscle <i>Primärantikörper</i>	2mg/ml 1:500	Sigma Life Science
Monoclonal Mouse Anti-Human CD 163 <i>Primärantikörper</i>	40 mg/ml 1:100	Antibodies-online.com
Monoclonal Mouse Anti-Human CD 68 <i>Primärantikörper</i>	40 mg/ml 1:100	Dako
CD31 mouse-anti-human <i>Primärantikörper</i>	200 µg/ml 1:25	Dako
Rabbit-anti-human S1P1-R <i>Primärantikörper</i>	200 µg/ml 1:100	Santa Cruz

Tabelle 7: Name, Konzentration, Verdünnung und Hersteller der Primärantikörper

Name	Verdünnung	Hersteller	Emissionsspektrum	Fluoreszenzfarbstoff
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)		Carl Roth	A _{max} : 358 nm E _{max} : 461 nm	blau
Donkey-anti-rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody Alexa fluor 594	1:400 1:500	Invitrogen molecular probes	A _{max} : 591 nm E _{max} : 614 nm	rot
Rabbit-anti-mouse secondray antibody- biotinylyted	1:200	Dako		grün
Goat-anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody Alexa fluor 488	1:400	Life Technologies	A _{max} : 493 nm E _{max} : 519 nm	grün

Tabelle 8: Name, Verdünnung, Hersteller und Emissionsspektren sowie Fluoreszenzfarbstoff der DAPI-Kernfärbung sowie der Sekundärantikörper

Name	Konzentration	Hersteller
Rabbit IgG	2 µg/ml	Vector Laboratories
Mouse IgG1	100 mg/L	Vector Laboratories

Tabelle 9: Name, Konzentration und Hersteller der Isotyp-Kontrollen für die Immunfluoreszenzdoppelfärbungen

Bei Mehrfachfärbungen werden Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichen Absorptions- und Emissionsspektren verwendet. Dadurch können bei Aufnahme der Bilder unterschiedliche Antigene dargestellt werden. Die DAPI-Färbung (4',6-Diamidin-2-phenylindol) besitzt ein Emissionsspektrum von 358-461 nm und stellt die Zellkerne im Fluoreszenzfilter blau dar. Grün dargestellt sind in dieser Arbeit CD31, CD68, CD163 und SMA-positive Zellen (Emissionsspektrum: 493-519 nm). S1PR1 wird durch einen roten Fluoreszenzfarbstoff mit einem Emissionsspektrum von 591-614 nm sichtbar (s. Tabelle 8).

Nachdem die Schnitte zunächst entparaffiniert und rehydriert wurden, bestehen die nachfolgenden Schritte aus der Antigendemaskierung, der Blockierung unspezifischer Bindestellen und der Färbung.

Antigendemaskierung

Diese Prozedur dient dazu, verlorengegangene Immunreaktivität von formalinfixierten und paraffineingebetteten Geweben wiederherzustellen. Hierzu wurden die Schnitte vor der Inkubation mit Antikörpern in einer Retrieval-Lösung (Dako Target Retrieval Solution) in einem 95°C Wasserbad für 40 Minuten inkubiert (s. Tabelle 10 und Abbildung 8, Schritt 1).

Name	Hersteller
Antikörper Verdünnungspuffer	DCS Innovative Diagnostic-Systeme
TBS Puffer:	Selbst hergestellt: 6,1 g Tris-Base 8,8 g NaCl
Target Retrieval Solution (x10)	Dako

Tabelle 10: Name und Hersteller für Puffer und Lösungen

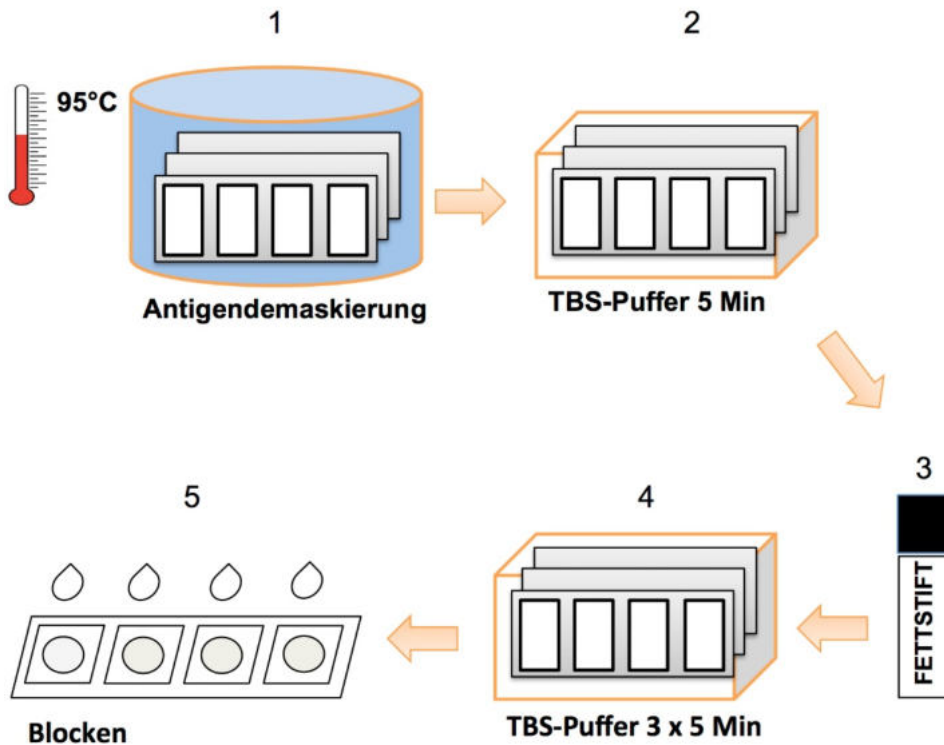


Abbildung 8: **Antigenmaskierung und Blocken**: Schritt 1: Antigenmaskierung (95°C, 40 Minuten) in einer Retrieval-Lösung zur Wiederherstellung verlorengegangener Immunität. Schritt 2: Überführen der Schnitte in TBS-Puffer für 5 Minuten und anschließendes Umranden der Schnitte mit einem Fett-Stift (Schritt 3), um ein Zusammenlaufen der Flüssigkeiten zu verhindern. Erneutes Überführen in TBS-Puffer für 3 x 5 Minuten (Schritt 4) und abschließendes Blocken (Schritt 5) der Schnitte.

Blockierung unspezifischer Bindestellen

Nach einer 5-minütigen Verweildauer in TBS-Puffer wurden die jeweils 2-4 Schnitte pro Objektträger mit einem Fett-Stift umrandet (PapPen BioGenex), um im weiteren Verlauf ein Übertritt der aufgetragenen Flüssigkeiten zu vermeiden (s. Abbildung 8, Schritt 2-3). Um unspezifische Antigene abzusättigen, werden die Schnitte mit unspezifischen Antisera inkubiert (Blocken). Hierzu werden Antisera der gleichen Spezies wie die der Sekundärantikörper verwendet (s. Tabelle 11 und Abbildung 8, Schritt 5).

Name	Hersteller
Donkeyserum 5 %	Qiagen GmbH
Proteinblock <i>normal goat-serum in PBS with preservative</i>	BioGenex
Avidin-Biotin-Blocking Kit	Life technologies

Tabelle 11: Name und Hersteller der Blockierungs-Substanz für die Immunfluoreszenzdoppelfärbungen.

Nachdem die Schnitte 20 Minuten lang geblockt wurden, wurde die Blocking-Lösung abgeklopft und die Schnitte mit dem ersten Primärantikörper (s. Tabelle 7) über Nacht bei 4°C inkubiert (luftdicht verschlossen und unter Lichtausschluss). Am nächsten Morgen wurden die Schnitte für 3 x 5 Minuten in TBS-Puffer gewaschen, um darauffolgend den ersten Sekundärantikörper (s. Tabelle 8) auf alle Schnitte aufzutragen. Die Schnitte wurden im Dunkeln für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es schloss sich erneutes Waschen in TBS-Puffer für 3 x 5 Minuten an, bevor die Schnitte für die zweite Färbung erneut für 20 Minuten geblockt wurden (s. Abbildung 8, Panel 5). Im Anschluss wurde der jeweilige zweite Primärantikörper bzw. der Antikörper für die Isotyp-Kontrolle sowie die Pufferlösung für die Negativkontrolle auf die Schnitte appliziert (s. Tabelle 9). Die Schnitte wurden jetzt lichtgeschützt und luftdicht verschlossen im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach einer Stunde wurden die Objektträger erneut für 3 x 5 Minuten in TBS-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte das Auftragen des zweiten Sekundärantikörpers, der für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss auf den Schnitten verweilte. Erneut wurden die Schnitte für 3 x 5 Minuten in TBS-Puffer gewaschen. Für die Zellkernfärbung wurden die Schnitte im letzten Schritt für eine Minute in die DAPI-Färbung überführt und anschließend erneut für 3 x 5 Minuten in TBS-Puffer gewaschen. Abschließend erfolgte die Konservierung mit dem Eindeckmedium Fluormount-G und die Bestückung mit Deckgläsern. Die getrockneten Schnitte wurden zur Konservierung bei 20°C gelagert.

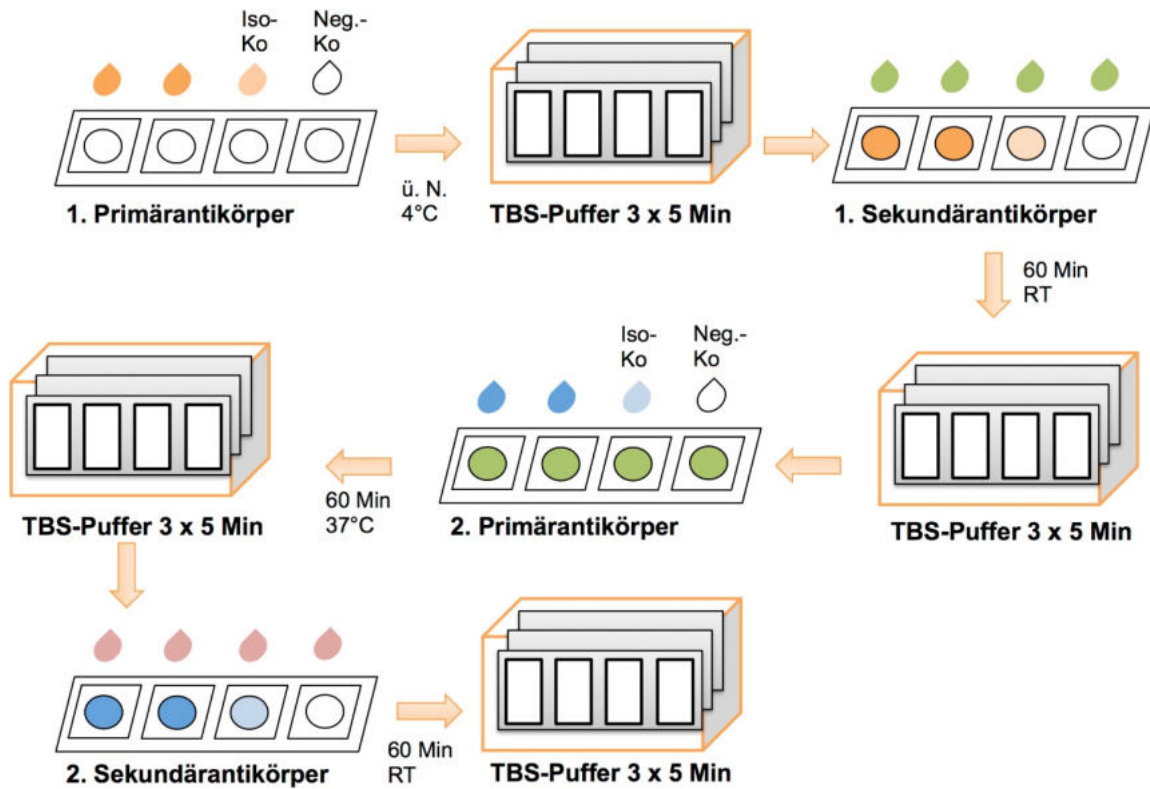


Abbildung 9: **Immunfluoreszenzdoppelfärbung:** Beimpfung der Schnitte mit dem Primärantikörper bzw. dem Antikörper der Isotyp-Kontrolle (Iso-Ko) sowie der Pufferlösung für die Negativkontrolle (Neg.-Ko) über Nacht bei 4°C. Nach Waschen in TBS-Puffer für 3 x 5 Minuten wird der erste Sekundärantikörper (hier grün) aufgetragen und verweilt 60 Minuten bei Raumtemperatur (RT) auf den Schnitten. Die Prozedur wiederholt sich für den zweiten Primärantikörper (hier blau) bzw. den zweiten Sekundärantikörper (hier rosa).

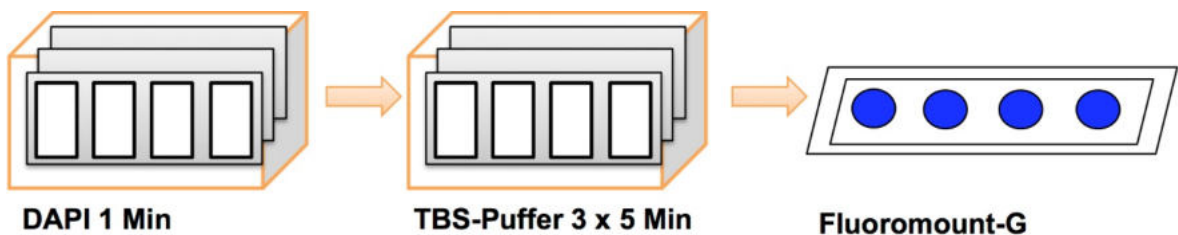


Abbildung 10: **DAPI-Zellkernfärbung:** DAPI-Zellkernfärbung: Die Schnitte werden für eine Minute in die DAPI-Zellkernfärbung überführt und anschließend für 3 x 5 Minuten in TBS-Puffer gewaschen. Abschließend werden die Schnitte mit Fluoromount-G und einem Deckgläschen versehen.

Tyramin-katalysierte Signal-Amplifikation (TSA)

Für die S1PR1/CD31-Färbung wurde die Tyramin-katalysierte Signal-Amplifikation (TSA) angewandt. Bei dieser Methode werden in Mehrfachfärbungen Signale mittels Thyramin verstärkt, um so ein besseres Färbeergebnis zu erreichen. Das Verfahren basiert ebenfalls auf der Methode der Immunfluoreszenz (s. Abbildung 11). Auf das zu untersuchende Gewebe wird ein Primärantikörper aufgebracht, an den ein gegen den Primärantikörper

gerichteter Sekundärantikörper bindet. Der Sekundärantikörper ist biotinyliert, sodass eine Enzym-Substrat-Reaktion ausgelöst wird. Katalysator der Reaktion ist die Horseradish-Peroxidase (HRP), die durch Streptavidin (SA) an das Biotin bindet. Durch Hinzugabe einer Amplifikationsreagenz (TSA-Kit) kommt es zur Signalverstärkung (T) (s. Abbildung 11).

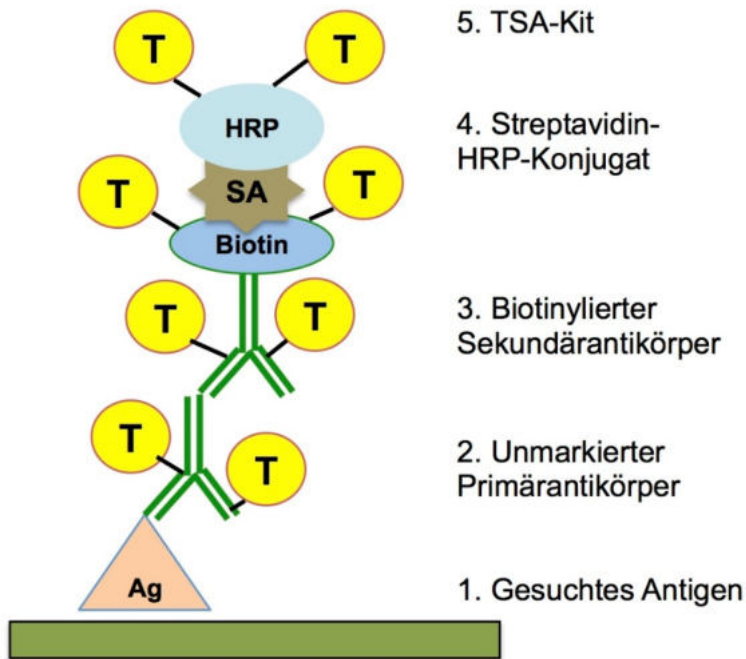


Abbildung 11: Prinzip der Tyramin-katalysierten Signal-Amplifikation (TSA)

Ab Schritt 3 (s. Abbildung 8) unterscheidet sich die TSA-Färbung wie folgt von der klassischen Immunfluoreszenzdoppelfärbung: zu Beginn wird die endogene Peroxidase mit 3% H_2O_2 gehemmt und anschließend werden die Schnitte für 3 x 5 Minuten in TBS-Puffer überführt. Es folgt die Beschichtung mit Avidin und Biotin für je 5 Minuten, um Avidin- und Biotin-ähnliche Substanzen zu blocken. Anschließend erfolgt ein erneutes Waschen in TBS-Puffer für 3 x 5 Minuten und die Inkubation mit dem 1. Primärantikörper (CD31 mouse-anti-human) über Nacht bei 4°C. Nach Waschen in TBS-Puffer für 3 x 5 Minuten, werden die Schnitte mit dem 1. biotinylierten Sekundärantikörper (rabbit-anti-mouse) für 45 Minuten bei Raumtemperatur beimpft und anschließend erneut für 3 x 5 Minuten in TBS-Puffer überführt. Es folgt die Beschichtung mit Streptavidin-conjugated Horse-radish-Peroxidase für 30 Minuten bei Raumtemperatur, ein erneutes Waschen in TBS-Puffer für 3 x 5 Minuten, das Auftragen des Amplifikationsreagenzes für 3 Minuten, das Waschen in TBS-Puffer für 3 x 5 Minuten, die Blockierung mit 5% Eselserum für 20 Minuten bei Raumtemperatur, das Abklopfen und schließlich die Beimpfung mit dem 2. Primärantikörper (rabbit-anti-human S1P1-R) bei 37°C für 60 Minuten. Abschließend erfolgt ein erneutes Waschen in TBS-Puffer für 3 x 5 Minuten, die Inkubation mit dem 2. Sekundärantikörper (donkey-anti-rabbit

Alexa fluor 594) für 60 Minuten bei Raumtemperatur und das Überführen der Schnitte in TBS-Puffer für 3 x 5 Minuten (s. Abbildung 12).

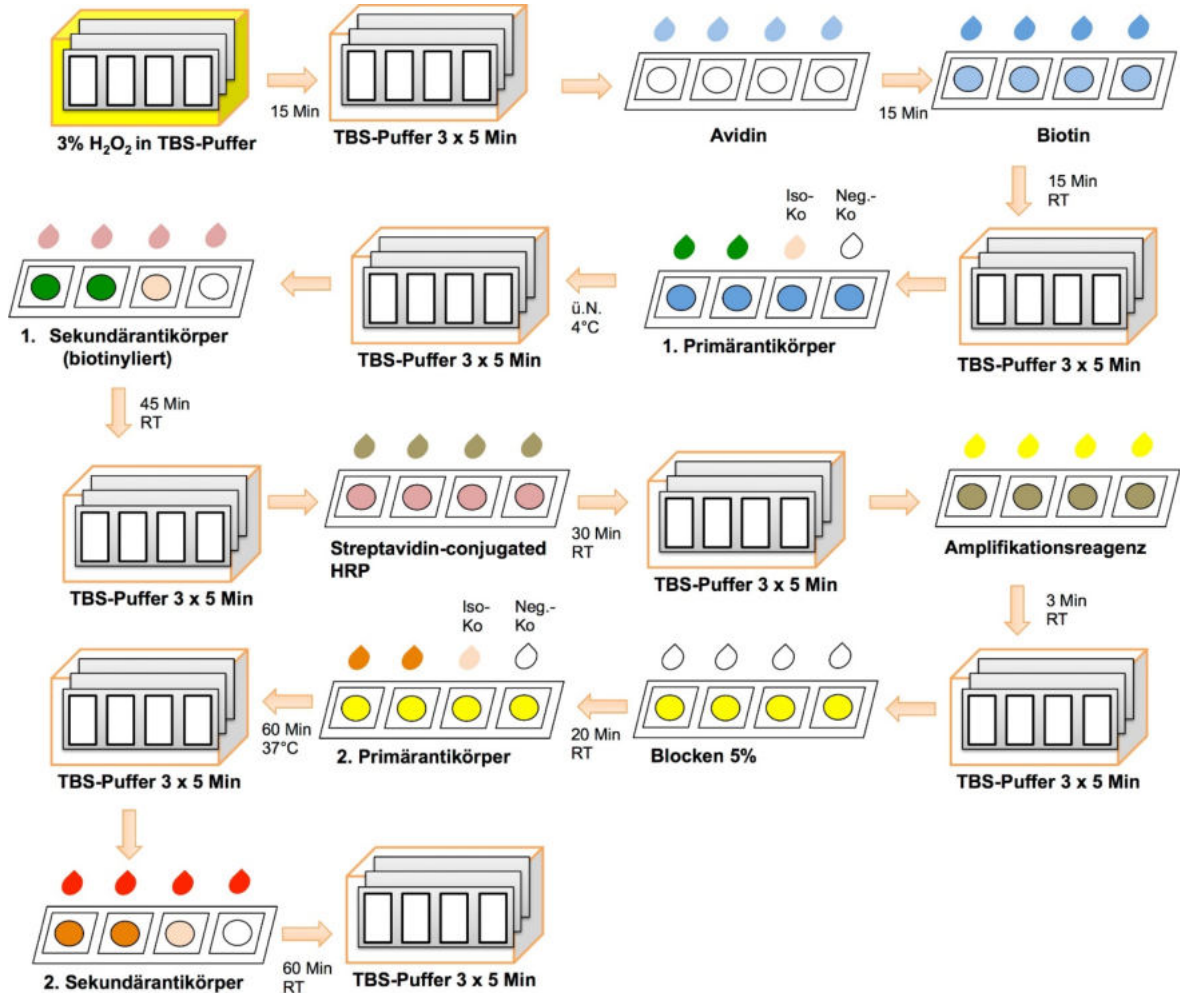


Abbildung 12: **TSA-Färbung**. Hemmung der endogenen Peroxidase (H_2O_2), Blockierung von Avidin- und Biotin-ähnlichen Substanzen, Beimpfung der Schnitte mit dem 1. Primärantikörper sowie dem biotinyliertem 1. Sekundärantikörper. Zugabe von Streptavidin-conjugated HRP sowie der Amplifikationsreagenz und abschließende Beimpfung der Schnitte mit dem 2. Primär- bzw. Sekundärantikörper.

Isotyp- und Negativ-Kontrolle

Bei der Immunfluoreszenzfärbung sowie bei der TSA-Färbung wurden pro Objektträger eine Negativ- sowie eine Isotyp-Kontrolle mitgeführt. Bei der Negativ-Kontrolle wird anstelle des Primärantikörpers Antikörper-Verdünnungspuffer (s. Tabelle 10) verwendet. Hiermit werden unspezifische Signale sichtbar. Mit der Isotyp-Kontrolle wird der Schwellenwert für ein positives Signal bestimmt, indem unspezifische Bindungsstellen des Primärantikörpers dargestellt werden (s. Tabelle 9)

2.2.3 Bilddokumentation

Die gefärbten Schnitte wurden bei -20°C gelagert und bereits am Folgetag fotografiert, um einem Ausbleichen des Fluorchroms zuvorzukommen. Die Auswertung erfolgte am Mikroskop (Mikroskop BZ-8100, Keyence) bei insgesamt 400-facher Vergrößerung (40x Objektiv-, 10x Okularvergrößerung). Zunächst wurde die Beleuchtung des Mikroskops so eingestellt, dass die unspezifischen Immunreaktionen und Hintergrundartefakte der Negativkontrolle nicht mehr zu erkennen waren. Um auszuschließen, dass es sich bei positiven Färbesignalen um Artefakte oder unspezifische Bindungen handelte, erfolgte pro Schnitt ein Abgleich mit der Isotyp-Kontrolle. Vorausgesetzt, dass die Isotyp-Kontrolle an der zu untersuchenden Stelle negativ war, wurde das Signal im Präparat als positiv bewertet.

2.2.4 Auszählung

Um die Anzahl von M1- und M2-Makrophagen in den Proben zu vergleichen, wurden die CD68- und CD163-positiven Zellen mit Hilfe des Programms ImageJ ausgezählt.

3 Ergebnisse

3.1 Expression des S1PR1 im gesunden Gefäß

Als Kontrolle ohne pAVK wurden die A. iliaca und die A. femoralis eines 23-jährigen männlichen Verstorbenen untersucht. Die Gefäße unterscheiden sich dahingehend, dass die Media der A. iliaca im Vergleich zur A. femoralis breiter ist und mehr elastische Fasern besitzt (s. Abbildung 13).

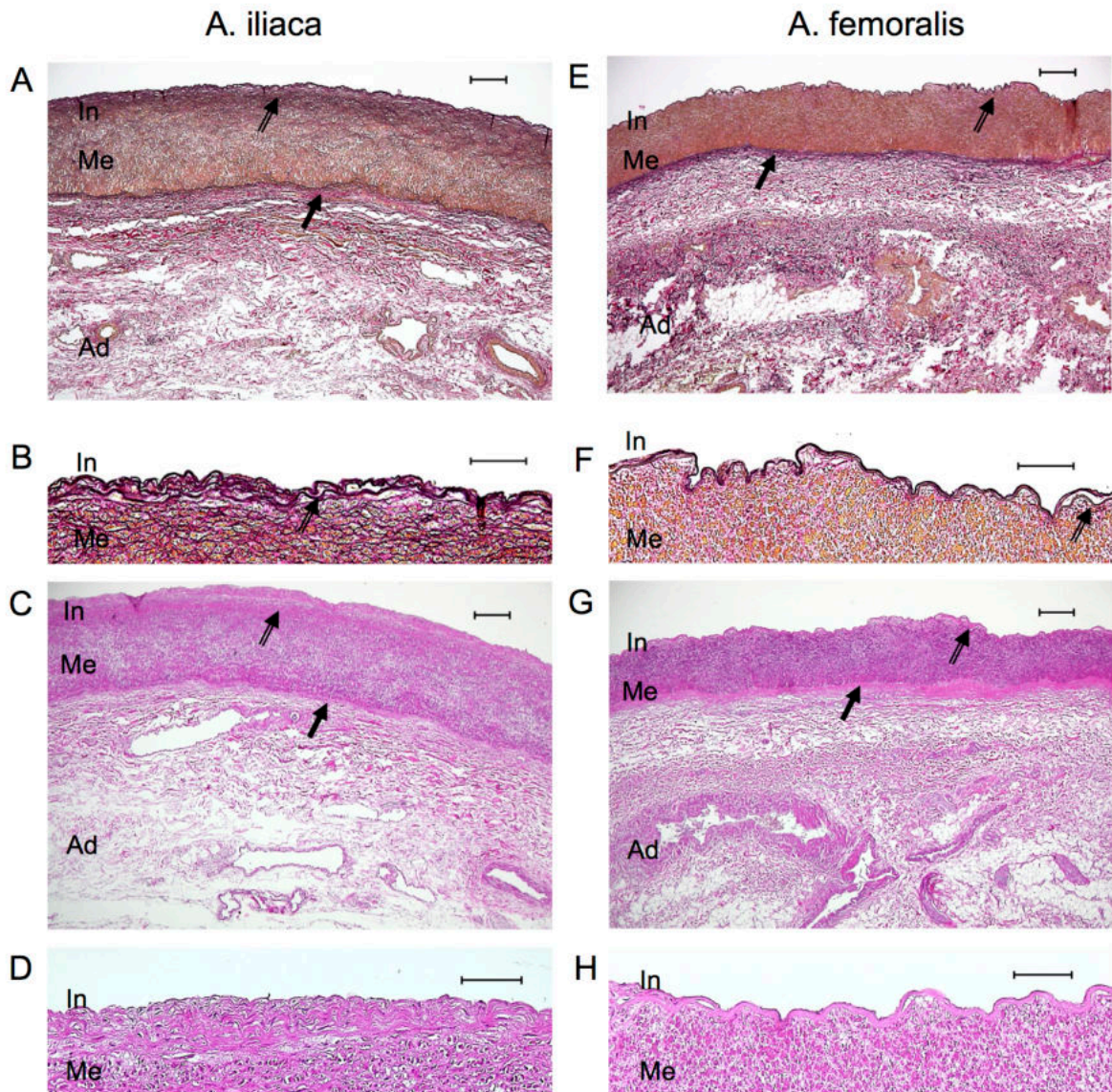


Abbildung 13: Histologische Darstellung einer gesunden A. iliaca (links) und A. femoralis (rechts) in der EvG-Färbung (A, B, E, F) und HE-Färbung (C, D, G, H). Beide Gefäße weisen eine schmale Intima (In) mit Endothel auf. Die angrenzende Media (Me) kann jeweils durch die Lamina elastica interna (LEI, schwarzer Doppelpfeil) sowie die Lamina elastica externa (LEE, schwarzer Pfeil) abgegrenzt werden. Die beiden Gefäße unterscheiden sich dahingehend, dass die Media der A. iliaca im Vergleich zur A. femoralis breiter ist und mehr elastische Fasern besitzt. Die Adventitia (Ad) imponiert als lockere Bindegewebsschicht, in der Vasa vasorum eingebettet liegen; Maßstabsbalken für A, C, E, G = 300 µm, für B, D, F, H = 100 µm

3.1.1 Darstellung des S1PR1 in Intima/Media

Um darzustellen, dass S1PR1 von Endothelzellen (EZ) exprimiert wird, wurden die Kontrollproben einer CD31/S1PR1-Doppel-Immunfluoreszenz-Färbung unterzogen (s. Abbildung 14). In der S1PR1-Färbung (s. Abbildung 14 B, E) und in der Doppelfärbung (s. Abbildung 14 C, F) stellen sich die Endothelzellen (s. Abbildung 14 A, D) der A. iliaca und A. femoralis als S1PR1-positiv dar. Die Zellen der Media färben sich schwächer rot an als die der Intima und wurden aufgrund des Abgleichs mit der Isotyp-Kontrolle als negativ eingestuft.

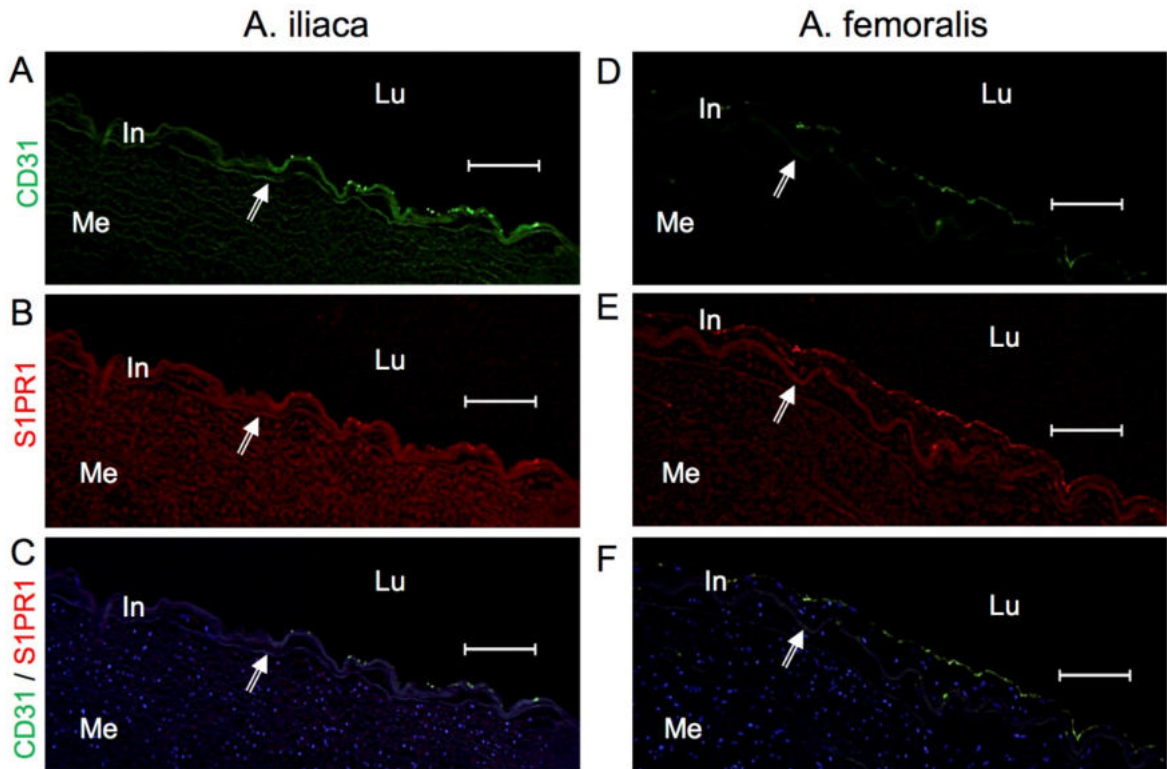


Abbildung 14: TSA-Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für CD31 und S1PR1 in der Intima/Media gesunder A. iliaca (A-C) und A. femoralis (D-F). Darstellung CD31-positiver Zellen (grün) im Endothel der Intima (In). Diese sind ebenfalls für S1PR1 positiv (rot) (B und E). Da Elastin im grünen Kanal auto-fluoresziert, wird die LEI sichtbar (Pfeil). Lu = Lumen; Maßstabsbalken = 100 μ m

3.1.2 Darstellung des S1PR1 in Media/Adventitia

Um die Expression des S1PR1 in der Media und Adventitia darzustellen, wurde eine Doppelfärbung mit SM- α -actin (SMA) und S1PR1 durchgeführt. In Abbildung 15 ist zu erkennen, dass sich in beiden Gefäßen die glatten Muskelzellen in der Media sowie in den Vasa vasorum der Adventitia anfärben (s. Abbildung 15 A, D). S1PR1 konnte in der Media nicht nachgewiesen werden (s. Abbildung 15 B, E). In der Adventitia wurde der Rezeptor lumenseitig im Vasa vasorum exprimiert. Zusätzlich konnten vereinzelt S1PR1-positiv/SMA-negative Zellen in der Adventitia identifiziert werden (s. Kugelpfeil in Abbildung 15 B).

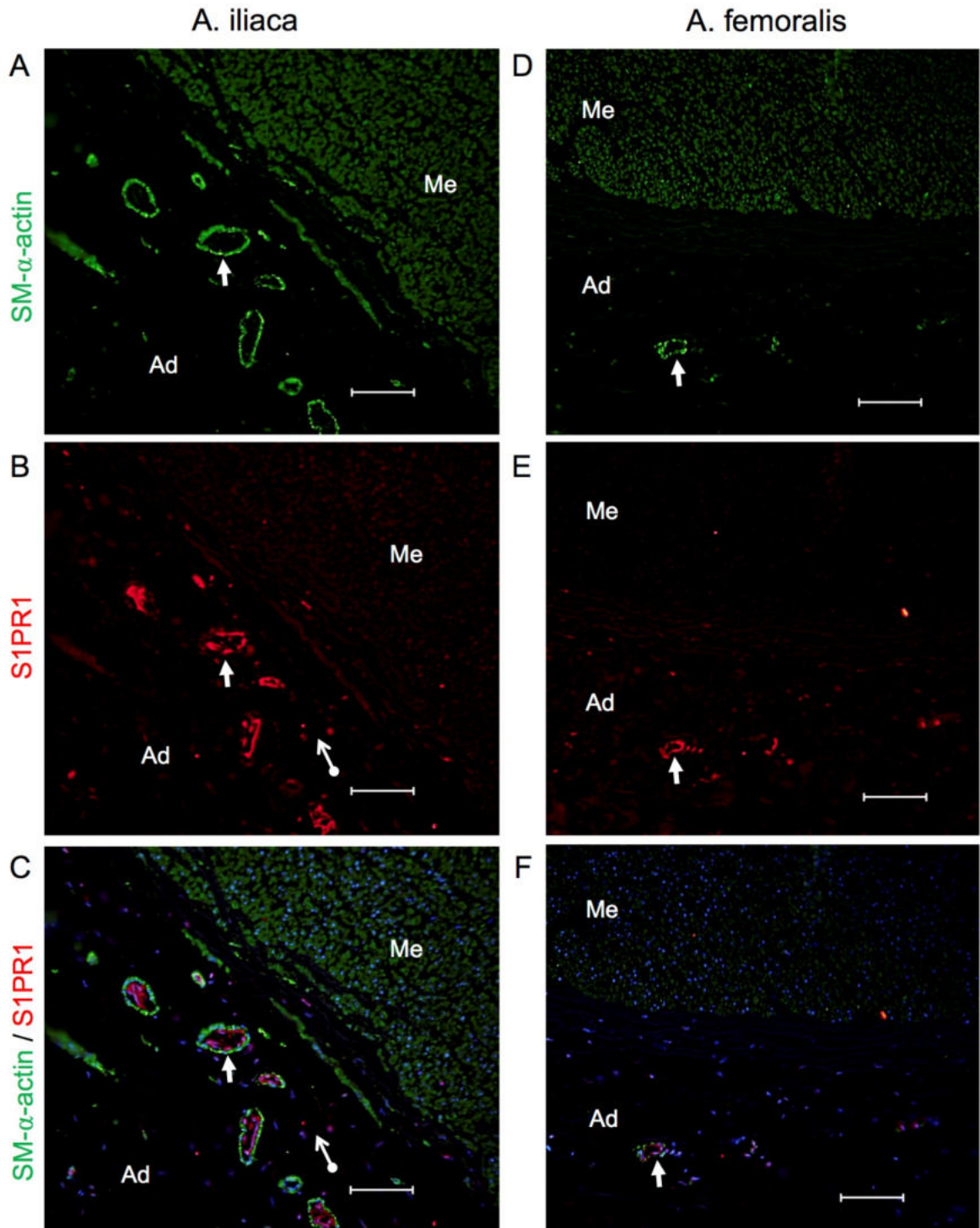


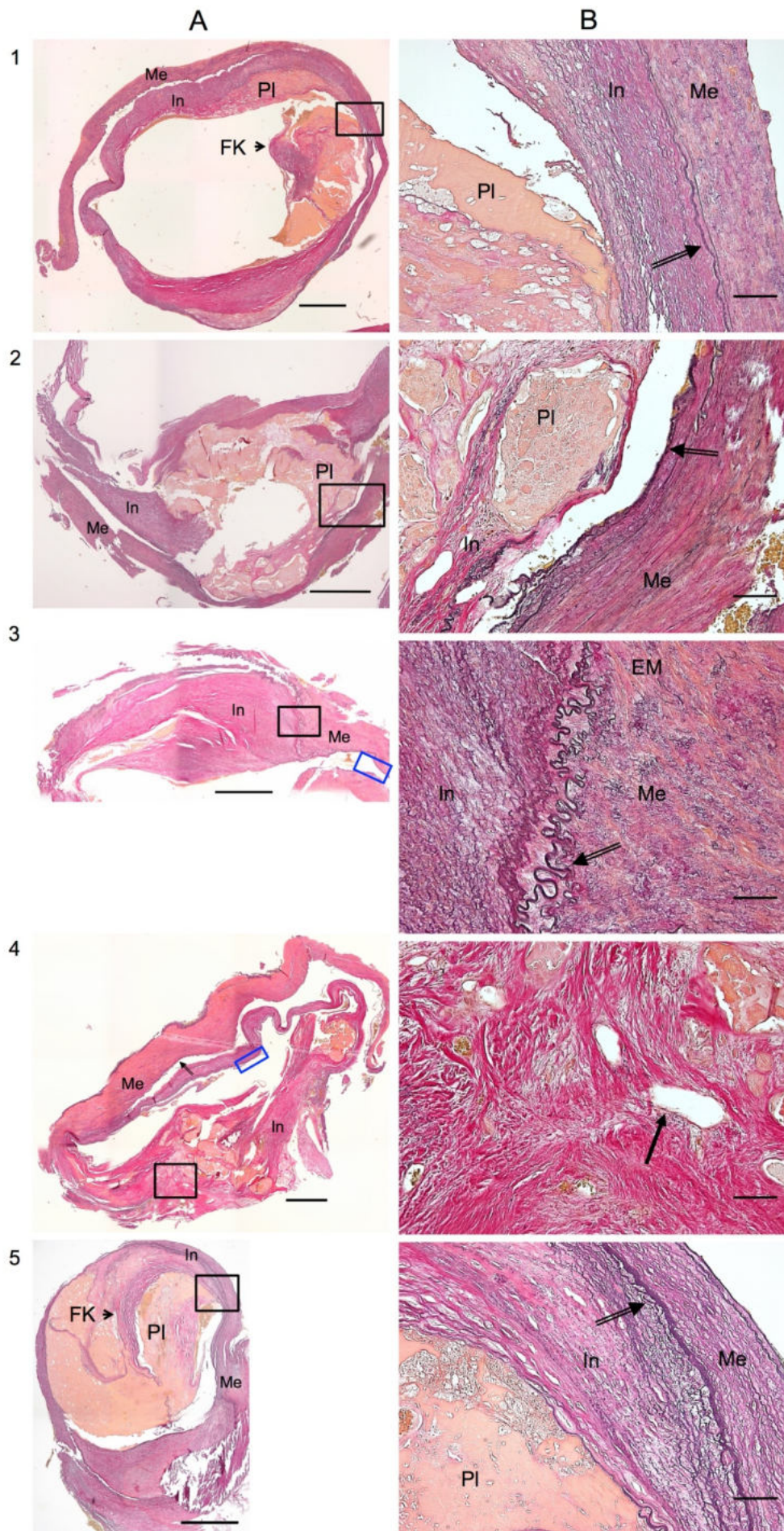
Abbildung 15: Darstellung SM- α -actin-positiver und S1PR1-positiver Zellen in der Media/Adventitia gesunder A. iliaca (A-C) und A. femoralis (D-F). Immunfluoreszenz-Färbung für SM- α -actin (grüner Kanal) und S1PR1 (roter Kanal). Kerne wurden mit DAPI gefärbt (blauer Kanal). Die Media (Me) weist keine S1PR1-positiven Zellen auf. Glatte Muskelzellen sind durch die Expression des SMA gekennzeichnet. Der weiße Kugelpfeil weist auf vereinzelt auftretende S1PR1-positiv Zellen in der Adventitia hin. Die weißen Pfeile weisen auf das Vasa vasorum in der Adventitia (Ad) hin; Maßstabsbalken = 100 μ m

3.2 Charakterisierung der Plaques

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gewebeproben von insgesamt 18 Patienten untersucht. Es handelte sich in zwölf Fällen um eine pAVK im Stadium II, in vier Fällen lag ein Stadium III und in zwei Fällen ein Stadium IV vor. Da im Rahmen einer Thrombendarteriektomie die Plaque aus der Media herausgeschält wird, fehlen in den Präparaten Adventitia, Lamina elastica externa sowie der äußere Teil der Media. Zehn der 18 Proben (6 Präparate aus der A. iliaca, 4 aus der A. femoralis) wurden histologisch (EvG-Färbung) und mittels Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit einem Endothelzellmarker sowie einem Marker für glatte Muskelzellen analysiert (s. Tabelle 3, Kapitel 2.1.1). Alle 18 Proben wurden einer Doppelfärbung mit den Makrophagenmarkern CD68 und CD163 unterzogen.

3.2.1 Histologische Untersuchungen

In der Histologie stellen sich die Plaques in den verschiedenen Proben sehr heterogen dar (s. Abbildung 16). Gemeinsames Merkmal ist eine im Vergleich zur Kontrolle verbreiterte Intima (s. Abbildung 16, Proben 1B und 5B). Während sich in 8 Fällen (Probe 1-2, 4-5, 8-10) eine typische Plaque-Morphologie (Lipidkern und/oder fibrotische Kappe (Probe 1 und 5)) zeigte, wiesen zwei Präparate (Probe 3 und 7) Merkmale einer Intimahyperplasie auf (Zellproliferation, extrazelluläre Matrix = EM).



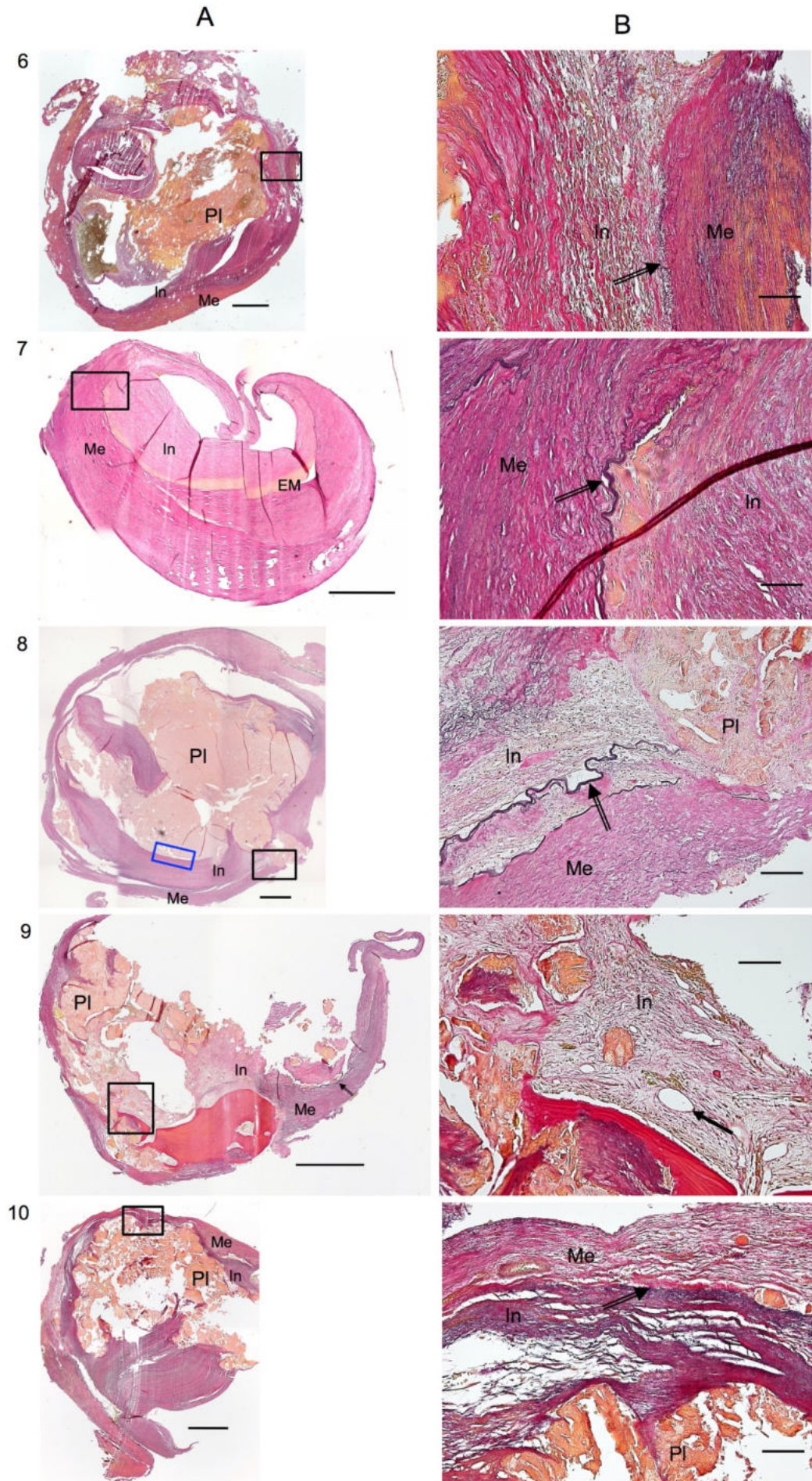


Abbildung 16: Darstellung humaner Plaques in der EvG-Färbung. Chirurgisch gewonnene Plaques der A. iliaca (Nr. 1-6) und der A. femoralis (Nr. 7-10) wurden histologisch aufgearbeitet und die Schnitte einer EvG-Färbung unterzogen. A: Maßstabsbalken = 1 mm; schwarzer Doppelpfeil indiziert die Lamina elastica interna (LEI), Me = Media, In = Intima, PI = Plaque, FK = fibrotische Kappe, blauer Kasten = gezeigte Region für eine spätere S1PR1/CD31 Färbung in der Plaque (s. unten), schwarzer Kasten = in B gezeigter Ausschnitt. B: Maßstabsbalken = 100 μ m, Me = Media, In = Intima, schwarzer Doppelpfeil indiziert die Lamina elastica interna (LEI), schwarzer Pfeil indiziert die Vasa vasorum.

3.2.2 Darstellung des S1PR1 in Intima/Media und Plaque

Um zu untersuchen, ob das Endothel in erkrankten Gefäßen eine veränderte S1PR1-Expression aufweist, wurden die Proben 1-10 einer CD31/S1PR1-Doppelfärbung unterzogen. In 7 Proben (Probe 1, 3-5 und 7-9) konnte CD31-positives/S1PR1-positives Endothel identifiziert werden, jeweils in den Regionen, die nicht von Plaquebildung betroffen waren. Diese Regionen sind als blaue Kästen in der EvG-Färbung der Abbildung 16 dargestellt (s. Abbildung 16, exemplarisch 3A, 4A, 8A) und in der S1PR1/CD31-Doppelfärbung in Abbildung 17, Abbildung 18 A-C und Abbildung 19 D-F zu sehen. In den drei übrigen Proben (Probe 2, 6, 10) grenzte die Plaque jeweils bis zum Rand des Präparats, sodass CD31-positives/S1PR1-positives Endothel nicht mehr identifiziert werden konnte. Neben dem Endothel finden sich in 8 der 10 untersuchten Proben (Probe 1-4 und 7-10) CD31-positiv/S1PR1-positiv Zellen auch in der Intima, exemplarisch dargestellt ist dies für Probennummer 3 und 7 (s. Abbildung 18 D-F und Abbildung 19 A-C).

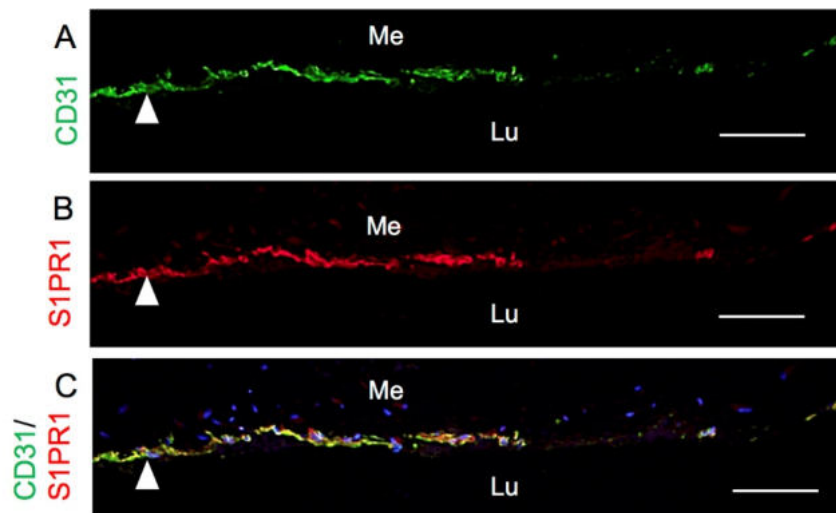


Abbildung 17: CD31/S1PR1-Doppelfärbung einer Plaque aus der A. iliaca (Probe 4). Dargestellt ist die Region, die im blauen Kasten aus Abbildung 16 zu sehen ist (Probe 4). Das Endothel ist durch ein weißes Dreieck indiziert. Me = Media, Lu = Lumen; Maßstabsbalken = 100 μ m

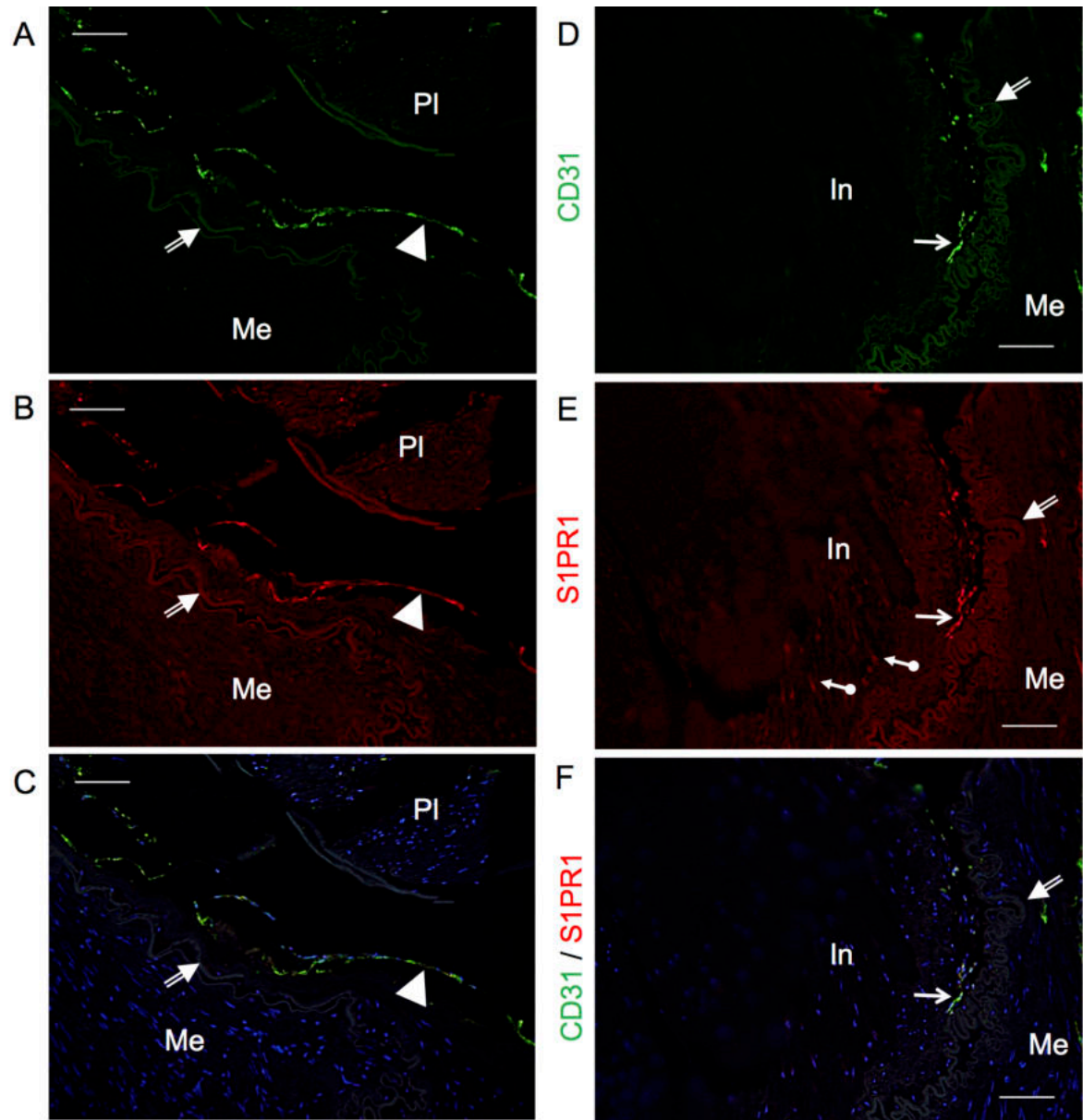


Abbildung 18: CD31/S1PR1-Doppelfärbung einer Plaque aus der A. iliaca (Probe 3). A-C zeigt die Region, die im blauen Kasten in Abbildung 16 dargestellt ist. Zu erkennen ist das Endothel mit Expression von CD31 und S1PR1 (weißes Dreieck) sowie eine intakte Lamina elastica interna (weißer Doppelpfeil). D-F stellt die Region des schwarzen Kastens dar. Zu sehen sind CD31/S1PR1-positive Zellen in der Intima. Me = Media, In = Intima, PI = Plaque; Maßstabsbalken = 100 µm

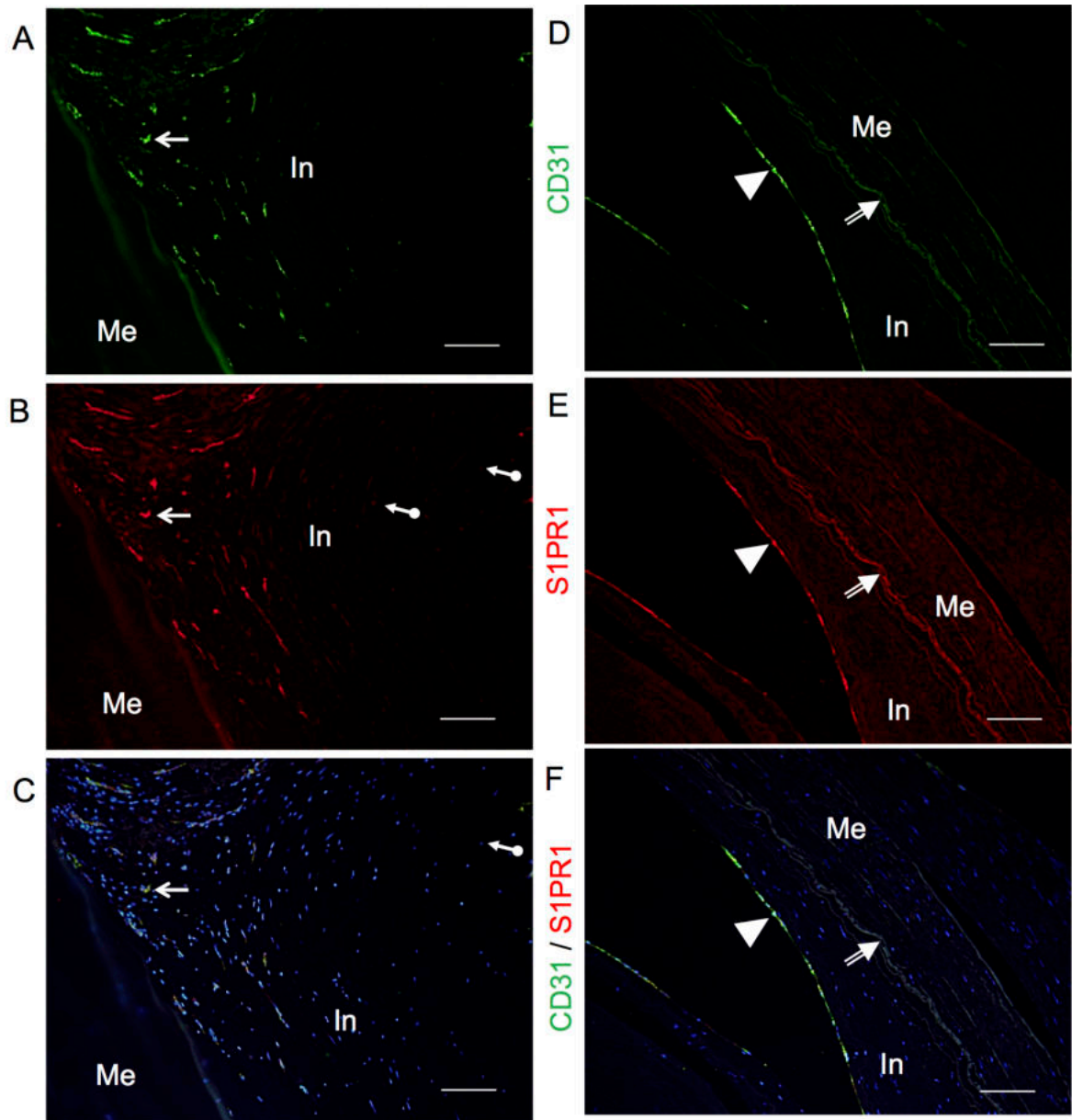


Abbildung 19: CD31/S1PR1-Doppelfärbung einer Plaque aus der A. femoralis der Probe 7 (A-C) und der Probe 8 (D-F). A-C zeigt die Region aus Probe 7, die im schwarzen Kasten in Abbildung 16 dargestellt ist. Zu erkennen sind CD31/S1PR1-positive Zellen in der Intima. D-F stellt die Region der Probe 8 dar, die im blauen Kasten der Abbildung 16 dargestellt ist. Zu erkennen ist das Endothel mit Expression von CD31 und S1PR1 (weißes Dreieck) sowie eine intakte Lamina elastica interna (weißer Doppelpfeil). Me = Media, In = Intima, Pl = Plaque; Maßstabsbalken = 100 μ m

Vier der sieben Präparate (Probe 4 und 8-10) zeigen CD31-positive/S1PR1-positive Zellen in Gefäßquerschnitten innerhalb des Plaquegewebes, wie exemplarisch für Proben Nr. 8 und 9 in Abbildung 20 gezeigt wird. Dabei handelt es sich um das Endothel der Mikrogefäße. Daneben weist die Intima aber auch S1PR1-positive/CD31-negative Zellen auf (s. Kugelpfeil in Abbildung 20 E und F).

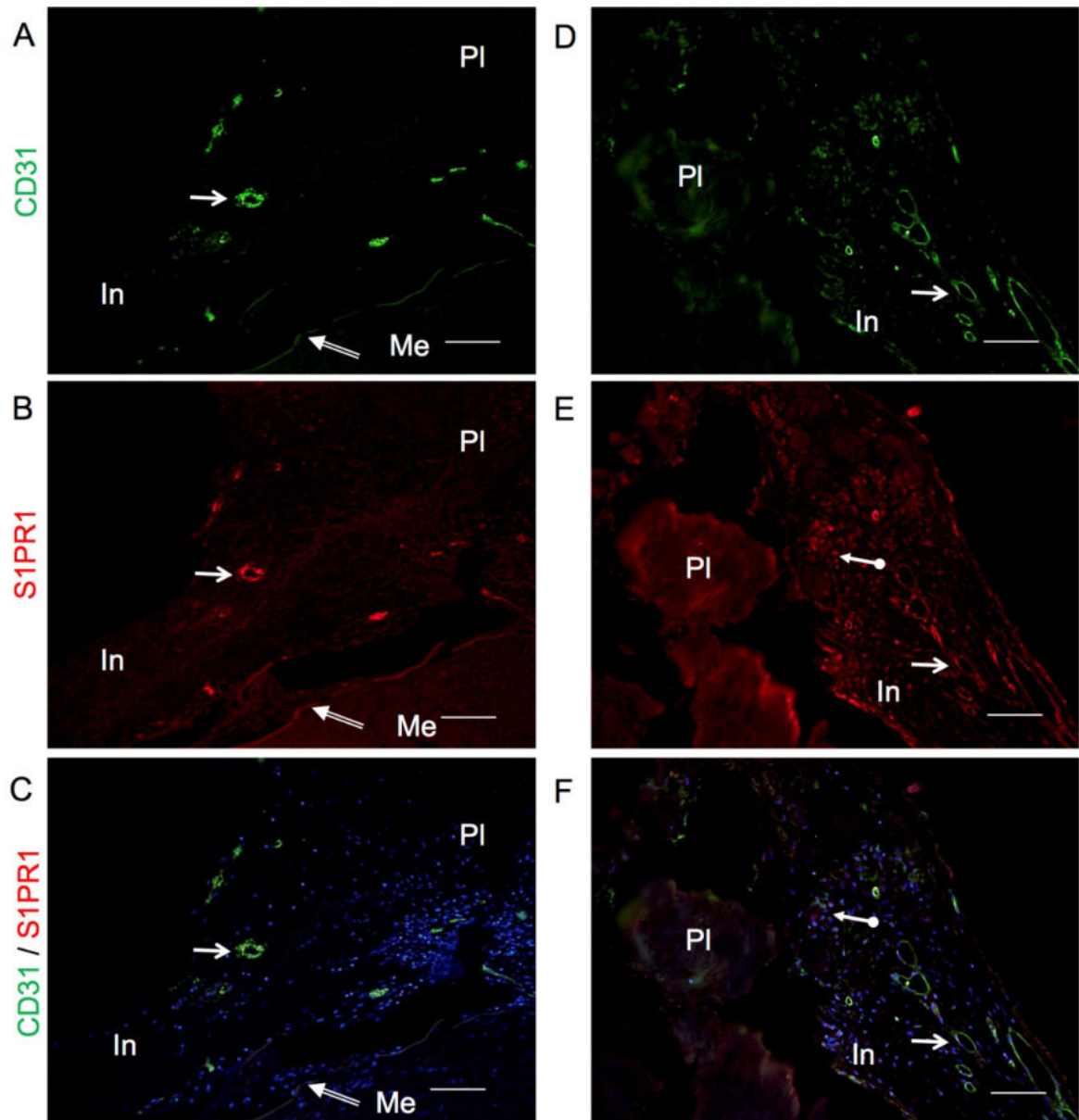


Abbildung 20: CD31/S1PR1-Doppelfärbung einer Plaque aus Aa. femorales (Probe 8 und Probe 9). Zu erkennen sind Mikrogefäße (weißer Pfeil), die sich in der Plaque befinden. Das lumenseitige Endothel dieser Gefäße ist CD31- und S1PR1-positiv. Außerdem sind CD31-negative/S1PR1-positive Zellen identifizierbar (weißer Kugelpfeil E und F). Me = Media, In = Intima, PI = Plaque, Doppelpfeil indiziert die Lamina elastica interna; Maßstabsbalken = 100 μ m

Um zu untersuchen, ob es sich bei den S1PR1-positiven/CD31-negativen Zellen um Makrophagen bzw. GMZ handelt, wurden die Gewebeproben nachfolgend für CD68 bzw. CD163 (beides Makrophagenmarker) und für SMA gefärbt. CD68 stellt hierbei einen pan-Makrophagenmarker dar, der aber auch von anderen phagozytotischen Zellen exprimiert werden kann. CD163 wird vor allem von verschiedenen Subtypen der M2 Makrophagen exprimiert (s. Kapitel 1.2.5).

In den zehn Proben wurden sowohl CD68-positive als auch CD163-positive Zellen detektiert (s. Abbildung 21 C – Abbildung 27). In jeweiligen Doppelfärbungen für einen der Makrophagenmarker und S1PR1 zeigte sich, dass die meisten Makrophagen auch S1PR1

exprimieren (s. Abbildung 21 - Abbildung 27). Eine quantitative Auswertung der Probennummern 1-18 wird in Tabelle 12 (s. Kapitel 3.2.3) beschrieben. In die Auszählung gehen neben den dargestellten Proben 1-10 auch die Proben 11-18 mit ein, die ebenfalls in Doppelfärbungen für S1PR1 und CD68 bzw. CD163 gefärbt wurden. Tabelle 12 stellt die absolute Anzahl der CD68/CD163-positiven Zellen sowie den Anteil der davon ebenfalls S1PR1-positiven Zellen dar. Darüber hinaus fiel auf, dass mit diesen Färbungen in der Intima und Media S1PR1-positive Zellen gefunden wurden, die sowohl negativ für Makrophagenmarker als auch für CD31 waren. Dies ist in den Ausschnittsvergrößerungen erkennbar (s. Kugelpfeil in Abbildung 21B, Abbildung 22B, Abbildung 24B und E, Abbildung 25 B und E).

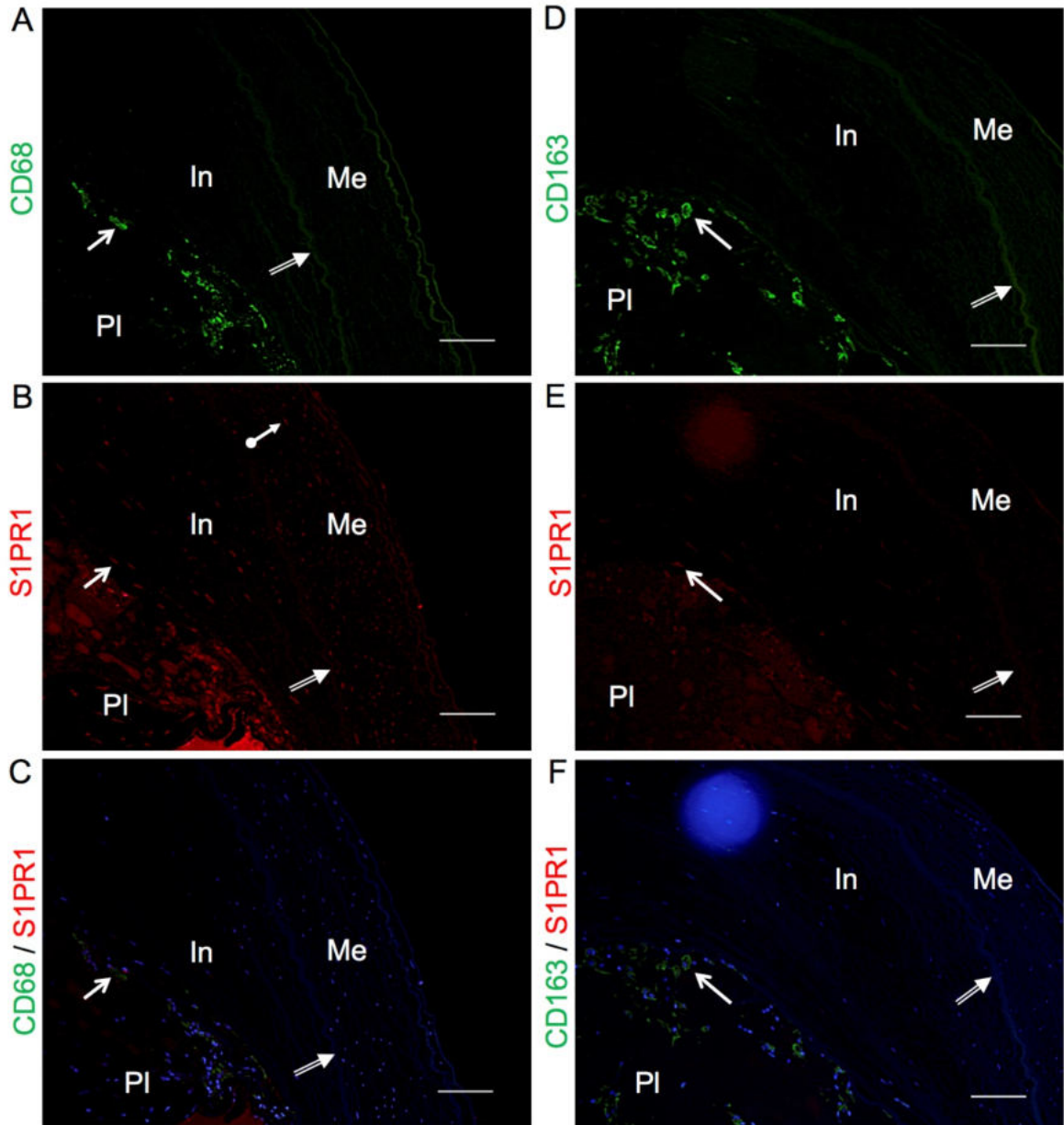


Abbildung 21: CD68/S1PR1 Doppelfärbung (A-C) sowie CD163/S1PR1 Doppelfärbung (D-F) einer Plaque aus der A. iliaca (Probe 5). Zu sehen sind CD68- bzw. CD163- positive Zellen in der Plaque, am Übergang zur Intima (A und D, Pfeil). Diese Zellen sind ebenfalls positiv für S1PR1 (B und E, Pfeil). Zusätzlich finden sich S1PR1-positive und CD68/CD163-negative Zellen in der Intima und Media (s. Kugelpfeil in B). Der Doppelpfeil indiziert die autofluoreszierende LEI; Me = Media, In = Intima, PI = Plaque; Maßstabsbalken 100 μ m

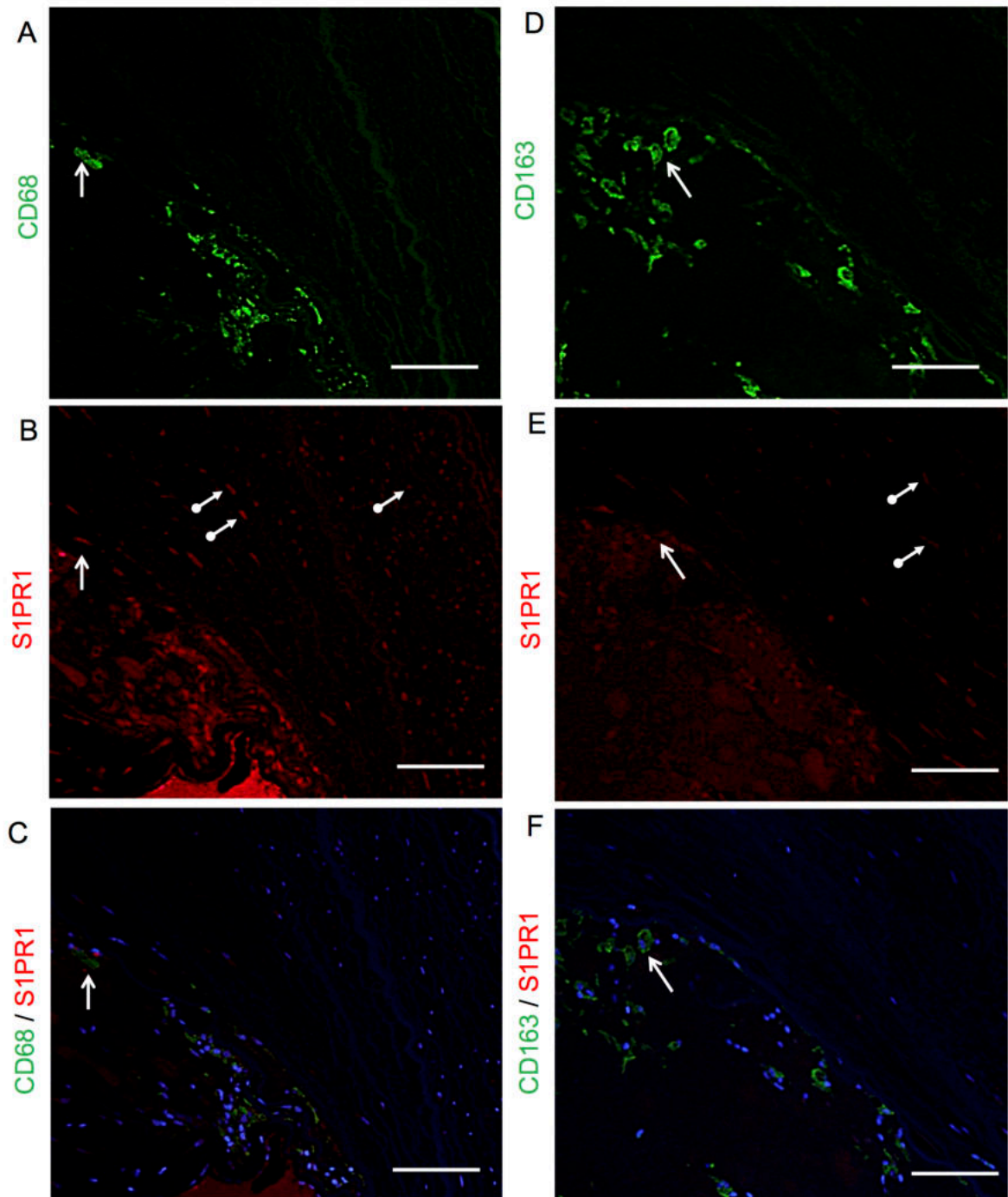


Abbildung 22: Ausschnittsvergrößerung der Abbildung 21 (Probe 5). Weißer Pfeil indiziert CD68/S1PR1- bzw. CD163/S1PR1-positive Zellen, Kugelpfeile indizieren CD68/CD163-negative/S1PR1-positive Zellen in der Intima; Maßstabsbalken = 100 μ m

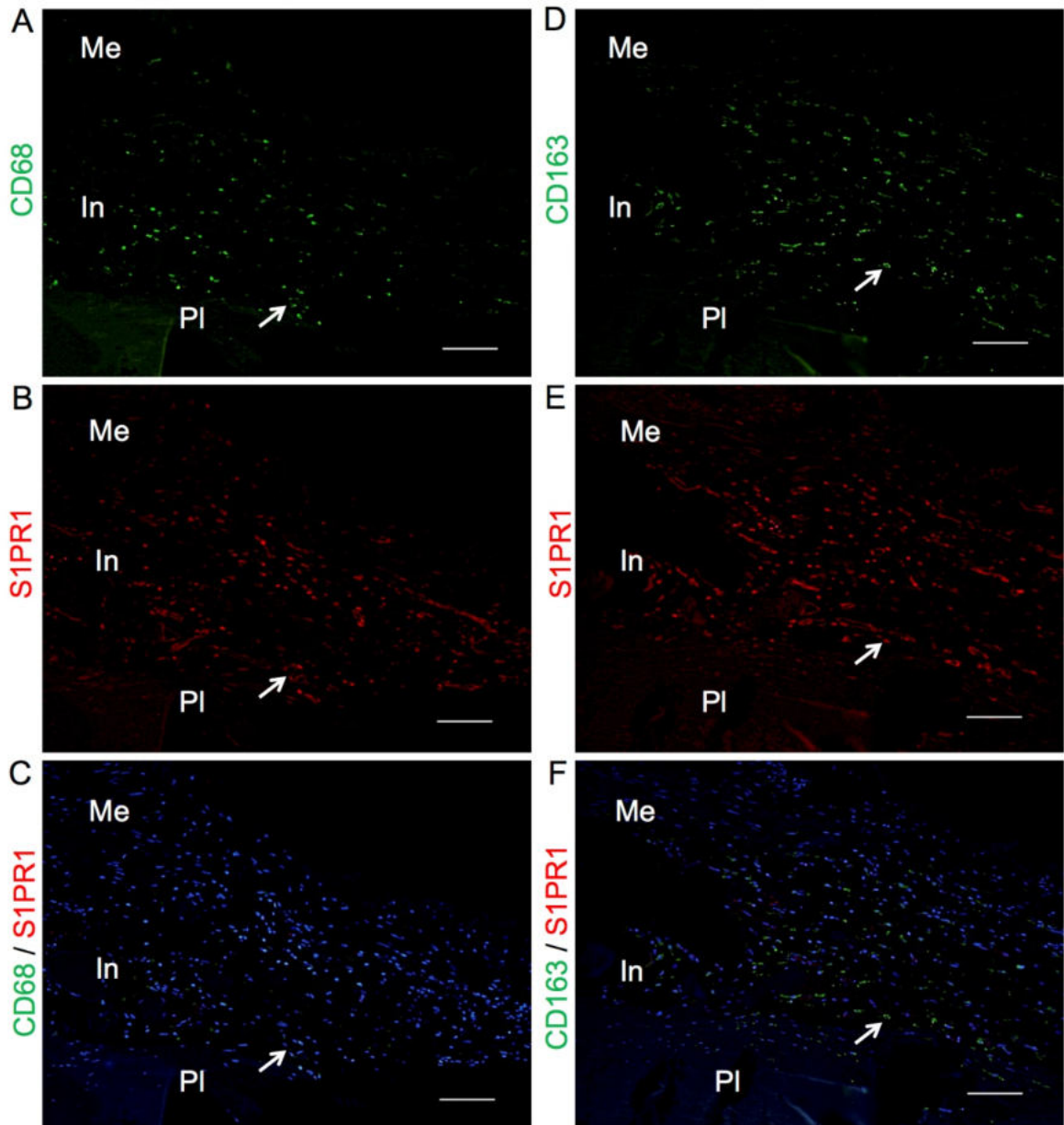


Abbildung 23: CD68/S1PR1-Doppelfärbung (A-C) sowie CD163/S1PR1-Doppelfärbung (D-F) einer Plaque aus der A. femoralis (Probe 10). Zu sehen sind CD68- (A)- und CD163- (D) positive Zellen, die ebenfalls positiv für S1PR1 sind (B und E, beispielsweise Pfeil) und sich in der Intima (In) befinden. Media und Plaque weisen wenige positive Zellen auf. PI = Plaque, Me = Media; Maßstabsbalken = 100 μ m

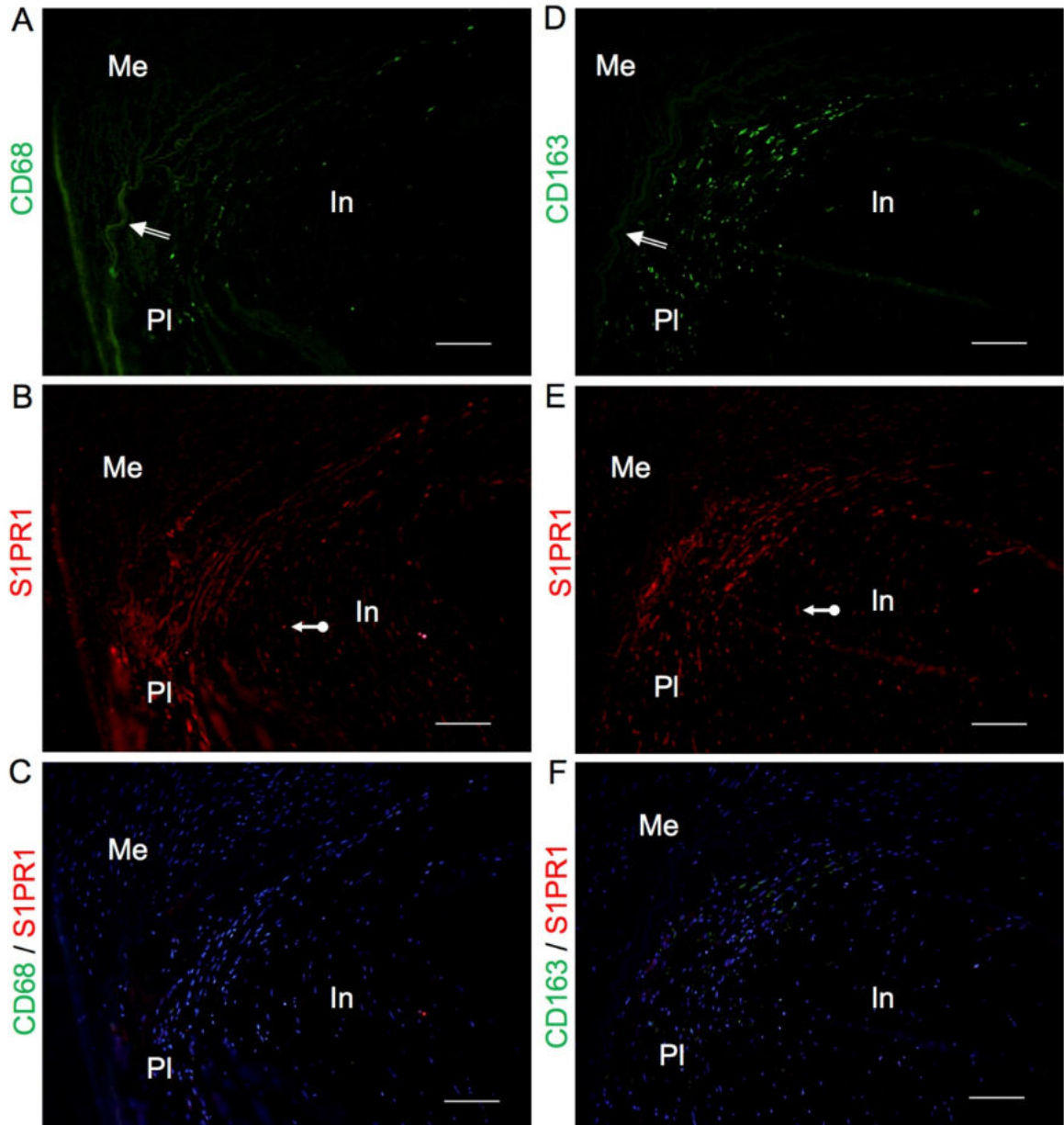


Abbildung 24: CD68/S1PR1-Doppelfärbung (A-C) sowie CD163/S1PR1-Doppelfärbung (D-F) einer Plaque aus der A. femoralis (Probe 7). Zu sehen sind CD68- sowie weitaus mehr CD163-positive Zellen im Plaquematerial (PI), das eingebettet zwischen Media (Me) und Intima (In) liegt. Diese sind ebenfalls positiv für S1PR1 (B und E). Die LEI (Doppelpfeil) grenzt die Intima von der Media ab. Darüber hinaus weist die Intima (In) auch CD68/CD163-negative/S1PR1-positive Zellen auf (Kugelpfeil in B und E); Maßstabsbalken = 100 μ m

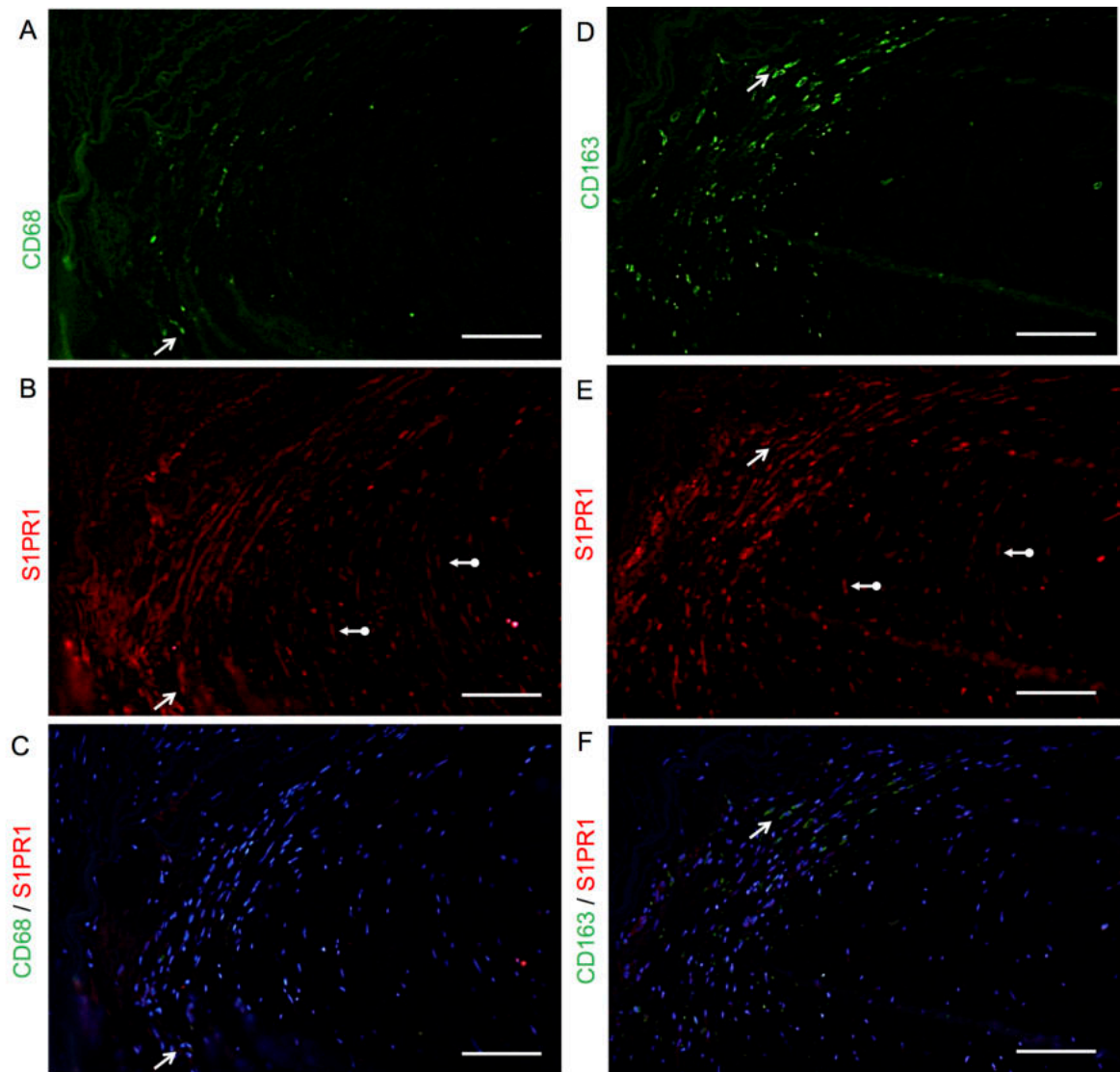


Abbildung 25: Ausschnittsvergrößerung der Abbildung 24 (Probe 7). Weißer Pfeil indiziert CD68/S1PR1- bzw. CD163/S1PR1-positive Zellen, Kugelpfeile in B und E indizieren CD68- bzw. CD163-negative/S1PR1-positive Zellen in der Intima. Maßstabsbalken = 100 μm

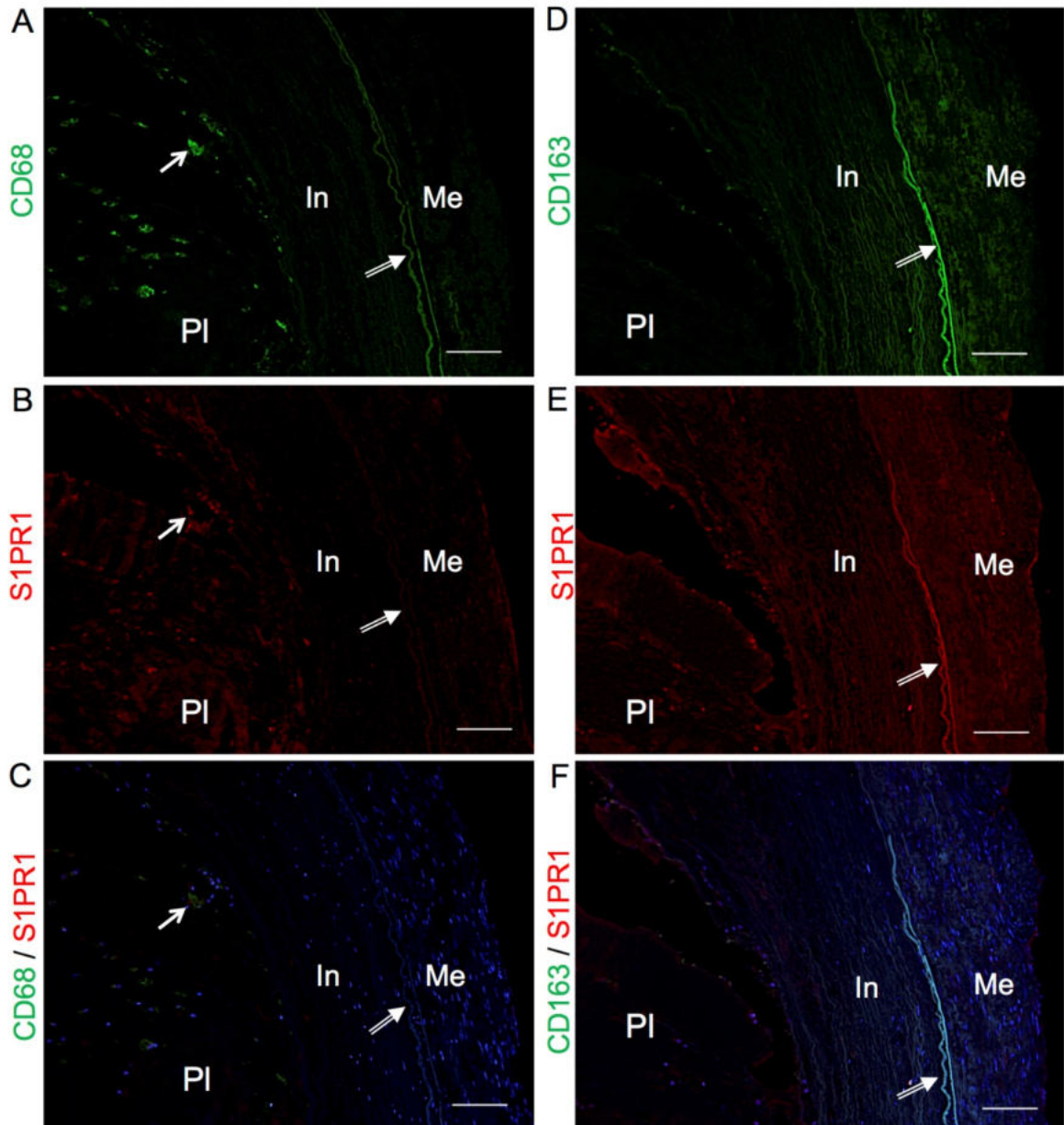


Abbildung 26: CD68/S1PR1-Doppelfärbung (A-C) sowie CD163/S1PR1-Doppelfärbung (D-F) einer Plaque aus der A. iliaca (Probe 1). Zu sehen sind weitaus mehr CD68-positive Zellen (A, Pfeil) als CD163-positive Zellen (D), die auch S1PR1 exprimieren (B, Pfeil). Intima (In) und Media (Me) weisen keine weiteren S1PR1-positiven Zellen auf. Doppelpfeil indiziert die LEI; Maßstabsbalken = 100 μ m

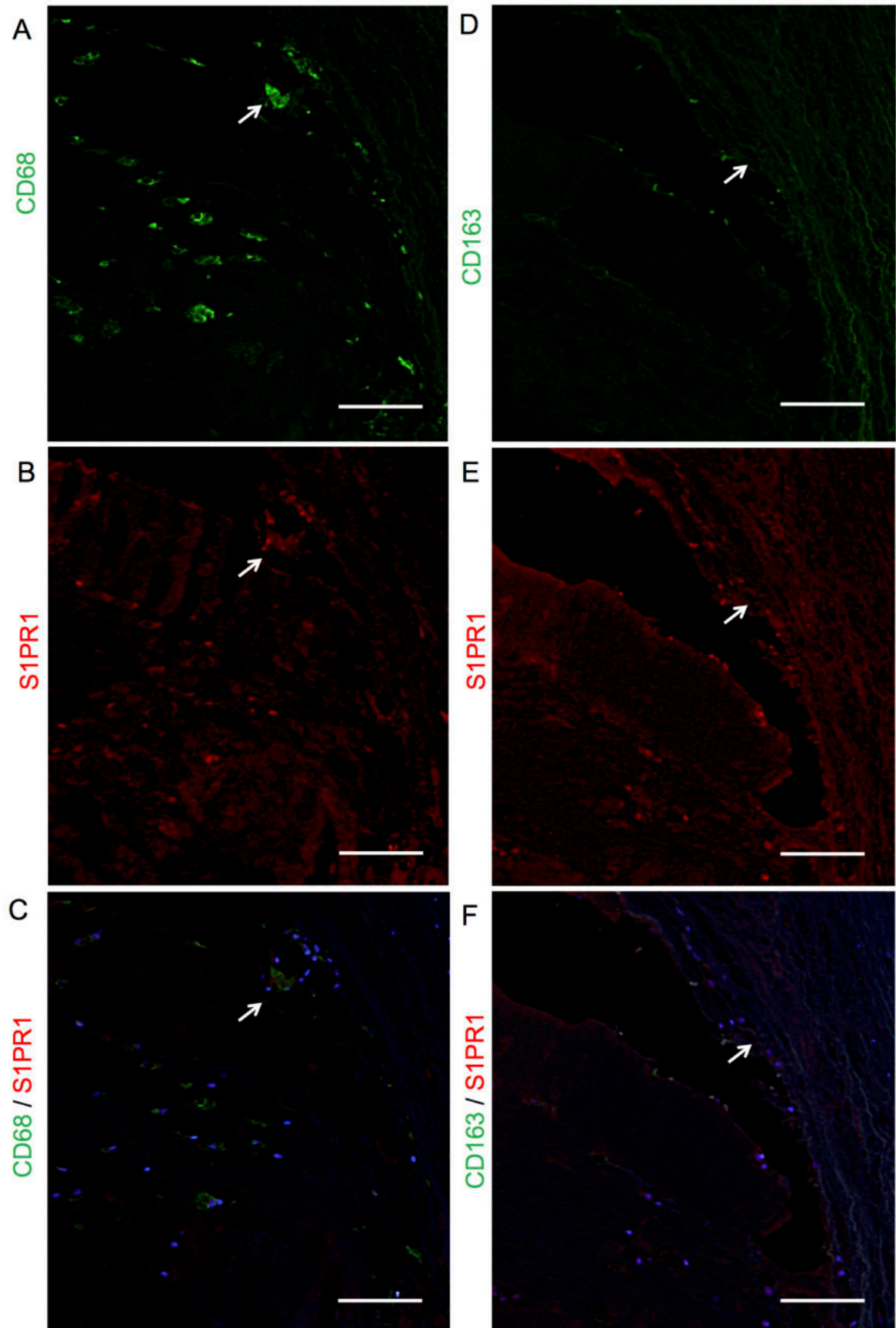


Abbildung 27: Ausschnittsvergrößerung der Abbildung 26 (Probe 1). Weiße Pfeile indizieren CD68/S1PR1-positive Zellen sowie wenige CD163/S1PR1-positive Zellen. In der angrenzenden Intima sind keine S1PR1-positiven Zellen zu sehen. Maßstabsbalken = 100 μ m

Um festzustellen, ob es sich bei diesen Zellen, die keine Makrophagen oder Endothelzellen zu sein scheinen, um GMZ handelt, wurden die Schnitte einer Doppelfärbung für S1PR1 und SMA unterzogen. Wie erwartet, färbte sich mit anti-SMA die Media des Gefäßes wie auch die Media von Mikrogefäßen, die sich innerhalb der Plaque neu ausgebildet haben (s. exemplarisch Abbildung 28). Darüber hinaus sind SMA-positive Zellen auch Bestandteil der Intima (s. Abbildung 29 - Abbildung 31). Keine der SMA-positiven Zellen exprimiert den S1PR1 (s. exemplarisch Abbildung 29).

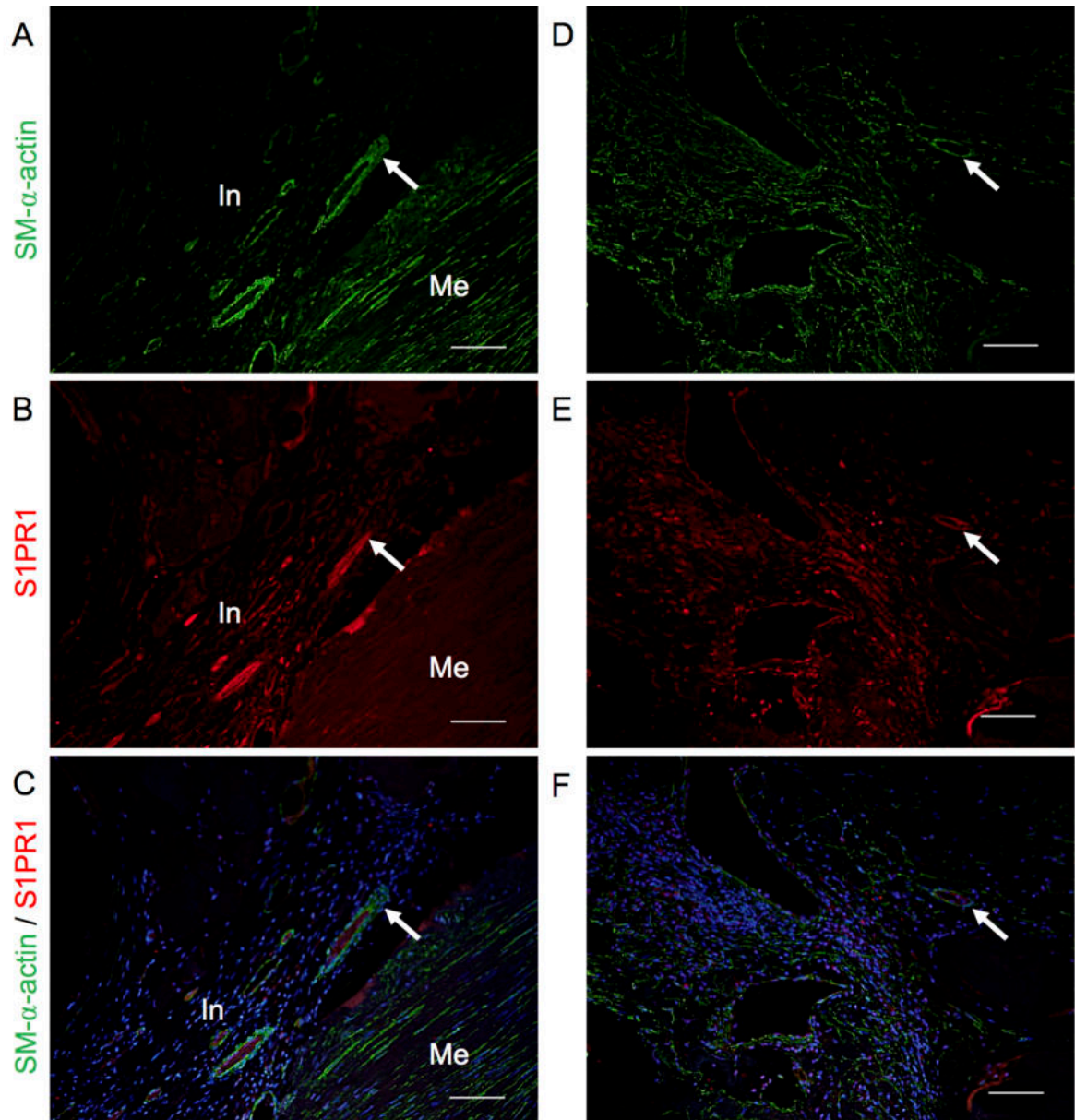


Abbildung 28: SMA/S1PR1-Doppelfärbung einer Plaque aus der A. iliaca der Probe 2 (A-C) sowie der Probe 4 (D-F). Zu sehen sind SMA-positive Zellen in der Media von Mikrogefäßen, die sich innerhalb der Plaque ausgebildet haben (A und D, Pfeil). Diese Zellen sind S1PR1-negativ. Das lumenseitige Endothel der Gefäße lässt sich für S1PR1 anfärben und grenzt sich klar von den SMA-positiven Zellen ab (B-F, Pfeil); Maßstabsbalken = 100 μ m

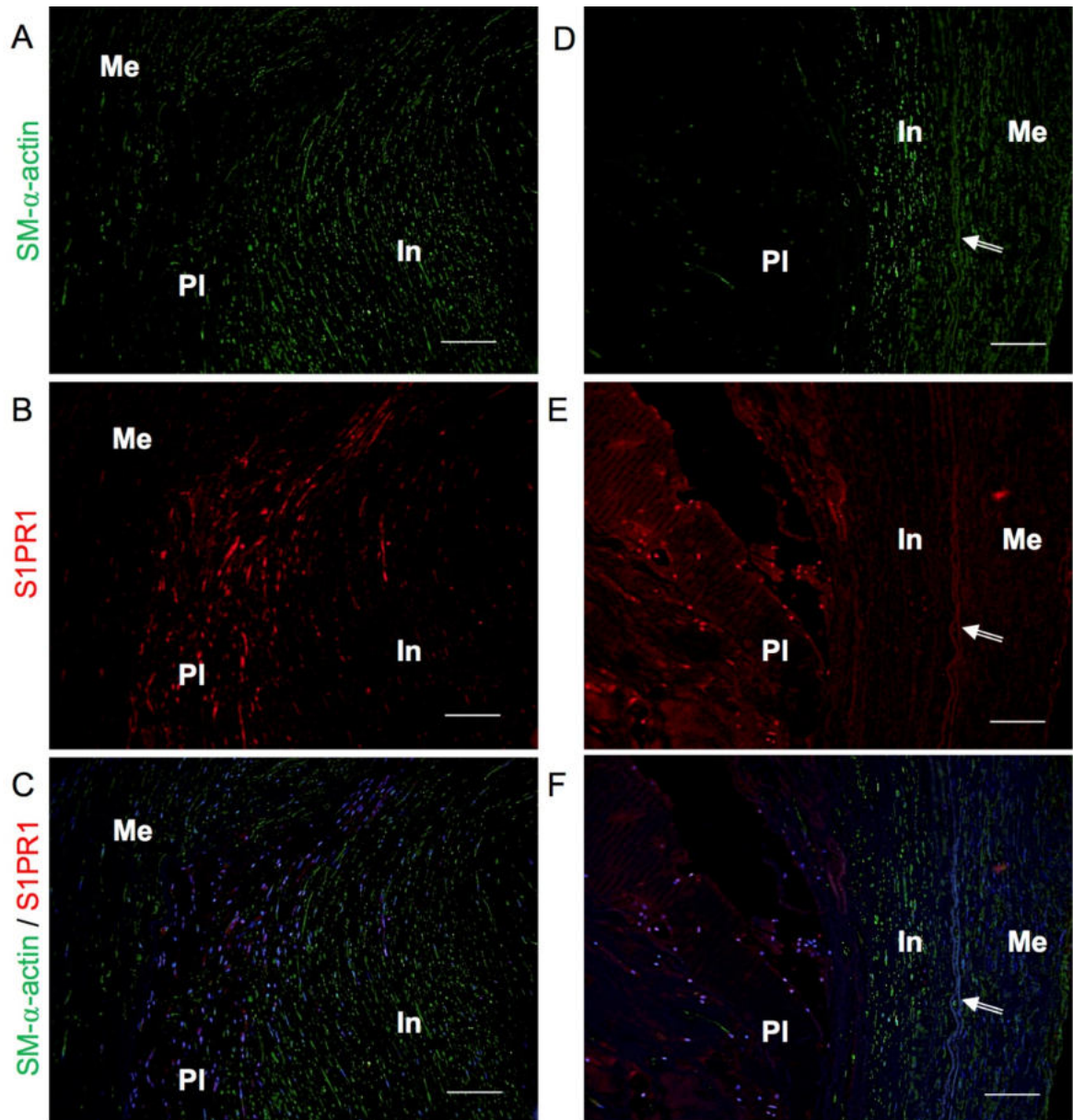


Abbildung 29: SMA/S1PR1-Doppelfärbung einer Plaque aus der A. femoralis (Probe Nr. 7, A-C) sowie der A. iliaca (Probe Nr. 1, D-F). Zu sehen sind SMA-positive Zellen sowohl in der Intima (In) als auch in der Media (Me) (A und D). Die SMA-positiven Zellen sind S1PR1-negativ, was in C und F deutlich sichtbar wird. S1PR1-positive Zellen befinden sich in der Plaque (B und E); Maßstabsbalken = 100 μ m

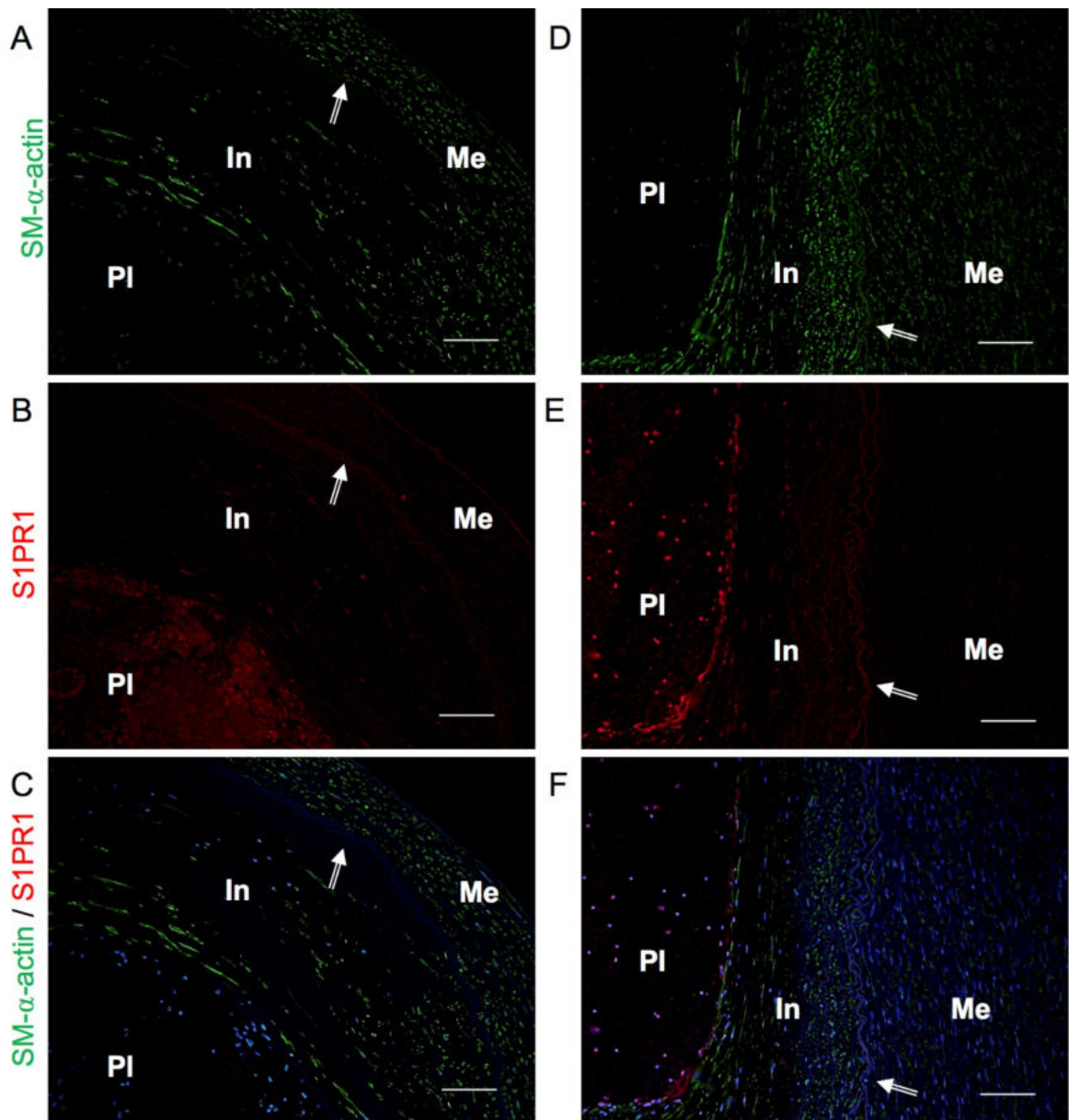


Abbildung 30: SMA/S1PR1-Doppelfärbung einer Plaque aus der A. iliaca der Probe 5 (A-C) sowie der Probe 6 (D-F). Es befinden sich SMA-positive Zellen in Intima (In) und Media (Me) (A und D). Die SMA-positiven Zellen sind S1PR1-negativ. S1PR1-positive Zellen lassen sich in der Plaque (PI) identifizieren (E). Der Doppelpfeil indiziert die LEI; Maßstabsbalken = 100 μ m

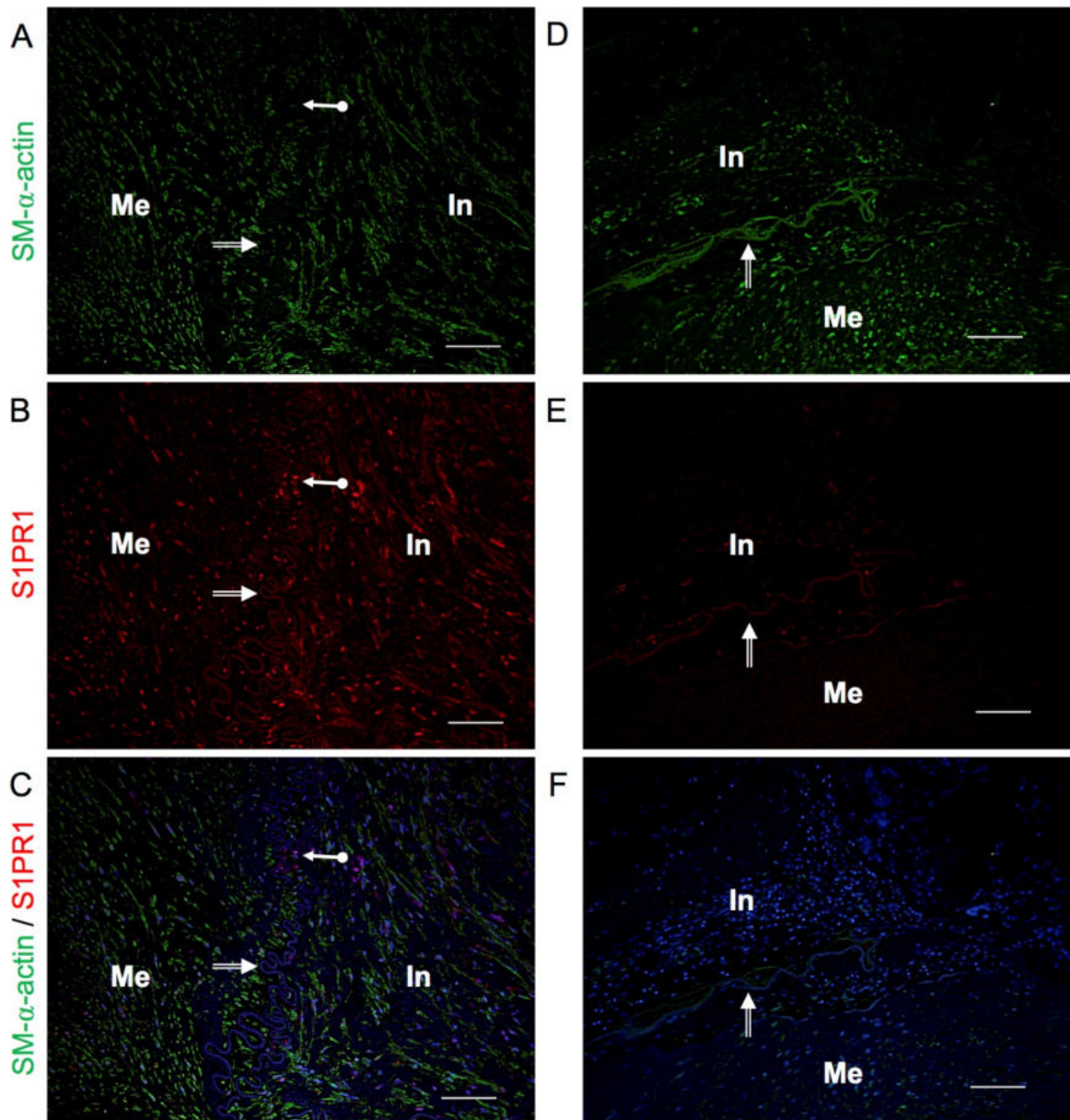


Abbildung 31: SMA/S1PR1-Doppelfärbung einer Plaque aus der A. iliaca (Probe 3, A-C) sowie der A. femoralis (Probe 8, D-F). A-C: Zu sehen sind SMA-positive und S1PR1-positive Zellen in der Media (Me) und Intima (In), die jedoch nicht identisch sind (C, Kugelpfeil). D-F: Zahlreiche SMA-positive Zellen in der Media (Me) (D) sind S1PR1 negativ (E). Der Doppelpfeil indiziert LEI; Maßstabsbalken = 100 μ m

3.2.3 M1- und M2-Makrophagen

Um festzustellen, ob es sich bei den S1PR1-positiven Zellen um M1- und/oder M2-Makrophagen handelt, wurden die 18 Proben (s. Tabelle 3, Kapitel 2.1.1) für CD68 (Marker für M1-Makrophagen), CD163 (M2-Makrophagen) und S1PR1 gefärbt. Es erfolgte eine quantitative Auswertung für die gesamte Probenanzahl (s. Tabelle 12). Exemplarisch werden die Proben 1-10 gezeigt. Jedes Präparat wurde unter dem Mikroskop so eingestellt, wie es die Vergrößerung der EvG-Färbung vorgab (s. Abbildung 16, Maßstab 100 µm). Wie bereits oben beschrieben, wurde dabei die Region ausgewählt, in der die Gefäßwand an die Plaque grenzt.

Insgesamt wurden 241 CD68-positive und 402 CD163-positive Zellen gezählt (s. Tabelle 12). Da es sich um sequentielle Schnitte handelt, kann nicht ermittelt werden, wie viele Zellen beide Makrophagenmarker exprimieren. In Probe Nummer 7 wurden deutlich mehr CD163- als CD68-positive Zellen ausgezählt (s. Abbildung 24 und Abbildung 25 und Tabelle 12), in Probe Nummer 1 hingegen mehr CD68-positive Zellen (s. Abbildung 26 und Abbildung 27).

90% der CD68-und/oder CD163-positiven Zellen exprimieren den S1PR1 (s. Abbildung 21 C - Abbildung 27 und Tabelle 12). Die M1- und M2-Makrophagen liegen in 8 der 18 Gewebeproben im Übergang von der Intima zur Plaque. In weiteren 8 Proben sind sie ausschließlich in der Intima identifizierbar und in einer Probe ausschließlich in der Plaque (Probe Nr. 9, Tabelle 12). In den gewählten Ausschnitten konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression der M1- und M2-Makrophagenmarker zwischen Plaque in der A. iliaca und in der A. femoralis gefunden werden.

Insgesamt wurden sowohl in der A. iliaca als auch in der A. femoralis jeweils zur Hälfte CD68- bzw. CD163 positive Zellen gezählt.

Ergebnisse

Pat. Nr.	Lokalisation	Gefäßabschnitt	Anzahl CD68 +	davon S1PR1 +	Anteil in %	Anzahl CD163 +	davon S1PR1 +	Anteil in %
1	A.iliaca	Intima/Plaque	19	19	100	10	10	100
2	A.iliaca	Intima/Plaque	11	3	27	30	10	33
3	A.iliaca	Intima/Media	5	5	100	10	10	100
4	A.iliaca	Intima/Plaque	11	8	73	47	32	68
5	A.iliaca	Intima/Plaque	14	14	100	27	27	100
6	A.iliaca	Intima	23	23	100	30	30	100
7	A.femoralis	Intima	10	10	100	20	20	100
8	A.femoralis	Intima/Plaque	20	8	40	19	10	53
9	A.femoralis	Plaque	26	25	96	50	49	98
10	A.femoralis	Intima	35	35	100	61	61	100
11	A.iliaca	Intima	2	2	100	5	5	100
12	A.iliaca	Intima/Plaque	21	21	100	15	15	100
13	A.iliaca	Intima/Plaque	8	8	100	9	9	100
14	A.femoralis	Intima	8	8	100	13	13	100
15	A.femoralis	Intima	0	0	0	14	14	100
16	A.femoralis	Intima/Plaque	10	10	100	11	11	100
17	A.femoralis	Intima	9	9	100	8	8	100
18	A.femoralis	Intima	9	9	100	23	23	100
TOTAL			241	217	90	402	357	89

Tabelle 12: Plaques der A. iliaca und A. femoralis. Die Proben wurden Immunfluoreszenzdoppelfärbungen für CD68/S1PR1 bzw. CD163/S1PR1 unterzogen. Anschließend wurden die Regionen lichtmikroskopisch eingestellt, die in Abbildung 16 im schwarzen Kasten zu sehen sind und bildlich festgehalten (Region in Spalte 3 beschrieben). Es wurden zunächst alle Makrophagen (CD68-positive Zellen in Spalte 4, CD163-positive Zellen in Spalte 7) innerhalb dieses Bildes ausgezählt. Anschließend wurde die Anzahl der S1PR1-positiven CD68-Makrophagen gezählt (Spalte 5) und ihr Anteil in Prozent errechnet (Spalte 6). Ebenso wurde für die Auszählung der S1PR1-positiven CD163-Makrophagen verfahren. 90% der CD68- und CD163-positiven Zellen sind S1PR1-positiv.

4 Diskussion

Laut statistischem Bundesamt stellen Herz-Kreislauf-Erkrankungen die häufigste Todesursache in Deutschland dar (82). Eine generalisierte Atherosklerose ist Ausgangspunkt für die Ausbildung einer pAVK, KHK oder Stenosen der Halsgefäße mit dem konsekutiv erhöhten Risiko, an einem Herzinfarkt oder ischämischen Insult zu versterben. Zahlreiche Forschungsansätze fokussieren sich daher auf den Prozess der Atherosklerose, um die zugrundeliegenden Pathomechanismen zu untersuchen und damit neue Therapien entwickeln zu können. S1P ist ein bioaktives Sphingolipid, das durch Kopplung an fünf verschiedene Rezeptoren zahlreiche physiologische und pathophysiologische Prozesse, wie u.a. Zellmigration- und Proliferation, reguliert (1). Im Prozess der Atherosklerose werden den S1P Rezeptoren sowohl pro- als auch antiatherogene Effekte zugeschrieben (1, 67). Diese Arbeit untersucht die Expression des S1PR1 in Proben humaner Plaques, um zunächst S1PR1-positive Zellen zu identifizieren, die in der Pathogenese der Atherosklerose eine Rolle spielen könnten. Bekannt ist, dass der endotheliale S1PR1 für die Integrität des Endothels eine wichtige Rolle spielt. Es ist daher denkbar, dass ein Verlust des S1PR1 im Plaqueendothel zur Plaqueprogression beiträgt. Aufgrund der promigratorischen Eigenschaften des S1PR1 sollten diese Untersuchungen auch zeigen, ob Plaque-Immunzellen wie beispielsweise Makrophagen S1PR1 exprimieren. Ein solcher Befund könnte bedeuten, dass S1PR1 für die Transmigration dieser Zellen in die Gefäßwand verantwortlich ist.

Es wurden Immunfluoreszenzdoppelfärbungen mit S1PR1 und zwei Makrophagenmarkern (CD68, CD163), einem Marker für Endothelzellen (CD31) und einem Marker für glatte Muskelzellen (SMA) angefertigt.

4.1 S1PR1 im gesunden Gefäß

In der gesunden Kontrollprobe wurden sowohl im Endothel der A. iliaca und A. femoralis als auch im Endothel der Vasa vasorum CD31/S1PR1-positive Zellen gefunden (s. Abbildung 14 und Abbildung 15). Diese Beobachtungen stehen in Übereinstimmung mit der aktuellen Literatur, dass der S1PR1 generell von Endothelzellen exprimiert wird (39, 51, 52, 78). Dagegen wurde in keiner der beiden Arterien S1PR1-positive Zellen in der Media detektiert. Diese Beobachtung steht in scheinbarem Widerspruch zu einer Studie von Brätz et al., die in der humanen A. mammaria interna (IMA) S1PR1-positive glatte Muskelzellen (GMZ) beschreibt (83). Der Grund hierfür könnte in arterienspezifischen Unterschieden hinsichtlich der S1PR1-Expression der GMZ liegen. Zum anderen muss bedacht werden, dass die IMAs für die erwähnte Studie (83) im Rahmen einer Bypassoperation gewonnen wurden und dementsprechend aus schwerkranken KHK Patienten stammen. Damit kann

nicht ausgeschlossen werden, dass in diesen Patienten durch krankheitsbedingte, systemische Faktoren in der IMA die Expression des S1PR1 in GMZ induziert wurde, ohne dass die Gefäße selbst atherosklerotische Veränderungen zeigten.

Während man also davon ausgehen kann, dass gesunde, adulte GMZ den S1PR1 nicht signifikant exprimieren, gibt es Hinweise, dass der S1PR1 während der Embryogenese auch in GMZ eine Rolle spielt. So fanden Kluk & Hla, dass GMZ muriner Jungtiere neben dem S1PR2 und S1PR3 auch den S1PR1 exprimieren, während die GMZ adulter Tiere ausschließlich den S1PR2 und S1PR3 exprimieren. Demnach wäre denkbar, dass embryonale GMZ S1PR1 exprimieren und sich die Expression im Laufe der Entwicklung verringert (79). Neben dem Endothel wurden in der gesunden A. iliaca bzw. A. femoralis auch vereinzelt S1PR1-positive Zellen in der Adventitia detektiert. Experimente zur Identifizierung dieser Zellen wurden nicht durchgeführt. Doch kann man davon ausgehen, dass es sich hierbei um residente Immunzellen handelt.

4.2 S1PR1 in der Plaque

Um die S1PR1 Expression in atherosklerotischen Plaques zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit insgesamt 18 Plaques von pAVK Patienten untersucht, die chirurgisch mittels TEA gewonnen worden waren. Diese wurden mittels Färbungen für den S1PR1 und bestimmten Zellmarkern (CD31, CD68, CD163 und SMA) analysiert. Eine erste offensichtliche Beobachtung bestand darin, dass in diesen Präparaten S1PR1-positive Zellen in der Intima nachweisbar waren. Eine erhöhte S1PR1-Expression in humanen Femoralisplaques wurde auch in einer kürzlich erschienenen Studie von Liu et al. gefunden (84). Die Plaques stammten von einem mit dieser Studie vergleichbarem Patientengut und wurden *ex-vivo* mittels mikro-PET sowie einem in der Autoradiographie sichtbarem S1PR1-spezifischem Radioliganden analysiert. Die Bilder wurden dann mit histologischen Untersuchungen verglichen. Zusätzlich wurden S1PR1-positive Zellen manuell ausgezählt. Während in der Plaqueregion im Mittel $73,38 \pm 14,35$ S1PR1 positive Zellen pro $5000 \mu\text{m}^2$ gezählt wurden, waren es im gesunden Kontrollgewebe lediglich $2,71 \pm 1,17$ Zellen pro $5000 \mu\text{m}^2$. Bei den Plaquepräparaten handelte es sich um Regionen mit ausgeprägter Schaumzellakkumulation, die in der HE-Färbung sichtbar waren. Darüberhinaus wurden auch murine Atherosklerosemodelle untersucht. Immunhistochemische Färbungen wurden an verschiedenen Gefäßen (Aortenwurzel, Aorta, Femoralarterie) (84) von ApoE $-/-$ Mäusen unter cholesterolreicher Diät (6 Wochen bis 6,5 Monate) durchgeführt. Nach 8 Monaten wiesen diese Mäuse (n=3) im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen ausgeprägte Plaques auf. Eine weitere Anzahl an Femoralisgefäßen (n=3) der ApoE $-/-$ Mäuse wurde nach 6 und 12 Wochen unilateral verletzt, mit der Folge, dass es zu einer Intimahyperplasie kam. In beiden Modellen kam es im Vergleich zu den Kontroll-Tieren zu einem Anstieg der S1PR1-

Expression. Während sich im Atherosklerosemodell die S1PR1-positiven Signale im Bereich der Schaumzellakkumulation befanden, wies das akute Verletzungsmodell positive Signale im Bereich einer als Reaktion auf die Verletzung entstandenen Verdickung der Intima/Media auf. Eine genauere Charakterisierung der S1PR1-positiven Zellen wurde im Rahmen dieser Studie nicht vorgenommen (84).

4.2.1 Expression des S1PR1 im Endothel

Wie in den gesunden Gefäßen wurde auch das Endothel der erkrankten Gefäße positiv für S1PR1 gefärbt (s. Abbildung 17, Abbildung 18 A-C, Abbildung 19 D-F). Dabei zeigten sich quantitativ keine offensichtlichen Unterschiede in der Färbeintensität zwischen gesunden und erkrankten Gefäßen (vgl. Abbildung 14 und Abbildung 17). Allerdings war in Bereichen mit ausgeprägter Plaqueformation oft keine durchgehende Endothelschicht erkennbar (s. Abbildung 16, Proben 2, 6, 9-10). Ob dieser Beobachtung tatsächlich ein physiologischer Verlust des Endothels oder ein Präparationsartefakt zugrunde lag, wurde nicht weiter untersucht. Die Expression des S1PR1 auf Endothelzellen spielt eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion. Durch Stärkung von Zell-Zell-Kontakten und Aktivierung der eNOS verringert S1PR1 die Gefäßpermeabilität und wirkt anti-apoptotisch auf Endothelzellen (53, 54, 57-59). Eine Erhöhung der endothelialen Permeabilität ist entscheidend für die Einwanderung von inflammatorischen Zellen und somit der Entstehung einer Atherosklerose. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die S1PR1-Expression in murinen Endothelzellen in Bereichen mit erhöhtem turbulenten Fluss ansteigt (85). Dafür wurden verschiedene Aortenabschnitte immunhistochemisch untersucht. Dabei wurde im Vergleich zur A. carotis bzw. Aorta descendens eine erhöhte S1PR1-Expression im Bereich der Bifurkation der Bauchaorta, der kleinen Krümmung des Aortenbogens sowie der Aortenklappe gefunden, also in Abschnitten des Gefäßsystems, in dem es auch verstärkt Flussturbulenzen gibt und die daher prädestiniert für die Entstehung atherosklerotischer Plaques sind. Die vermehrte Expression von S1PR1 an diesen Stellen könnte Teil einer Reaktion des Endothels darstellen, die vaskuläre Barriere zu stärken. Allerdings gibt es auch gegenteilige Befunde. Jung et al. fanden, dass der S1PR1 an Stellen mit erhöhten turbulenten Strömungen, wie in der kleinen Krümmung des Aortenbogens, internalisiert wurde und in endozytotischen Vesikeln vorzufinden war, während er in der Aorta descendens auf der Plasmamembran des Endothels exprimiert war (86). Dieses würde bedeuten, dass S1PR1 in den Bereichen turbulenter Strömungen weniger aktiv ist, was eine direkte Erhöhung der vaskulären Permeabilität zur Folge haben könnte. Ob und wie genau die S1PR1-Expression im Endothel durch Änderung der Strömungseigenschaften des Blutes reguliert wird, ist also unklar.

4.2.2 CD31/S1PR1-positive Zellen in der Intima

Zusätzlich zum Endothel wurden S1PR1+/CD31+ Zellen auch in der verbreiterten Intima einer Plaque detektiert (s. Abbildung 18 D-F und Abbildung 19 A-C). Ein Vergleich der CD31/S1PR1 Doppelfärbungen mit Färbungen für Makrophagenmarkern (s.u.) lässt vermuten, dass es sich bei diesen Zellen zumindest teilweise um Makrophagen handelt. Dafür spricht auch, dass CD31 positive Makrophagen in Plaque bereits beschrieben wurden (87). Darüberhinaus besteht die Möglichkeit, dass endotheliale Vorläuferzellen (endothelial progenitor cells, EPC) die Intima invadieren (88). Interessanterweise fand eine kürzlich veröffentlichte Studie, dass S1PR1 die Proliferation von EPCs fördert und auch in diesen Zellen anti-apoptotisch wirkt (89).

4.2.3 Expression des S1PR1 auf Makrophagen

Weiter wurde untersucht, ob es sich bei den S1PR1-positiven Zellen, die nicht positiv für CD31 waren (s. Abbildung 18 D-F und Abbildung 19 A-C), um Makrophagen handeln könnte (s. auch oben). Dazu wurden Doppelfärbungen für S1PR1 und den Makrophagenmarkern CD68 bzw. CD163 angefertigt. CD68 ist ein pan-Makrophagenmarker, während die Expression von CD163 auf M2 Makrophagen beschränkt sein sollte. Die Auswertung der Doppelfärbungen ergaben, dass 90% der CD68-positiven und 89% der CD163-positiven Zellen S1PR1 positiv waren (s. Kapitel 3.2.3). Demnach gehen wir davon aus, dass Makrophagen unabhängig von ihrer Polarisierung S1PR1 exprimieren. Da sich die CD68- bzw. CD163-Färbungen teilweise ausgeschlossen haben (s. Abbildung 26), scheint CD68 nicht als pan-Makrophagenmarker einsetzbar zu sein. Makrophagen wurden sowohl in der Intima (s. Abbildung 23) als auch in der Plaque gefunden (s. Abbildung 21). Hier befanden sich Makrophagen zahlreich an der Plaque-Grenze (s. Abbildung 21, Abbildung 24, Abbildung 26). Es wurden kaum Makrophagen in der Media detektiert. Da Makrophagen maßgeblich bei der inflammatorischen Reaktion im Prozess der Atherosklerose beteiligt sind, ist ihr Vorkommen und ihr Verteilungsmuster von besonderem Interesse (20, 32). Ein signifikanter Unterschied in der Verteilung von CD68- und CD163-positiven Zellen innerhalb des Gefäßes wurde nicht beobachtet (s. auch Tabelle 12, Kapitel 3.2.3). Inwiefern ein bestimmtes Makrophagenverteilungsmuster mit der Plaquebelastung einhergeht, untersuchten Stöger et al. in humanen atherosklerotischen Plaques (90). Es wurden frühe, fortgeschrittene und hämorrhagische Plaques hinsichtlich ihrer M1- und M2-Makrophagenexpression untersucht. Dabei wurden ebenfalls CD68 und CD163 Färbungen angewandt. Da CD68-positive Zellen vor allem in instabilen Schulterregionen zu finden waren und weniger in der fibrösen Kappe, gehen die Autoren bei diesen Zellen von primär atherogenen M1-

Makrophagen aus. CD163-positive Zellen wurden vor allem in hämorrhagischen Plaques aber auch in frühen Läsionen gesehen. Im Gegensatz zu M1-Makrophagen akkumulierten sie nicht nur in der Plaqueregion, sondern auch in der Adventitia (90). Interessanterweise zeigte die Studie auch, dass es in fortgeschrittenen Plaques sowie in Gefäßen mit Plaqueruptur zu einer Akkumulation beider Makrophagenpopulationen kam. Außerdem korrespondierte die Akkumulation beider Subtypen mit der Plaqueprogression. Diese Erkenntnis würde mit den Ergebnissen dieser Arbeit einhergehen, da es sich auch hier um fortgeschrittene Plaques handelt, die einer operativen Intervention bedurften und auch hier gezeigt werden konnte, dass M1- und M2-Makrophagen koexistieren.

Die Koexistenz von M1- und M2-Makrophagen in Plaques wurde bereits zahlreich beschrieben (80, 91-94). Während einige Autoren davon ausgehen, dass nach Gewebeschaden zunächst pro-inflammatorische M1-Makrophagen einwandern, die durch Interleukinproduktion (IL-6, IL-12, IL1 β) die inflammatorische Reaktion aufrechterhalten und im Verlauf anti-inflammatorische M2-Makrophagen hinzukommen, die die Wundheilung und Gewebereparatur fördern (91), gehen andere Autoren davon aus, dass Makrophagen einen phänotypischen „switch“ (M1 \rightarrow M2) durchlaufen (92). Funktionell wurden für S1PR1 auf Makrophagen anti-inflammatorische Eigenschaften beschrieben. So zeigten Hughes et al. in *in-vitro* Versuchen mit murinen Makrophagen, dass der Einsatz des spezifischen S1PR1-Agonisten SEW2871 zu einer reduzierten iNOS-Aktivität und Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins TNF-alpha, sowie einer gesteigerten Expression von Arginase I (Arg I), einem anti-inflammatorischen Enzym, führte (80). Auf der anderen Seite könnte S1PR1 aber auch pro-atherogene Eigenschaften besitzen, indem er die Migration von Makrophagen stimuliert (95). Ob S1PR1 letztendlich pro- oder anti-atherogen wirkt, ist ungeklärt. Für letzteres sprechen Experimente mit einem spezifischen S1PR1 Agonisten (KPR-203) in einem Mausmodell für Atherosklerose (62). Dabei zeigten LDLR-/- Mäuse unter cholesterolreicher Diät nach Gabe von KRP-203 eine verringerte Plaquebelastung in der Aorta, welche mit einer verringerten Präsenz von Makrophagen einherging.

4.2.4 Expression des S1PR1 in der Media

In der Media wurden S1PR1-positive Zellen gefunden, die weder Makrophagen noch CD31-positiven Zellen zugeordnet werden konnten (s. Abbildung 21 A-C, Abbildung 22 A-C). Nach derzeitigen Erkenntnissen exprimieren adulte GMZ vor allem den S1PR1, S1PR2 und S1PR3 (42, 44, 67, 69, 79, 96-99), wobei es sich hierbei hauptsächlich um Untersuchungen an Mäusen handelt. In der vorliegenden Arbeit konnte im gesunden Gefäß gezeigt werden, dass SMA-positive Zellen S1PR1-negativ sind. Um der Frage nachzugehen, ob glatte Muskelzellen in atherosklerotisch veränderten Gefäßen S1PR1 exprimieren, wurden die Schnitte einer S1PR1/SMA-Doppelfärbung unterzogen. Auch hier zeigte sich in den Proben

der erkrankten Gefäße, dass GMZ S1PR1-negativ erschienen (s. Abbildung 28 - Abbildung 31). In anderen Modellen wurden allerdings sehr wohl mediale S1PR1-positive Zellen beschrieben, so z.B. in Untersuchungen von Brätz et al., die in humanen IMAs eine Expression von S1PR1 in GMZ nachwiesen (83). Dazu wurden humane IMAs denudiert und in die Position der Aorta abdominalis immunsupprimierter Ratten transplantiert. Als Antwort auf die Verletzung entwickelte sich sowohl eine Intimahyperplasie als auch eine Mediahyperplasie der humanen Zellen. Nach 7, 14 und 28 Tagen wurden die Transplantate entnommen und mittels Immunofluoreszenz für S1PR1 gefärbt. Ergebnis dieser Untersuchungen war, dass im Vergleich zur naiven IMA die Anzahl S1PR1-positiver Zellen sowohl in der Media als auch in der Intima anstieg. Dabei waren fast alle Zellen der Intima an Tag 7 und Tag 14 S1PR1-positiv (83). Ein direkter Vergleich dieser Studie mit der vorliegenden Arbeit kann insofern nicht gezogen werden, als dass es sich bei der genannten Studie um ein Modell der Intimahyperplasie handelt und nicht um fortgeschrittene Plaques im Rahmen einer Atherosklerose. Es wäre demnach denkbar, dass GMZ im akuten Verletzungsmodell S1PR1 exprimieren, während sie dies im Prozess der Atherosklerose, einer chronisch-inflammatorischen Entzündungsreaktion, nicht mehr vermögen. Außerdem kann wie bereits weiter oben beschrieben vermutet werden, dass es arterienspezifische Unterschiede hinsichtlich der S1PR1-Expression auf GMZ gibt. Die Tatsache, dass in den vorliegenden Präparaten keine S1PR1-positiven intimalen GMZ gefunden wurden, würde mit den Ergebnissen von Poti et al. übereinstimmen, die mittels SMA Färbungen zeigten, dass 6 und 16 Wochen nach Behandlung LDL-R^{-/-} Mäuse mit KRP-203, einem spezifischen S1PR1-Analogen, die Anzahl an glatten Muskelzellen und ihre Lokalisation in den atherosklerotischen Läsionen im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert blieb (62). Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der Studie von Kluk & Hla, die wie bereits weiter oben beschrieben, sowohl eine S1PR1-Expression in intimalen GMZ von Jungtieren als auch in adulten medialen GMZ nachwiesen, wobei die S1PR1-Expression der intimalen GMZ deutlich höher war (79). Dies lässt die Frage zu, ob es Subtypen von GMZ gibt, die unterschiedlich S1PR1 exprimieren. Demnach wäre es möglich, dass es sich bei den S1PR1-positiven/SMA-negativen Zellen um GMZ handelt, die zwar S1PR1 exprimieren, die Fähigkeit SMA zu exprimieren hingegen verloren haben. Erklären ließe sich dies durch den phänotypischen switch, mit dem sich bis dato zahlreiche Autoren beschäftigt haben (100, 101). GMZ lassen sich dabei in zwei Subtypen, den differenzierten und den dedifferenzierten GMZ klassifizieren. Differenzierte GMZ zeichnen sich durch kontraktile Eigenschaften aus. Sie können jedoch unter bestimmten Bedingungen, wie z.B. nach Gefäßverletzungen einen dedifferenzierten, synthetisch-proliferativen Phänotyp annehmen (100). Dieser Prozess ist gekennzeichnet durch eine Abnahme der Expression GMZ-spezifischer Gene, wie z.B. SMA (81, 101). Inwiefern

S1PR1 dabei eine Rolle spielt, untersuchten Wamhoff et al. in Rattenkarotiden nach akuter ballon-induzierter Verletzung. Während die Level an S1PR1- und S1PR3 mRNA nach Verletzung signifikant anstiegen, war eine Reduktion der S1PR2 mRNA um 55% zu vermerken. *In-vitro* reduzierte der Einsatz des S1PR1 und S1PR3 Antagonisten VPC25239 die S1P-induzierte Proliferation glatter Muskelzellen und führte gleichzeitig zu einer S1P-induzierten Aktivierung der GMZ-Differenzierungsmarker SMA und SMMHC (Smooth muscle myosin heavy chain) (68). Es wird daher vermutet, dass S1PR1 und S1PR3 Gene unterdrücken, die den kontraktile Phänotypen der GMZ definieren und positiv auf die Proliferation GMZ wirken. Dies würde bedeuten, dass es sich bei den S1PR1-positiven/SMA-negativen Zellen in den atherosklerotischen Plaques dieser Arbeit um dedifferenzierte GMZ mit stark reduzierter SMA-Expression handeln könnte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen zusammenfassend vermuten, dass S1PR1 nicht oder nur gering von SMA-positiven GMZ exprimiert wird, es aber durchaus denkbar wäre, dass dedifferenzierte GMZ S1PR1 exprimieren. Dafür würde die hohe Anzahl an S1PR1 in der Media und Intima sprechen, die keinem der hier untersuchten Zelltypen zugeordnet werden konnte.

4.3 Limitationen

Eine entscheidende Limitation stellt das Patientenkollektiv mit nur 18 Gewebeproben dar. Neben einem größeren Kollektiv müssten zukünftig weitere Gefäße untersucht werden, um allgemeingültige Aussagen treffen zu können bzw. gefäß-spezifische Effekte beschreiben zu können.

Eine weitere Limitation bei der Identifizierung S1PR1-positiver Zellen in atherosklerotischen Plaques stellt das Fehlen der Adventitia bzw. der äußeren Mediaschichten dar, da alle untersuchten Präparate mittels TEA gewonnen wurden. Da die Adventitia Immunzellen sowie pluripotente Vorläuferzellen beinhaltet, die eine Rolle bei der Entstehung atherosklerotischer Plaques spielen könnten, wäre hier eine Untersuchung S1PR1-positiver Zellen sicher sinnvoll. Weiterhin bleibt offen, um welche Zelltypen es sich bei den S1PR1-positiven Zellen handelt, die weder CD31, SMA oder einen der Makrophagenmarker exprimieren. In Frage kämen beispielsweise dedifferenzierte glatte Muskelzellen. Sicherlich wären weitere Doppelfärbungen zur Identifizierung der Zellen sinnvoll (bspw. Leukozytenmarker wie CD45 oder weitere Makrophagenmarker wie CD89). Eine ebenfalls entscheidende Limitation stellt die Heterogenität der Plaques dar, die einen direkten Vergleich der Gewebeproben untereinander erschwerten. Unklar bleibt auch, inwieweit Makrophagen beide Marker, CD68 und CD163 exprimieren. Klar ist, dass sich die Expression der beiden Marker teilweise ausschließt und CD68 damit nicht als pan-Makrophagenmarker bezeichnet werden kann.

5 Fazit und Ausblick

S1P und seine Rezeptoren regulieren eine Vielzahl sowohl physiologischer als auch pathophysiologischer Prozesse. Inwieweit S1PR1 eine Rolle im Prozess der Atherosklerose spielt, ist bisher nicht zufriedenstellend geklärt. Die vorliegende Arbeit erbringt Erkenntnisse über die S1PR1-Expression in humanen A. iliaca- und A. femoralis-Plaques. Die Untersuchungen konnten zeigen, dass S1PR1 in Plaques exprimiert wird. Im gesunden Gefäß sowie in Gefäßabschnitten, die nicht unmittelbar von Plaque betroffen waren, wird S1PR1 vom Endothel exprimiert. Außerdem scheinen weitere CD31/S1PR1-positive Zellen in der Intima vorzukommen, bei denen es sich möglicherweise um CD31-exprimierende Makrophagen oder Lymphozyten handeln könnte. Weiter wurde nachgewiesen, dass S1PR1 im erkrankten Gefäß neben Endothelzellen auch von Makrophagen exprimiert wird, die vor allem in der Plaque lokalisiert waren. Dabei handelte es sich sowohl um M1- als auch um M2-Makrophagen. Eine S1PR1-Expression in SMA-positiven GMZ wurde weder in gesunden noch in erkrankten Gefäßen beobachtet. Wichtige Fragen sind nun, ob S1PR1 bei der Transmigration von Makrophagen in die Gefäßwand eine Rolle spielt und ob S1PR1 von dedifferenzierten GMZ exprimiert wird.

6 Zusammenfassung

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) ist ein bioaktives Sphingolipid, das durch Bindung an fünf verschiedene G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren (S1PR1-5) zahlreiche Prozesse auf physiologischer und pathophysiologischer Ebene reguliert. Im Gefäßsystem werden die S1P-Rezeptoren 1-3 exprimiert, die nach derzeitiger Studienlage auch im Prozess der Atherosklerose eine wichtige Rolle einnehmen könnten.

In dieser Arbeit wurden in Rahmen einer Thrombendarteriektomie gewonnene, humane Plaques hinsichtlich ihrer S1PR1-Expression untersucht. Dazu wurden 18 formalin-fixierte Proben der A. iliaca und der A. femoralis histologisch aufbereitet und Immunfluoreszenzdoppelfärbungen mit S1PR1 und einem Endothelzell-Marker (CD31), zwei Makrophagenmarkern (CD68, CD163) sowie einem Marker für glatte Muskelzellen (SMA) unterzogen. Als Kontrolle diente jeweils eine nicht-erkrankte Probe der A. iliaca und der A. femoralis eines 23-jährigen Verstorbenen.

Die Untersuchungen ergaben, dass S1PR1 in Plaques exprimiert wird und zwar nicht nur vom Endothel, wo es auch im gesunden Gefäß zu finden ist, sondern zusätzlich in der Plaque selbst, in der verbreiterten Intima und in der Media. In der verbreiterten Intima befanden sich CD31/S1PR1-positive Zellen, bei denen es sich möglicherweise um CD31-positive Makrophagen handeln könnte. Weiter fiel auf, dass S1PR1 sowohl von M1- als auch von M2-Makrophagen exprimiert wird. Die glatten Muskelzellen (GMZ) befanden sich im Vergleich zur Kontrolle nicht nur in der Media und den Vasa vasorum, sondern auch in der Intima. Dabei exprimierten weder die intimalen noch die medialen GMZ S1PR1. Es wäre aber vorstellbar, dass S1PR1 von dedifferenzierten GMZ exprimiert wird, die im Vergleich zu differenzierten GMZ die Fähigkeit verloren haben, SMA zu exprimieren. Dafür würde die hohe Anzahl an S1PR1-positiven Zellen sprechen, die weder Endothelzellen noch Makrophagen zugeordnet werden konnten.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser Arbeit daraufhin, dass S1PR1 im humanen Gefäßsystem Einfluss auf die Atherosklerose besitzt. Welche Funktionen S1PR1 in den verschiedenen Zelltypen ausübt, bleibt vorerst offen und sollte weiterer Bestandteil der Forschung sein.

7 Summary and conclusions

S1P and its receptors regulate many physiological as well as pathophysiological processes. A role of S1PR1 in atherosclerosis remains to be elucidated. The present work investigates arterial S1PR1 expression by immunofluorescence staining of healthy (n=2) and diseased human iliac as well as femoral arteries (n=18). Identification of S1PR1 positive cell types was attempted by co-staining with established cell markers including CD31 for endothelial cells, CD68 and CD163 for M1 and M2 macrophages, respectively, and SMA for smooth muscle cells (SMCs). In healthy arteries as well as in plaque-free areas of diseased arteries, S1PR1 expression was detected in the endothelium. In addition, CD31/S1PR1-positive cells were found in the intima. A possibility is that these cells are macrophages or lymphocytes. Moreover, our data indicate that both M1 and M2 macrophages localized in plaque express S1PR1. SMA-positive smooth muscle cells were never found to be S1PR1-positive. However, it cannot be excluded that de-differentiated SMC do express S1PR1. Important questions to be addressed in the future are possible roles for S1PR1 in macrophage migration and tissue invasion and also in SMC de-differentiation, a process that underlies intimal hyperplasia.

8 Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatcyklase
Ad	Adventitia
ApoE	Apolipoprotein E
ApoM	Apolipoprotein M
Aqua dest	Aqua destillata
Arg I	Arginase I
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of differentiation
CS	Chondroitinsulfat
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
EGF	Epidermal Growth Factor
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ERK	extracellular-signal regulated kinases
EvG	Elastica-van-Gieson
EZ	Endothelzelle
EZM	Extrazelluläre Matrix
FGF	Fibroblast Growth Factor
FK	fibrotische Kappe
FTY720-P	phosphoryliertes Fingolimod
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GMZ	Glatte Muskelzellen
GPCR	Guaninnucleotid protein-coupled receptor (G-Protein gekoppelter Rezeptor)
GTP	Guanosintriphosphat
G α_i	inhibitorisches G-Protein
HDL	High-Density Lipoprotein
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	Horseradish Peroxidase
HS	Heparansulfat
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN- γ	Interferon Gamma
IL	Interleukin
In	Intima
KHK	koronare Herzerkrankung
KO	Knockout

Abkürzungsverzeichnis

LAMP	lysosomal associated membrane protein (lysosomal assoziiertes Glykoprotein)
LDL	Low-Density Lipoprotein
LEE	Lamina elastica externa
LEI	Lamina elastica interna
LPS	Lipopolysaccharide
Lu	Lumen
Me	Media
mRNA	messenger RNA
NO	Nitric oxide (Stickstoffmonoxid)
NOD-Mäuse	Non-Obese Diabetic-Mäuse
oxLDL	oxidiertes Low-Density Lipoprotein
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
Pi3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKB	Phosphokinase B
PKC	Proteinkinase C
PI	Plaque
PTA	perkutane transluminale Angioplastie
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
ROI	Reactive Oxygen Intermediates
RT	Raumtemperatur
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1PR	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor
SMA	Smooth Muscle Actin
SMMHC	Smooth muscle myosin heavy chain
SphK	Sphingosinkinase
TBS	Tris-buffered saline (Pufferlösung)
TEA	Thrombendarteriektomie
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TSA	Tyramin-katalysierte Signal-Amplifikation
ü.N.	über Nacht
VEGF	vascular endothelial growth factor
VLDL	Very-Low-Density Lipoprotein
Vv	Vasa vasorum

9 Literaturverzeichnis

1. 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.
2. Ehmke H. Hochdruck- und Niederdrucksystem. In: Pape H, Kurtz A, Silbernagl S, Hrsg. *Physiologie*. 8. Auflage, Stuttgart: Thieme; 2018:217-219
3. 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.
4. Lobstein JF. *Traité d'anatomie pathologique*. Vol.1, Paris: Levrault; 1829.
5. Marchand F, Über Arteriosklerose. *Verhandlungen des Kongresses für Innere Medizin*; 21. Kongress, Leipzig; 1904:23-59.
6. Lange F. Studien zur Pathologie der Arterien, insbesondere zur Lehre von der Arteriosklerose. *Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin*. 1924;248(3):463-604.
7. Mönckeberg J. Über die reine Mediaverkalkung der Extremitätenarterien und ihr Verhalten zur Arteriosklerose. *Virchows Archiv*. 1903;171(1):141-167.
8. Kannel WB. CHD risk factors: a Framingham study update. *Hosp Pract (Off Ed)*. 1990;25(7):119-127, 30.
9. Keil U. Coronary artery disease: the role of lipids, hypertension and smoking. *Basic Research Cardiology*. 2000;95 Suppl 1:152-8.
10. Stille W, Stephan C. Arteriosklerose – eine chronische Infektionskrankheit durch *Chlamydia pneumoniae*. *Gefäßchirurgie*. 1999;4(4):185-193.
11. Erbel R, Möhlenkamp S, Lehmann N, Schmermund A, Moebus S, Stang A, et al. Kardiovaskuläre Risikofaktoren und Zeichen subklinischer Atherosklerose. *Deutsches Ärzteblatt*. 2008;105:1-8.
12. Criqui MH, Fronek A, Barrett-Connor E, Klauber MR, Gabriel S, Goodman D. The prevalence of peripheral arterial disease in a defined population. *Circulation*. 1985;71(3):510.
13. Lawall H, Amann B, Tigges W. Diagnostik und Therapie der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (PAVK). *Diabetologie und Stoffwechsel*. 2011;6(06):71-82.
14. Debus ES, Augustin M, Larena-Avellaneda A, Flessenkämper I. Stationäre Versorgung der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (PAVK) durch die Gefäßchirurgie. *Gefäßchirurgie*. 2014;19(2):127-134.

15. Diehm C., Trampisch H.-J. Definition und Epidemiologie. *Vasa. European Journal of Vascular Medicine*. 2009;38(75):9-12.
16. Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. *The American Journal of Pathology*. 1977;86(3):675-684.
17. Verhaar M, Rabelink T. Endothelial Function: Strategies for Early Intervention. *Cardiovascular Drugs Therapy*. 1998;12(1):125-134.
18. Handa P, Tateya S, Rizzo NO, Cheng AM, Morgan-Stevenson V, Han CY, et al. Reduced vascular nitric oxide-cGMP signaling contributes to adipose tissue inflammation during high-fat feeding. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2011;31(12):2827-2835.
19. Gimbrone MA, Jr., Garcia-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circulation Research*. 2016;118(4):620-636.
20. Yurdagul A, Finney A, Woolard MD, Orr AW. The Arterial Microenvironment: The Where and Why of Atherosclerosis. *The Biochemical journal*. 2016;473(10):1281-1295.
21. Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life sciences*. 2004;75(6):639-653.
22. Dresel HA. Die mögliche Bedeutung von LDL-Scavenger-Rezeptoren in der Pathogenese der Arteriosklerose bei Hypercholesterinämie. In: Klose G, Hrsg. *Arteriosklerose*. Berlin Heidelberg: Springer; 1989:26-34.
23. Li AC, Glass CK. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nature Medicine*. 2002;8(11):1235-1242.
24. Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, et al. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990;87(13):5134-5138.
25. Bath PM, Gladwin AM, Martin JF. Human monocyte characteristics are altered in hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis*. 1991;90(2-3):175-181.
26. Munro JM, Cotran R. The Pathogenesis of Atherosclerosis: Atherogenesis and Inflammation. In: Rubin E, Damjanov I, Hrsg. *Pathology Reviews*; New Jersey: Humana Press; 1989:171-183.
27. Ross R, Glomset J, Kariya B, Raines E. Role of platelet factors in the growth of cells in culture. *National Cancer Institut Monographs*. 1978(48):103-108.
28. Farzaneh-Far A, Rudd J, Weissberg PL. Inflammatory mechanisms Ischaemic heart disease. *British medical bulletin*. 2001;59(1):55-68.

29. Müller JG, Kuhlencordt P. Pathogenese und klinische Grundlagen. In: Debus ES, Gross-Fengels W, Hrsg. Operative und interventionelle Gefäßmedizin. Berlin Heidelberg: Springer; 2012:104
30. 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):2493-2503.
31. Libby P, Aikawa M. Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets. *Nature medicine*. 2002;8(11):1257-1262.
32. Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *New England journal of medicine*. 1999;340(2):115-126.
33. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003;19(1):71-82.
34. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: Potential targets of anti-cancer therapy. *European Journal of Cancer*. 2006;42(6):717-727.
35. Buechler C, Ritter M, Orsó E, Langmann T, Klucken J, Schmitz G. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro-and antiinflammatory stimuli. *Journal of Leukocyte Biology*. 2000;67(1):97-103.
36. Cullen P, Rauterberg J, Lorkowski S. The Pathogenesis of Atherosclerosis. In: von Eckardstein A, Hrsg. Atherosclerosis: Diet and Drugs. Handbook of Experimental Pharmacology. 1. Auflage. Berlin-Heidelberg: Springer;2005:3-70.
37. Eidt D, Roll S, Kulp W, Müller-Nordhorn J, Greiner CVW, Willich SN, et al. Bypassmaterialien in der Gefäßchirurgie. *Schriftenreihe Health technology assessment*. 2006;31
38. Takabe K, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S. “Inside-out” signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. *Pharmacological reviews*. 2008;60(2):181-195.
39. Spiegel S, Milstien S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2003;4(5):397-407.
40. Allende ML, Proia RL. Sphingosine-1-phosphate receptors and the development of the vascular system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2002;1582(1–3):222-227.
41. Sattler K, Levkau B. Sphingosine-1-phosphate as a mediator of high-density lipoprotein effects in cardiovascular protection. *Cardiovascular Research*. 2009;82(2):201-211.

42. Yanagida K, Hla T. Vascular and Immunobiology of the Circulatory Sphingosine 1-Phosphate Gradient. *Annual review of physiology*. 2017;79:67-91.
43. Hait NC, Oskeritzian CA, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2006;1758(12):2016-2026.
44. Proia RL, Hla T. Emerging biology of sphingosine-1-phosphate: its role in pathogenesis and therapy. *The Journal of Clinical Investigation*. 2015;125(4):1379-1387.
45. Keul P. Die Rolle der Sphingosin-1-Phosphat Rezeptoren in der Pathogenese der Atherosklerose [Dissertation]. Duisburg-Essen: Universität; 2010.
46. Soltau I, Mudersbach E, Geissen M, Schwedhelm E, Winkler MS, Geffken M, et al. Serum-Sphingosine-1-Phosphate Concentrations Are Inversely Associated with Atherosclerotic Diseases in Humans. *PloS one*. 2016;11(12):e0168302.
47. 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.
48. DiStefano PV, Smrcka AV, Glading AJ. Phospholipase C ϵ Modulates Rap1 Activity and the Endothelial Barrier. *PloS one*. 2016;11(9):e0162338.
49. Nagahashi M, Takabe K, Terracina KP, Soma D, Hirose Y, Kobayashi T, et al. Sphingosine-1-Phosphate Transporters as Targets for Cancer Therapy. *BioMed Research International*. 2014;2014:651727.
50. O'Sullivan C, Dev KK. The structure and function of the S1P1 receptor. *Trends Pharmacol Sci*. 2013;34(7):401-412.
51. Allende ML, Yamashita T, Proia RL. G-protein-coupled receptor S1P1 acts within endothelial cells to regulate vascular maturation. *Blood*. 2003;102(10):3665-3667.
52. Zeng Y, Adamson RH, Curry F-RE, Tarbell JM. Sphingosine-1-phosphate protects endothelial glycocalyx by inhibiting syndecan-1 shedding. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 2014;306(3):H363-H72.
53. Camerer E, Regard JB, Cornelissen I, Srinivasan Y, Duong DN, Palmer D, et al. Sphingosine-1-phosphate in the plasma compartment regulates basal and inflammation-induced vascular leak in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 2009;119(7):1871-1879.
54. Sammani S, Moreno-Vinasco L, Mirzapioazova T, Singleton PA, Chiang ET, Evenoski CL, et al. Differential effects of sphingosine 1-phosphate receptors on airway and vascular barrier function in the murine lung. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2010;43(4):394-402.

55. 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 S1P and S1P. *Biochemical and biophysical research communications*. 2016;476:627-634
56. Kwon YG, Min JK, Kim KM, Lee DJ, Billiar TR, Kim YM. Sphingosine 1-phosphate protects human umbilical vein endothelial cells from serum-deprived apoptosis by nitric oxide production. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(14):10627-10633.
57. Blaho VA, Hla T. An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors. *Journal of Lipid Research*. 2014;55(8):1596-1608.
58. Wilkerson BA, Argraves KM. The role of sphingosine-1-phosphate in endothelial barrier function. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1841(10):1403-1412.
59. Nofer JR, van der Giet M, Tolle M, Wolinska I, von Wnuck Lipinski K, Baba HA, et al. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *Journal of Clinical Investigation*. 2004;113(4):569-581.
60. Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, et al. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature*. 2004;427(6972):355-360.
61. Sensken SC, Nagarajan M, Bode C, Graler MH. Local inactivation of sphingosine 1-phosphate in lymph nodes induces lymphopenia. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2011;186(6):3432-3440.
62. Poti F, Gualtieri F, Sacchi S, Weissen-Plenz G, Varga G, Brodde M, et al. KRP-203, sphingosine 1-phosphate receptor type 1 agonist, ameliorates atherosclerosis in LDL-R-/- mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2013;33(7):1505-1512.
63. Nofer JR, Bot M, Brodde M, Taylor PJ, Salm P, Brinkmann V, et al. FTY720, a synthetic sphingosine 1 phosphate analogue, inhibits development of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation*. 2007;115(4):501-508.
64. Keul P, Tölle M, Lucke S, von Wnuck Lipinski K, Heusch G, Schuchardt M, et al. The sphingosine-1-phosphate analogue FTY720 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular biology*. 2007;27(3):607-613.
65. Kono M, Belyantseva IA, Skoura A, Frolenkov GI, Starost MF, Dreier JL, et al. Deafness and stria vascularis defects in S1P2 receptor-null mice. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(14):10690-10696.
66. 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):2506-2516.

67. Daum G, Grabski A, Reidy M. Sphingosine 1-phosphate A regulator of arterial lesions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2009;29(10):1439-1443.
68. 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):1454-1461.
69. Sanchez T. Sphingosine-1-Phosphate Signaling in Endothelial Disorders. *Current Atherosclerosis Reports*. 2016;18(6):1-13.
70. 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):1312-1318.
71. Skoura A, Michaud J, Im DS, Thangada S, Xiong Y, Smith JD, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor-2 function in myeloid cells regulates vascular inflammation and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2011;31(1):81-5.
72. Kimura T, Watanabe T, Sato K, Kon J, Tomura H, Tamama K, et al. Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of human endothelial cells possibly through the lipid receptors, Edg-1 and Edg-3. *Biochemecial Journal*. 2000;348:71-76.
73. 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.
74. Peters SLM, Alewijnse AE. Sphingosine-1-phosphate signaling in the cardiovascular system. *Current Opinion in Pharmacology*. 2007;7(2):186-192.
75. Keul P, Lucke S, von Wnuck Lipinski K, Bode C, Gräler M, Heusch G, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor 3 promotes recruitment of monocyte/macrophages in inflammation and atherosclerosis. *Circulation research*. 2011;108(3):314-323.
76. 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.
77. Brunkhorst R, Vutukuri R, Pfeilschifter W. Fingolimod for the treatment of neurological diseases—state of play and future perspectives. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2014;8:283.
78. Kono M, Mi Y, Liu Y, Sasaki T, Allende ML, Wu Y-P, et al. The sphingosine-1-phosphate receptors S1P1, S1P2, and S1P3 function coordinately during embryonic angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(28):29367-29373.

79. 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.
80. 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):950-958.
81. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiological reviews*. 2004;84(3):767-801.
82. Statistisches Bundesamt, Todesurdsachen in Deutschland. Sterbefälle nach ausgewählten Todesursachen, Altersgruppen und Geschlecht; Gestorbene in Deutschland. 2015;12(4):21-22
83. Braetz J, Becker A, Geissen M, Larena-Avellaneda A, Schrepfer S, Daum G. Sphingosine-1-phosphate receptor 1 regulates neointimal growth in a humanized model for restenosis. *Journal of Vascular Surgery*. 2018;68(6):201-207
84. Liu H, Jin H, Han J, Yue X, Yang H, Zayed MA, et al. Upregulated Sphingosine 1-Phosphate Receptor 1 Expression in Human and Murine Atherosclerotic Plaques. *Molecular imaging and biology*. 2017;20(3):448-456.
85. Galvani S, Sanson M, Blaho VA, Swendeman SL, Obinata H, Conger H, et al. HDL-bound sphingosine 1-phosphate acts as a biased agonist for the endothelial cell receptor S1P1 to limit vascular inflammation. *Science signaling*. 2015;8(389):ra79.
86. Jung B, Obinata H, Galvani S, Mendelson K, Ding BS, Skoura A, et al. Flow-regulated endothelial S1P receptor-1 signaling sustains vascular development. *Developmental cell*. 2012;23(3):600-610.
87. Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, Pigott R, Woolf N, Katz D, et al. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *The Journal of pathology*. 1993;171(3):223-229.
88. Du F, Zhou J, Gong R, Huang X, Pansuria M, Virtue A, et al. Endothelial progenitor cells in atherosclerosis. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*. 2012;17:2327-2349.
89. Wang H, Huang H, Ding SF. Sphingosine-1-phosphate promotes the proliferation and attenuates apoptosis of Endothelial progenitor cells via S1PR1/S1PR3/PI3K/Akt pathway. *Cell biology international*. 2018;42(11):1492-1502.
90. Stöger JL, Gijbels MJJ, van der Velden S, Manca M, van der Loos CM, Biessen EAL, et al. Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2012;225(2):461-468.

91. Wolfs IM, Donners MM, de Winther MP. Differentiation factors and cytokines in the atherosclerotic plaque micro-environment as a trigger for macrophage polarisation. *Thrombosis and haemostasis*. 2011;106(5):763-771.
92. Lee S, Huen S, Nishio H, Nishio S, Lee HK, Choi BS, et al. Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2011;22(2):317-326.
93. Khallou-Laschet J, Varthaman A, Fornasa G, Compain C, Gaston AT, Clement M, et al. Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. *PloS one*. 2010;5(1):e8852.
94. Waldo SW, Li Y, Buono C, Zhao B, Billings EM, Chang J, et al. Heterogeneity of human macrophages in culture and in atherosclerotic plaques. *American Journal of Pathology*. 2008;172(4):1112-1126.
95. Weichand B, Weis N, Weigert A, Grossmann N, Levkau B, Brune B. Apoptotic cells enhance sphingosine-1-phosphate receptor 1 dependent macrophage migration. *European journal of immunology*. 2013;43(12):3306-3313.
96. Murakami A, Takasugi H, Ohnuma S, Koide Y, Sakurai A, Takeda S, et al. Sphingosine 1-Phosphate (S1P) Regulates Vascular Contraction via S1PR3 Receptor: Investigation Based on a New S1P3 Receptor Antagonist, *Molecular Pharmacology*. 2010;77(4):704.
97. Ohmori T, Yatomi Y, Osada M, Kazama F, Takafuta T, Ikeda H, et al. Sphingosine 1-phosphate induces contraction of coronary artery smooth muscle cells via S1P2. *Cardiovascular Research*. 2003;58(1):170-177.
98. Ryu Y, Takuwa N, Sugimoto N, Sakurada S, Usui S, Okamoto H, et al. Sphingosine-1-phosphate, a platelet-derived lysophospholipid mediator, negatively regulates cellular Rac activity and cell migration in vascular smooth muscle cells. *Circulation research*. 2002;90(3):325-332.
99. Sanchez T, Hla T. Structural and functional characteristics of S1P receptors. *Journal of cellular biochemistry*. 2004;92(5):913-922.
100. Wang G, Jacquet L, Karamariti E, Xu Q. Origin and differentiation of vascular smooth muscle cells. *The Journal of physiology*. 2015;593(14):3013-3030.
101. Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiological reviews*. 1995;75(3):487-518.

10 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: **Schematischer Aufbau der Gefäßwand einer Arterie.** Zum Lumen hin besteht das Gefäß aus einer Tunica intima, die aus einer Endothelschicht, lockerem Bindegewebe und einer Lamina elastica interna besteht. Die Tunica media schließt sich der Intima an und besteht vorwiegend aus glatten Muskelzellen, Kollagenfibrillen und elastischen Fasern. Im Bindegewebe ist das Gefäß durch die äußere Tunica adventitia abgegrenzt. *Modifiziert nach Gasser TC et al. (3)*..... 2
- Abbildung 2: **Schematische Darstellung einer Plaque.** Details siehe Text; GMZ = glatte Muskelzellen, EZ = Endothelzellen; *modifiziert nach Ross R 1991 (32), © Massachusetts Medical Society.* 6
- Abbildung 3: **Binäre Klassifikation von M1- und M2-Makrophagen.** Die Abbildung zeigt schematisch die Differenzierung in M1- und M2- Makrophagen. Durch die angegebenen Stimuli (Substanzen neben dem Pfeil) werden charakteristische Oberflächenrezeptoren (eckige Klammer) produziert, die dann unterschiedliche Funktionen im Gewebe auslösen. Abkürzungen: IL= Interleukin, IFN- γ = Interferon-Gamma, LPS = Lipopolysaccharide, TNF- α = Tumornekrosefaktor-alpha, ROI = Reactive Oxygen Intermediates, FGF = Fibroblast Growth Factor, EGF = Epidermal Growth Factor, *modifiziert nach Sica et al (34)* 7
- Abbildung 4: **Biosynthese von S1P.** Gezeigt werden der Syntheseweg aus Sphingomyelin und die *de-novo*-Synthese aus Serin und Palmitoyl-CoA. In beiden Wegen wird Ceramid gebildet, welches nachfolgend zu Sphingosin deacetyliert wird. Sphingosin wird von Sphingosinkinase zu S1P phosphoryliert (38, 40). 10
- Abbildung 5: **Zelluläre Quellen des Plasma-S1P:** Endothelzellen und Erythrozyten setzen S1P frei, welches im Plasma an Albumin und ApoM, einem Bestandteil des HDL, gebunden vorliegt. Eine Schädigung des Endothels führt zu einer Thrombozytenaktivierung und Aggregation, wobei S1P freigesetzt wird. ApoM = Apolipoprotein M; *modifiziert nach Proia und Hla (44)* 11
- Abbildung 6: **S1P-Rezeptoren 1-3, Signaltransduktionswege.** Durch die unterschiedliche Kopplung der S1PR1-3 an $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ und $G\alpha_{12/13}$ werden verschiedene Signaltransduktionswege stimuliert: $G\alpha_i$ aktiviert die GTPase Ras sowie ERK und fördert die Proliferation; die Aktivierung von Pi3K und PKB schützt vor Apoptose; die Induktion von Pi3K und Rac stimuliert die Migration und die endotheliale Barrierefunktion. $G\alpha_q$ aktiviert die Phospholipase C (PLC), was zur intrazellulären Kalziumausschüttung führt und die GMZ zur Kontraktion befähigt (Gefäßtonus). Rho Aktivierung durch $G\alpha_{12/13}$ erhöht die Gefäßpermeabilität durch Ausbildung von Stressfasern (kontraktile Aktinfilamentbündel) im Endothel (48) und wirkt hemmend auf die Migration der GMZ. .. 12
- Abbildung 7: **Entparaffinieren und Rehydrieren.** Schritt 1: Entparaffinieren der Schnitte in Xylol (3 Mal für jeweils 5 Minuten) und Rehydrieren in einer absteigenden Alkoholreihe (zweimalig in 99%igem Alkohol und je einmal in 96%igem und 70%igem Alkohol für jeweils 5 Minuten). Abschließende Waschung in Aqua dest. für 5 Minuten. Dargestellt sind die Schnitte in den Küvetten. Oben: Dauer der Prozedur in Minuten; unten: verwendete Lösung..... 20
- Abbildung 8: **Antigendemaskierung und Blocken:** Schritt 1: Antigendemaskierung (95°C, 40 Minuten) in einer Retrieval-Lösung zur Wiederherstellung verlorengangener Immunität. Schritt 2: Überführen der Schnitte in TBS-Puffer für 5 Minuten und anschließendes Umranden der Schnitte mit einem Fett-Stift (Schritt 3), um ein Zusammenlaufen der Flüssigkeiten zu verhindern. Erneutes Überführen in TBS-Puffer für 3 x 5 Minuten (Schritt 4) und abschließendes Blocken (Schritt 5) der Schnitte. 24
- Abbildung 9: **Immunfluoreszenzdoppelfärbung:** Beimpfung der Schnitte mit dem Primärantikörper bzw. dem Antikörper der Isotyp-Kontrolle (Iso-Ko) sowie der

Pufferlösung für die Negativkontrolle (Neg.-Ko) über Nacht bei 4°C. Nach Waschen in TBS-Puffer für 3 x 5 Minuten wird der erste Sekundärantikörper (hier grün) aufgetragen und verweilt 60 Minuten bei Raumtemperatur (RT) auf den Schnitten. Die Prozedur wiederholt sich für den zweiten Primärantikörper (hier blau) bzw. den zweiten Sekundärantikörper (hier rosa).....	26
Abbildung 10: DAPI-Zellkernfärbung: DAPI-Zellkernfärbung: Die Schnitte werden für eine Minute in die DAPI-Zellkernfärbung überführt und anschließend für 3 x 5 Minuten in TBS-Puffer gewaschen. Abschließend werden die Schnitte mit Fluormount-G und einem Deckgläschen versehen.	26
Abbildung 11: Prinzip der Tyramin-katalysierten Signal-Amplifikation (TSA).....	27
Abbildung 12: TSA-Färbung. Hemmung der endogenen Peroxidase (H ₂ O ₂), Blockierung von Avidin- und Biotin-ähnlichen Substanzen, Beimpfung der Schnitte mit dem 1. Primärantikörper sowie dem biotinyliertem 1. Sekundärantikörper. Zugabe von Streptavidin-conjugated HRP sowie der Amplifikationsreagenz und abschließende Beimpfung der Schnitte mit dem 2. Primär- bzw. Sekundärantikörper.....	28
Abbildung 13: Histologische Darstellung einer gesunden A. iliaca (links) und A. femoralis (rechts) in der EvG-Färbung (A, B, E, F) und HE-Färbung (C, D, G, H). Beide Gefäße weisen eine schmale Intima (In) mit Endothel auf. Die angrenzende Media (Me) kann jeweils durch die Lamina elastica interna (LEI, schwarzer Doppelpfeil) sowie die Lamina elastica externa (LEE, schwarzer Pfeil) abgegrenzt werden. Die beiden Gefäße unterscheiden sich dahingehend, dass die Media der A. iliaca im Vergleich zur A. femoralis breiter ist und mehr elastische Fasern besitzt. Die Adventitia (Ad) imponiert als lockere Bindegewebsschicht, in der Vasa vasorum eingebettet liegen; Maßstabsbalken für A, C, E, G = 300 µm, für B, D, F, H = 100 µm	31
Abbildung 14: TSA-Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für CD31 und S1PR1 in der Intima/Media gesunder A. iliaca (A-C) und A. femoralis (D-F). Darstellung CD31-positiver Zellen (grün) im Endothel der Intima (In). Diese sind ebenfalls für S1PR1 positiv (rot) (B und E). Da Elastin im grünen Kanal auto-fluoresziert, wird die LEI sichtbar (Pfeil). Lu = Lumen; Maßstabsbalken = 100 µm	32
Abbildung 15: Darstellung SM-α-actin-positiver und S1PR1-positiver Zellen in der Media/Adventitia gesunder A. iliaca (A-C) und A. femoralis (D-F). Immunfluoreszenz-Färbung für SM-α-actin (grüner Kanal) und S1PR1 (roter Kanal). Kerne wurden mit DAPI gefärbt (blauer Kanal). Die Media (Me) weist keine S1PR1-positiven Zellen auf. Glatte Muskelzellen sind durch die Expression des SMA gekennzeichnet. Der weiße Kugelpfeil weist auf vereinzelt auftretende S1PR1-positive Zellen in der Adventitia hin. Die weißen Pfeile weisen auf das Vasa vasorum in der Adventitia (Ad) hin; Maßstabsbalken = 100 µm	33
Abbildung 16: Darstellung humaner Plaques in der EvG-Färbung. Chirurgisch gewonnene Plaques der A. iliaca (Nr. 1-6) und der A. femoralis (Nr. 7-10) wurden histologisch aufgearbeitet und die Schnitte einer EvG-Färbung unterzogen. A: Maßstabsbalken = 1 mm; schwarzer Doppelpfeil indiziert die Lamina elastica interna (LEI), Me = Media, In = Intima, PI = Plaque, FK = fibrotische Kappe, blauer Kasten = gezeigte Region für eine spätere S1PR1/CD31 Färbung in der Plaque (s. unten), schwarzer Kasten = in B gezeigter Ausschnitt. B: Maßstabsbalken = 100 µm, Me = Media, In = Intima, schwarzer Doppelpfeil indiziert die Lamina elastica interna (LEI), schwarzer Pfeil indiziert die Vasa vasorum.....	37
Abbildung 17: CD31/S1PR1-Doppelfärbung einer Plaque aus der A. iliaca (Probe 4). Dargestellt ist die Region, die im blauen Kasten aus Abbildung 16 zu sehen ist (Probe 4). Das Endothel ist durch ein weißes Dreieck indiziert. Me = Media, Lu = Lumen; Maßstabsbalken = 100 µm	37

Abbildung 18: CD31/S1PR1-Doppelfärbung einer Plaque aus der A. iliaca (Probe 3). A-C zeigt die Region, die im blauen Kasten in Abbildung 16 dargestellt ist. Zu erkennen ist das Endothel mit Expression von CD31 und S1PR1 (weißes Dreieck) sowie eine intakte Lamina elastica interna (weißer Doppelpfeil). D-F stellt die Region des schwarzen Kastens dar. Zu sehen sind CD31/S1PR1-positive Zellen in der Intima. Me = Media, In = Intima, PI = Plaque; Maßstabsbalken = 100 µm..... 38

Abbildung 19: CD31/S1PR1-Doppelfärbung einer Plaque aus der A. femoralis der Probe 7 (A-C) und der Probe 8 (D-F). A-C zeigt die Region aus Probe 7, die im schwarzen Kasten in..... 39

Abbildung 20: CD31/S1PR1-Doppelfärbung einer Plaque aus Aa. femorales (Probe 8 und Probe 9). Zu erkennen sind Mikrogefäße (weißer Pfeil), die sich in der Plaque befinden. Das lumenseitige Endothel dieser Gefäße ist CD31- und S1PR1-positiv. Außerdem sind CD31-negative/S1PR1-positive Zellen identifizierbar (weißer Kugelpfeil E und F). Me = Media, In = Intima, PI = Plaque, Doppelpfeil indiziert die Lamina elastica interna; Maßstabsbalken = 100 µm 40

Abbildung 21: CD68/S1PR1 Doppelfärbung (A-C) sowie CD163/S1PR1 Doppelfärbung (D-F) einer Plaque aus der A. iliaca (Probe 5). Zu sehen sind CD68- bzw. CD163- positive Zellen in der Plaque, am Übergang zur Intima (A und D, Pfeil). Diese Zellen sind ebenfalls positiv für S1PR1 (B und E, Pfeil). Zusätzlich finden sich S1PR1-positive und CD68/CD163-negative Zellen in der Intima und Media (s. Kugelpfeil in B). Der Doppelpfeil indiziert die autofluoreszierende LEI; Me = Media, In = Intima, PI = Plaque; Maßstabsbalken 100 µm 42

Abbildung 22: Ausschnittsvergrößerung der Abbildung 21 (Probe 5). Weißer Pfeil indiziert CD68/S1PR1- bzw. CD163/S1PR1-positive Zellen, Kugelpfeile indizieren CD68/CD163-negative/S1PR1-positive Zellen in der Intima; Maßstabsbalken = 100 µm 43

Abbildung 23: CD68/S1PR1-Doppelfärbung (A-C) sowie CD163/S1PR1-Doppelfärbung (D-F) einer Plaque aus der A. femoralis (Probe 10). Zu sehen sind CD68- (A)- und CD163- (D) positive Zellen, die ebenfalls positiv für S1PR1 sind (B und E, beispielsweise Pfeil) und sich in der Intima (In) befinden. Media und Plaque weisen wenige positive Zellen auf. PI = Plaque, Me = Media; Maßstabsbalken = 100 µm..... 44

Abbildung 24: CD68/S1PR1-Doppelfärbung (A-C) sowie CD163/S1PR1-Doppelfärbung (D-F) einer Plaque aus der A. femoralis (Probe 7). Zu sehen sind CD68- sowie weitaus mehr CD163-positive Zellen im Plaquematerial (PI), das eingebettet zwischen Media (Me) und Intima (In) liegt. Diese sind ebenfalls positiv für S1PR1 (B und E). Die LEI (Doppelpfeil) grenzt die Intima von der Media ab. Darüber hinaus weist die Intima (In) auch CD68/CD163-negative/S1PR1-positive Zellen auf (Kugelpfeil in B und E); Maßstabsbalken = 100 µm 45

Abbildung 25: Ausschnittsvergrößerung der Abbildung 24 (Probe 7). Weißer Pfeil indiziert CD68/S1PR1- bzw. CD163/S1PR1-positive Zellen, Kugelpfeile in B und E indizieren CD68- bzw. CD163-negative/S1PR1-positive Zellen in der Intima. Maßstabsbalken = 100 µm 46

Abbildung 26: CD68/S1PR1-Doppelfärbung (A-C) sowie CD163/S1PR1-Doppelfärbung (D-F) einer Plaque aus der A. iliaca (Probe 1). Zu sehen sind weitaus mehr CD68-positive Zellen (A, Pfeil) als CD163-positive Zellen (D), die auch S1PR1 exprimieren (B, Pfeil). Intima (In) und Media (Me) weisen keine weiteren S1PR1-positiven Zellen auf. Doppelpfeil indiziert die LEI; Maßstabsbalken = 100 µm 47

Abbildung 27: Ausschnittsvergrößerung der Abbildung 26 (Probe 1). Weiße Pfeile indizieren CD68/S1PR1-positive Zellen sowie wenige CD163/S1PR1-positive Zellen. In der angrenzenden Intima sind keine S1PR1-positiven Zellen zu sehen. Maßstabsbalken = 100 µm 48

Abbildung 28: SMA/S1PR1-Doppelfärbung einer Plaque aus der A. iliaca der Probe 2 (A-C) sowie der Probe 4 (D-F). Zu sehen sind SMA-positive Zellen in der Media von Mikrogefäßen, die sich innerhalb der Plaque ausgebildet haben (A und D, Pfeil). Diese Zellen sind S1PR1-negativ. Das lumenseitige Endothel der Gefäße lässt sich für S1PR1 anfärben und grenzt sich klar von den SMA-positiven Zellen ab (B-F, Pfeil); Maßstabsbalken = 100 µm	50
Abbildung 29: SMA/S1PR1-Doppelfärbung einer Plaque aus der A. femoralis (Probe Nr. 7, A-C) sowie der A. iliaca (Probe Nr. 1, D-F). Zu sehen sind SMA-positive Zellen sowohl in der Intima (In) als auch in der Media (Me) (A und D). Die SMA-positiven Zellen sind S1PR1-negativ, was in C und F deutlich sichtbar wird. S1PR1-positive Zellen befinden sich in der Plaque (B und E); Maßstabsbalken = 100 µm	51
Abbildung 30: SMA/S1PR1-Doppelfärbung einer Plaque aus der A. iliaca der Probe 5 (A-C) sowie der Probe 6 (D-F). Es befinden sich SMA-positive Zellen in Intima (In) und Media (Me) (A und D). Die SMA-positiven Zellen sind S1PR1-negativ. S1PR1-positive Zellen lassen sich in der Plaque (PI) identifizieren (E). Der Doppelpfeil indiziert die LEI; Maßstabsbalken = 100 µm	52
Abbildung 31: SMA/S1PR1-Doppelfärbung einer Plaque aus der A. iliaca (Probe 3, A-C) sowie der A. femoralis (Probe 8, D-F). A-C: Zu sehen sind SMA-positive und S1PR1-positive Zellen in der Media (Me) und Intima (In), die jedoch nicht identisch sind (C, Kugelpfeil). D-F: Zahlreiche SMA-positive Zellen in der Media (Me) (D) sind S1PR1 negativ (E). Der Doppelpfeil indiziert LEI; Maßstabsbalken = 100 µm	53
Abbildung 32: Darstellung der Isotyp-Kontrolle der CD31/S1PR1-Immunfluoreszenzdoppelfärbung in der gefäßgesunden Kontrolle. Humane Vollwand der A. iliaca (A-C, vgl. Abbildung 14 A-C) und der A. femoralis (D-F, vgl. Abbildung 14 D-F) wurden histologisch aufgearbeitet und die Schnitte einer TSA-Immunfluoreszenz-Färbung für CD31 (A und D, grüner Kanal) und S1PR1 (B und E, roter Kanal) unterzogen. Als Sekundärantikörper wurde jeweils eine Isotyp-Kontrolle aufgetragen, sodass keine Färbung zu erwarten war. Kerne wurden mit DAPI gefärbt (C und F, blauer Kanal). Maßstabsbalken = 100 µm	82
Abbildung 33: Darstellung der Isotyp-Kontrolle der CD31/S1PR1 TSA-Immunfluoreszenzdoppelfärbung der Probe 3 (vgl. Abbildung 18). A-C stellt die Region im blauen Kasten aus Abbildung 16 dar. D-F stellt die Region im schwarzen Kasten der Abbildung 16 dar. Maßstabsbalken = 100 µm	83
Abbildung 34: Darstellung der Isotyp-Kontrollen der CD68/S1PR1 Immunfluoreszenzdoppelfärbungen. Chirurgisch gewonnene Plaques der A. iliaca (A-C: Präparat Nr. 1, vgl. Abbildung 26 A-C; D-F: Präparat Nr. 5, Abbildung 21 A-C) wurden histologisch aufgearbeitet und die Schnitte einer Immunofluoreszenz-Färbung für CD68 (grüner Kanal, A und D) und S1PR1 (roter Kanal, B und E) unterzogen. Kerne wurden mit DAPI gefärbt (C und F, blauer Kanal). Maßstabsbalken = 100 µm	84
Abbildung 35: Darstellung der Isotyp-Kontrollen der CD163/S1PR1 Immunfluoreszenzdoppelfärbungen. Chirurgisch gewonnene Plaques der A. femoralis (A-C: Präparat Nr. 7, vgl. Abbildung 24 D-F) und der A. iliaca (D-F: Präparat Nr. 10, vgl. Abbildung 23 D-F) wurden histologisch aufgearbeitet und die Schnitte einer Immunofluoreszenz-Färbung für CD163 (grüner Kanal, A und D) und S1PR1 (roter Kanal, B und E) unterzogen. Kerne wurden mit DAPI gefärbt (C und F, blauer Kanal). Maßstabsbalken = 100 µm	85
Abbildung 36: Darstellung der Isotyp-Kontrollen der SM-α/S1PR1 Immunfluoreszenzdoppelfärbungen. Chirurgisch gewonnene Plaques der A. iliaca (A-C: Präparat Nr. 1, vgl. Abbildung 29 D-F) und der A. femoralis (D-F: Präparat Nr. 7, vgl. Abbildung 29 A-C) wurden histologisch aufgearbeitet und die Schnitte einer Immunfluoreszenz-Färbung für SM-α-actin (grüner Kanal, A und D) und S1PR1 (roter	

Kanal, B und E) unterzogen. Kerne wurden mit DAPI gefärbt (C und F, blauer Kanal).
Maßstabsbalken = 100 µm 86

Abbildung 37: Darstellung der Isotyp-Kontrollen der SM- α /S1PR1
Immunfluoreszenzdoppelfärbungen. Chirurgisch gewonnene Plaques der A. iliaca (A-C:
Präparat Nr. 5, vgl. Abbildung 30 A-C und D-F: Präparat Nr. 6, vgl. Abbildung 30 D-F)
wurden histologisch aufgearbeitet und die Schnitte einer Immunfluoreszenz-Färbung für
SM- α -actin (grüner Kanal, A und D) und S1PR1 (roter Kanal, B und E) unterzogen. Kerne
wurden mit DAPI gefärbt (C und F, blauer Kanal). Maßstabsbalken = 100 µm 87

Abbildung 38: Darstellung der Isotyp-Kontrollen der SM- α /S1PR1
Immunfluoreszenzdoppelfärbungen. Chirurgisch gewonnene Plaques der A. iliaca (A-C:
Präparat Nr. 3, vgl. Abbildung 31 A-C) und der A. femoralis (D-F: Präparat Nr. 8, vgl.
Abbildung 31 D-F) wurden histologisch aufgearbeitet und die Schnitte einer
Immunfluoreszenz-Färbung für SM- α -actin (grüner Kanal, A und D) und S1PR1 (roter
Kanal, B und E) unterzogen. Kerne wurden mit DAPI gefärbt (C und F, blauer Kanal).
Maßstabsbalken = 100 µm 88

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung der pAVK nach Fontaine und nach Rutherford (15).....	4
Tabelle 2: Effekte der S1P-Rezeptoren S1PR1, S1PR2 und S1PR3 im Gefäß. EZ = Endothelzellen, GMZ = glatte Muskelzellen, NO = Stickstoffmonoxid, eNOS = endotheliale NO-Synthase	15
Tabelle 3: Auflistung der Proben: Lokalisation der Plaque, Geschlecht, Alter und pAVK Stadium; M = männlich; W = weiblich; NE = nicht erfasst	17
Tabelle 4: Alkohole, gebrauchsfertige Lösungen und Färbematerialien	18
Tabelle 5: Aufsteigende Isopropanolreihe für die Dehydrierung der Schnitte und anschließende Einbettung in Paraffin. Rechte Spalte: Dauer der Lagerung in Minuten ...	19
Tabelle 6. Verwendete Geräte/Software mit Name und Hersteller zur Anfertigung der Schnitte und zur Auswertung der Färbung	19
Tabelle 7: Name, Konzentration, Verdünnung und Hersteller der Primärantikörper	22
Tabelle 8: Name, Verdünnung, Hersteller und Emissionsspektren sowie Fluoreszenzfarbstoff der DAPI-Kernfärbung sowie der Sekundärantikörper	22
Tabelle 9: Name, Konzentration und Hersteller der Isotyp-Kontrollen für die Immunfluoreszenzdoppelfärbungen	23
Tabelle 10: Name und Hersteller für Puffer und Lösungen	23
Tabelle 11: Name und Hersteller der Blockierungs-Substanz für die Immunfluoreszenzdoppelfärbungen.	24
Tabelle 12: Plaques der A. iliaca und A. femorails. Die Proben wurden Immunfluoreszenzdoppelfärbungen für CD68/S1PR1 bzw. CD163/S1PR1 unterzogen. Anschließend wurden die Regionen lichtmikroskopisch eingestellt, die in Abbildung 16 im schwarzen Kasten zu sehen sind und bildlich festgehalten (Region in Spalte 3 beschrieben). Es wurden zunächst alle Makrophagen (CD68-positive Zellen in Spalte 4, CD163-positive Zellen in Spalte 7) innerhalb dieses Bildes ausgezählt. Anschließend wurde die Anzahl der S1PR1-positiven CD68-Makrophagen gezählt (Spalte 5) und ihr Anteil in Prozent errechnet (Spalte 6). Ebenso wurde für die Auszählung der S1PR1-positiven CD163-Makrophagen verfahren. 90% der CD68- und CD163-positiven Zellen sind S1PR1-positiv.	55

12 Anhang

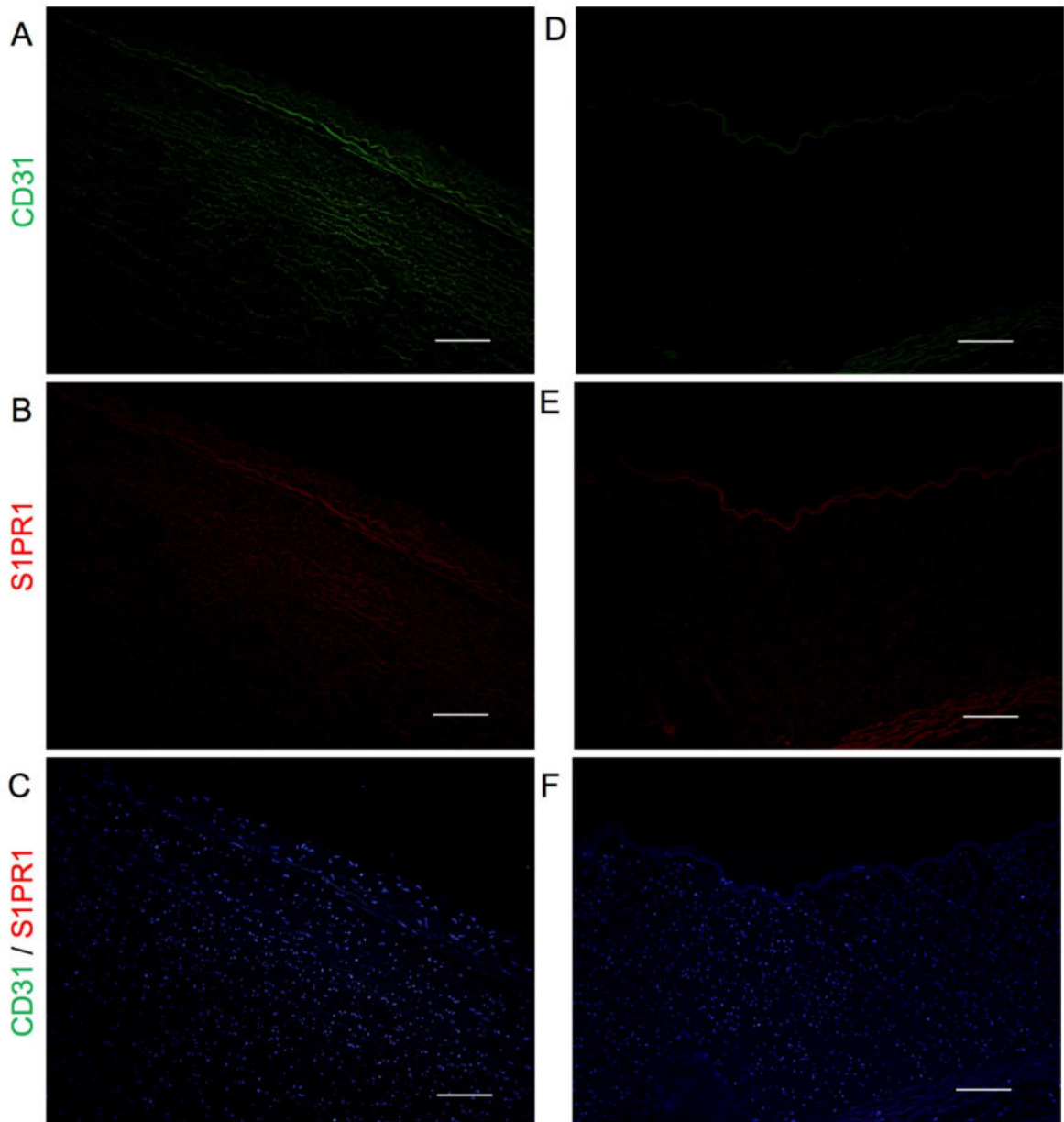


Abbildung 32: Darstellung der Isotyp-Kontrolle der CD31/S1PR1-Immunfluoreszenzdoppelfärbung in der gefäßgesunden Kontrolle. Humane Vollwand der A. iliaca (A-C, vgl. Abbildung 14 A-C) und der A. femoralis (D-F, vgl. Abbildung 14 D-F) wurden histologisch aufgearbeitet und die Schnitte einer TSA-Immunfluoreszenz-Färbung für CD31 (A und D, grüner Kanal) und S1PR1 (B und E, roter Kanal) unterzogen. Als Sekundärantikörper wurde jeweils eine Isotyp-Kontrolle aufgetragen, sodass keine Färbung zu erwarten war. Kerne wurden mit DAPI gefärbt (C und F, blauer Kanal). Maßstabsbalken = 100 μ m

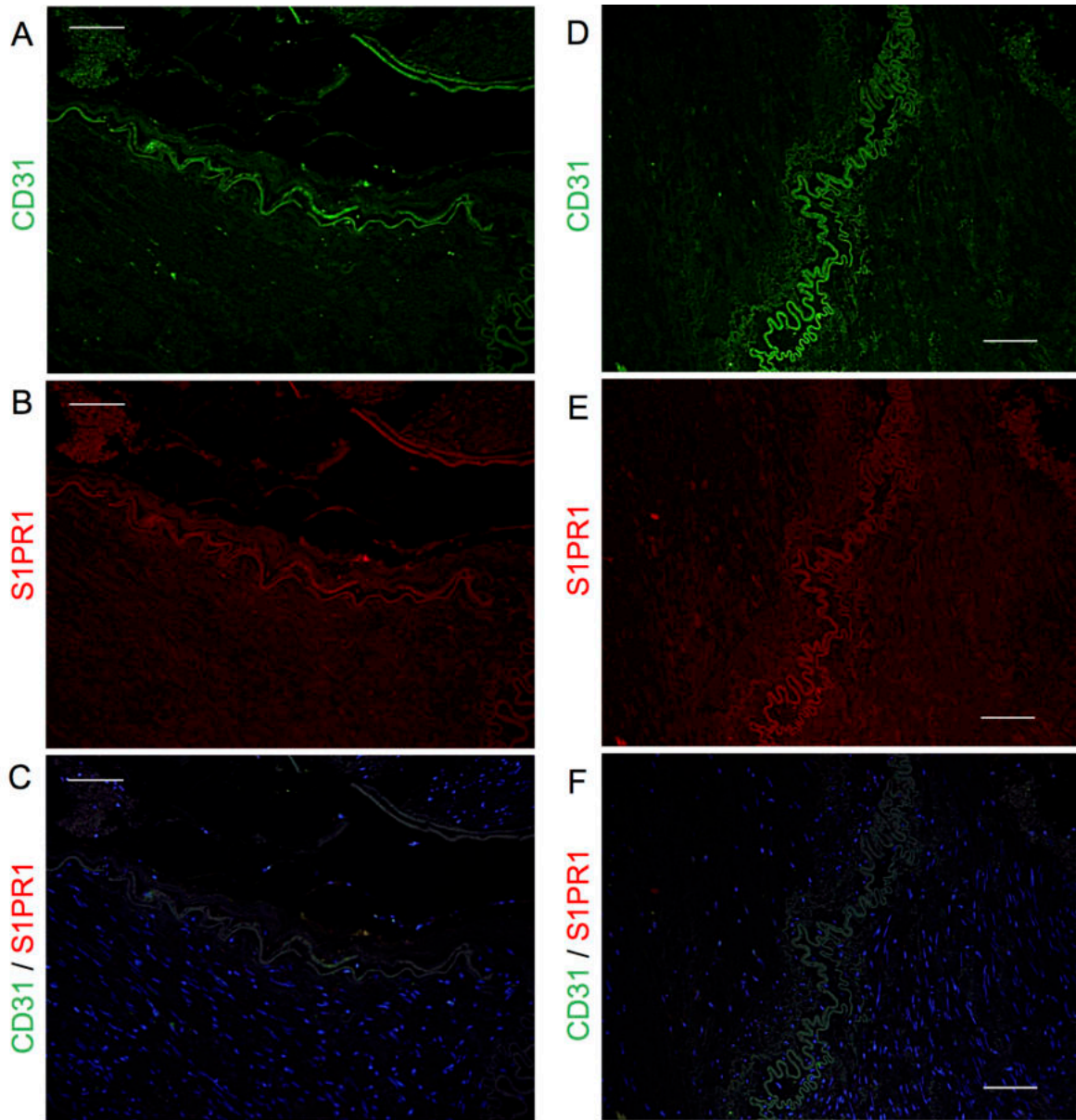


Abbildung 33: Darstellung der Isotyp-Kontrolle der CD31/S1PR1 TSA-Immunfluoreszenzdoppelfärbung der Probe 3 (vgl. Abbildung 18). A-C stellt die Region im blauen Kasten aus Abbildung 16 dar. D-F stellt die Region im schwarzen Kasten der Abbildung 16 dar. Maßstabsbalken = 100 μm

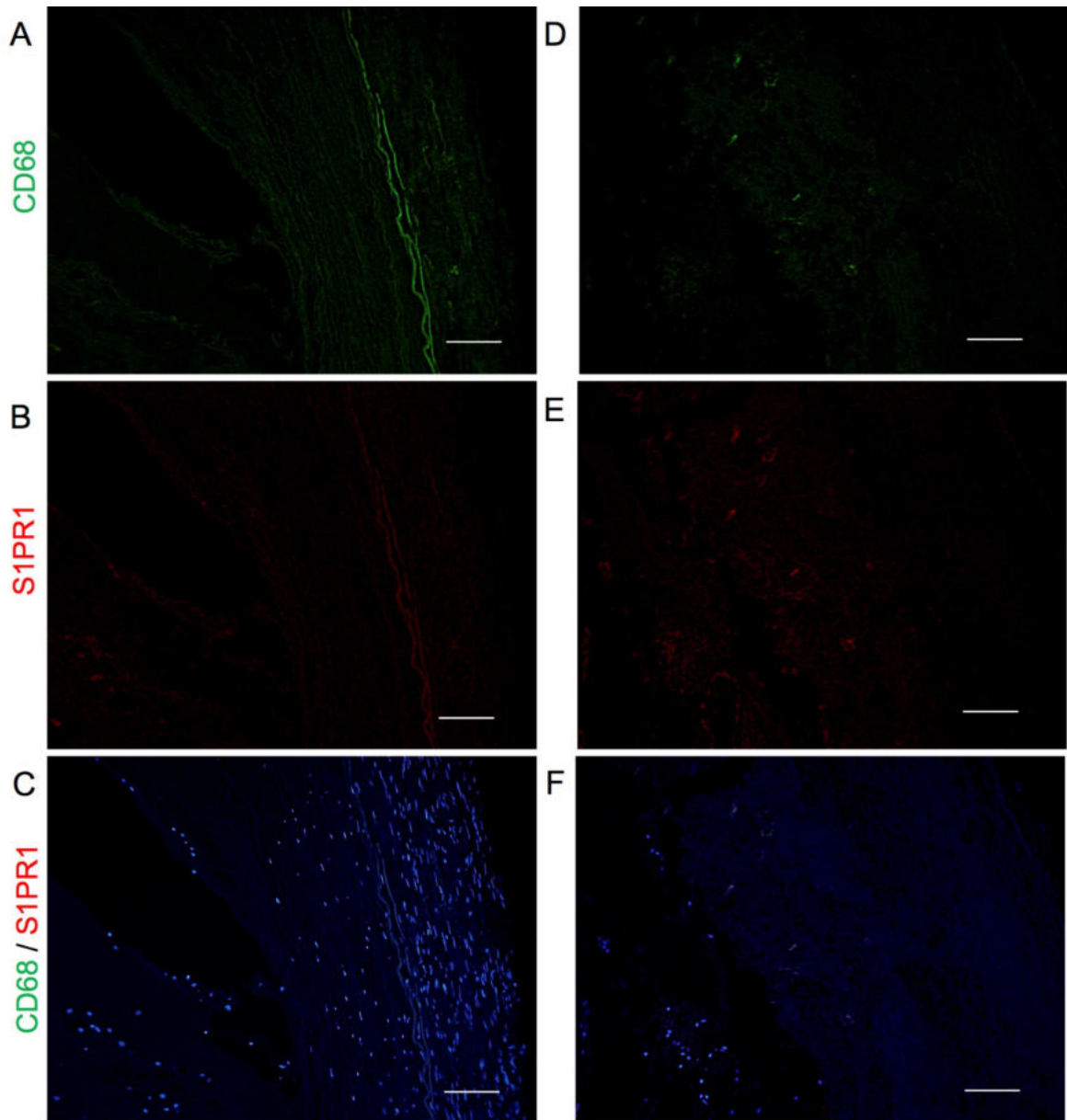


Abbildung 34: Darstellung der Isotyp-Kontrollen der CD68/S1PR1 Immunfluoreszenzdoppelfärbungen. Chirurgisch gewonnene Plaques der A. iliaca (A-C: Präparat Nr. 1, vgl. Abbildung 26 A-C; D-F: Präparat Nr. 5, Abbildung 21 A-C) wurden histologisch aufgearbeitet und die Schnitte einer Immunfluoreszenz-Färbung für CD68 (grüner Kanal, A und D) und S1PR1 (roter Kanal, B und E) unterzogen. Kerne wurden mit DAPI gefärbt (C und F, blauer Kanal). Maßstabsbalken = 100 μ m

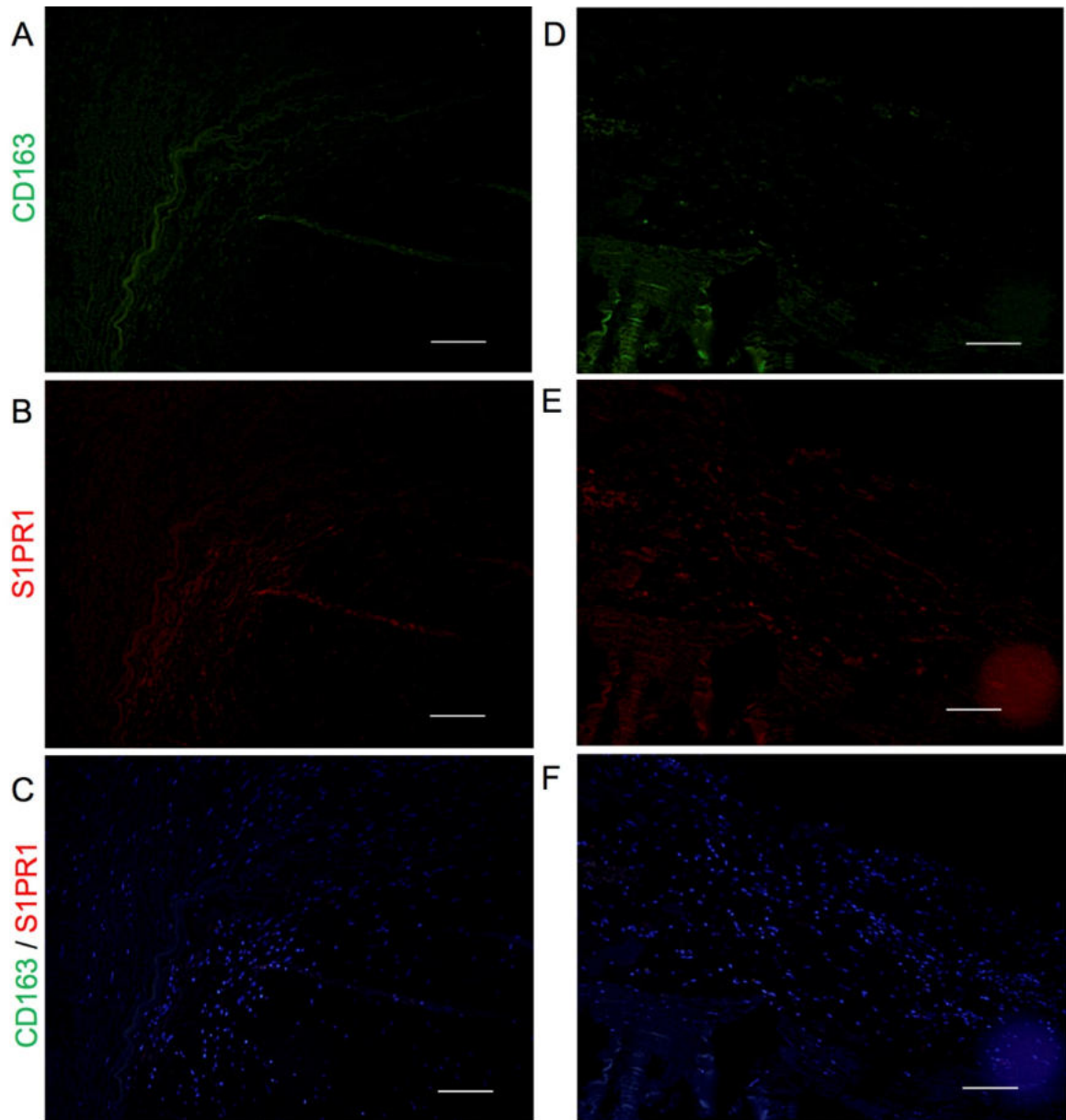


Abbildung 35: Darstellung der Isotyp-Kontrollen der CD163/S1PR1 Immunfluoreszenzdoppelfärbungen. Chirurgisch gewonnene Plaques der A. femoralis (A-C: Präparat Nr. 7, vgl. Abbildung 24 D-F) und der A. iliaca (D-F: Präparat Nr. 10, vgl. Abbildung 23 D-F) wurden histologisch aufgearbeitet und die Schnitte einer Immunfluoreszenz-Färbung für CD163 (grüner Kanal, A und D) und S1PR1 (roter Kanal, B und E) unterzogen. Kerne wurden mit DAPI gefärbt (C und F, blauer Kanal). Maßstabsbalken = 100 μ m

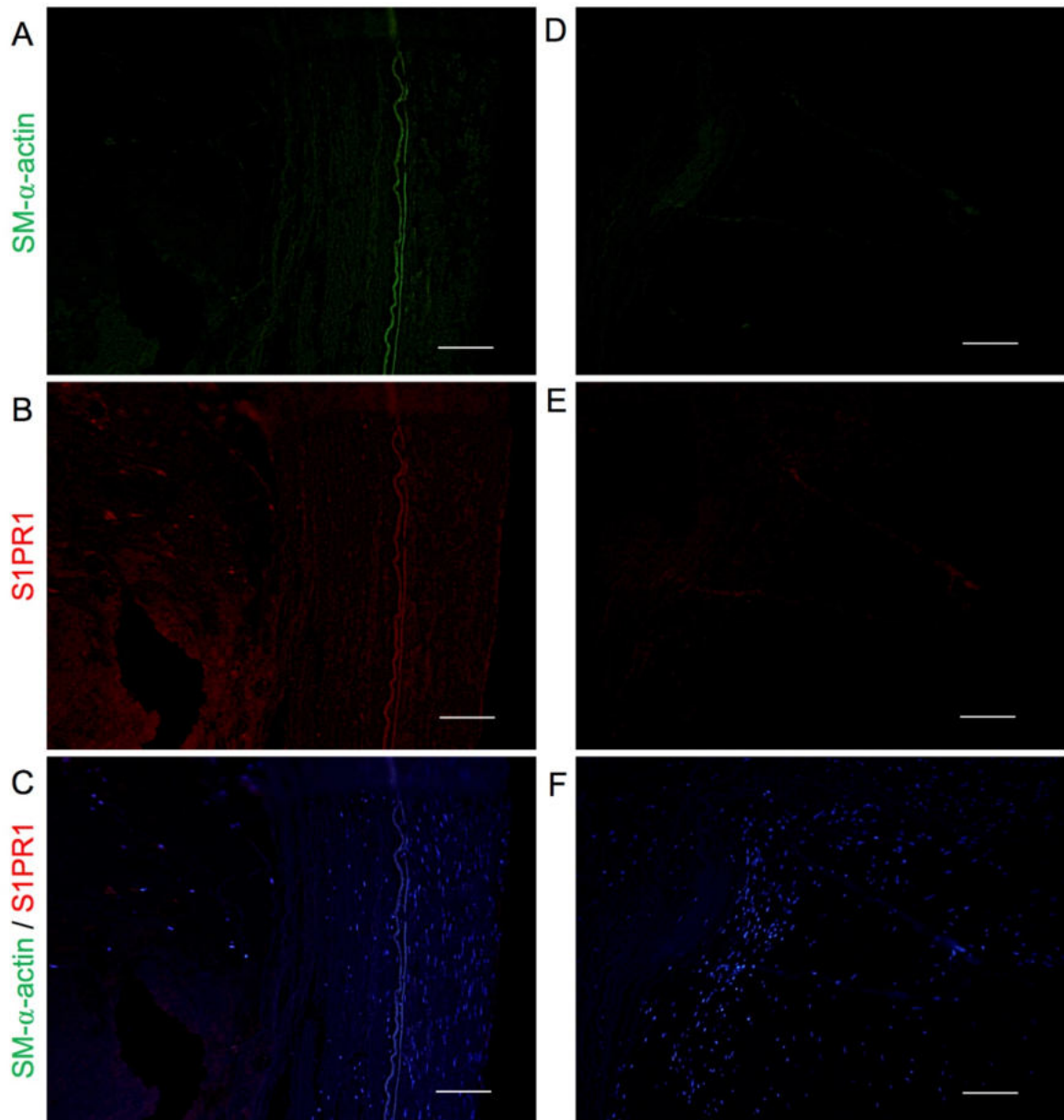


Abbildung 36: Darstellung der Isotyp-Kontrollen der SM- α /S1PR1 Immunfluoreszenzdoppelfärbungen. Chirurgisch gewonnene Plaques der A. iliaca (A-C: Präparat Nr. 1, vgl. Abbildung 29 D-F) und der A. femoralis (D-F: Präparat Nr. 7, vgl. Abbildung 29 A-C) wurden histologisch aufgearbeitet und die Schnitte einer Immunfluoreszenz-Färbung für SM- α -actin (grüner Kanal, A und D) und S1PR1 (roter Kanal, B und E) unterzogen. Kerne wurden mit DAPI gefärbt (C und F, blauer Kanal). Maßstabsbalken = 100 μ m

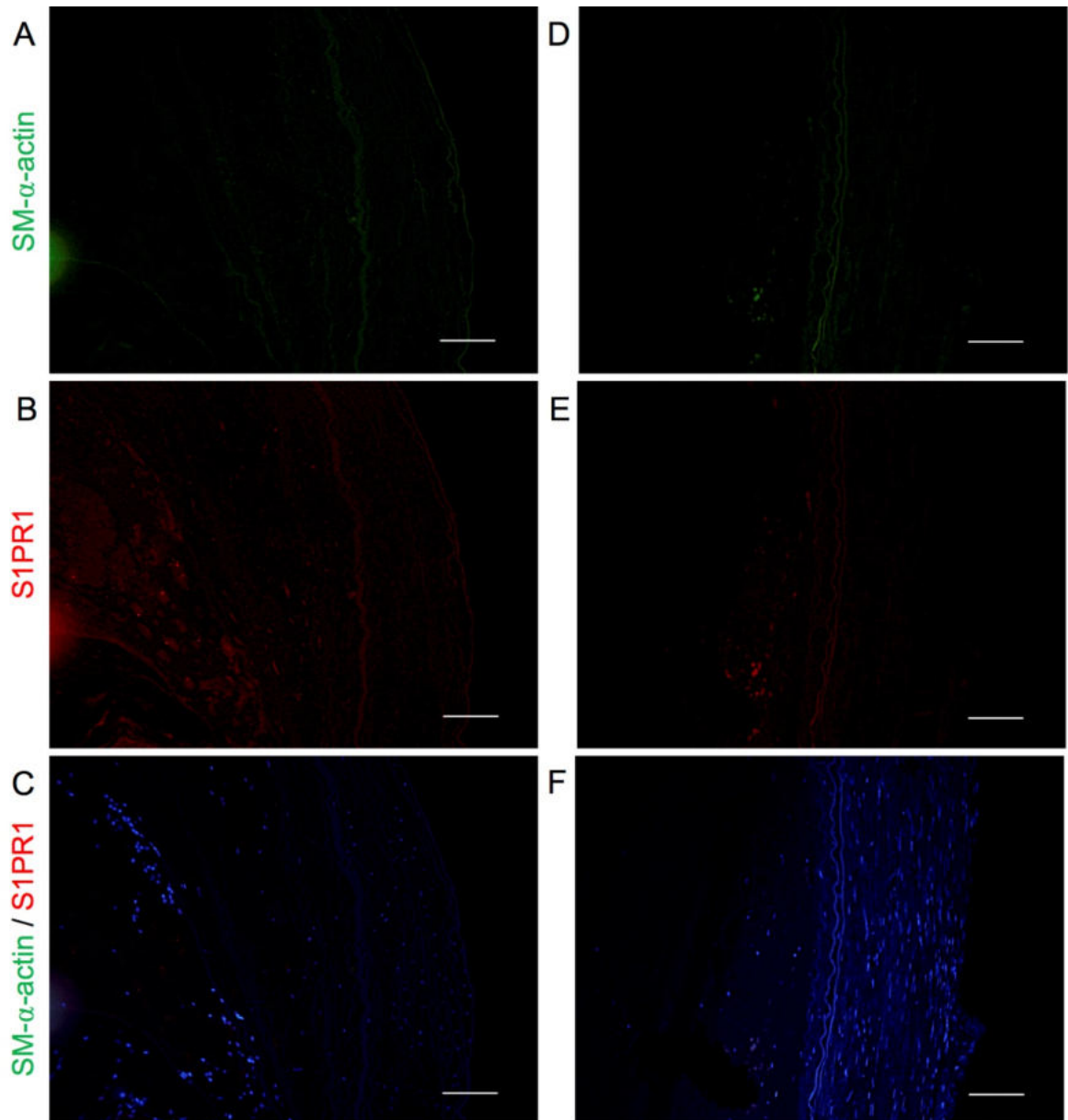


Abbildung 37: Darstellung der Isotyp-Kontrollen der SM- α /S1PR1 Immunfluoreszenzdoppelfärbungen. Chirurgisch gewonnene Plaques der A. iliaca (A-C: Präparat Nr. 5, vgl. Abbildung 30 A-C und D-F: Präparat Nr. 6, vgl. Abbildung 30 D-F) wurden histologisch aufgearbeitet und die Schnitte einer Immunfluoreszenz-Färbung für SM- α -actin (grüner Kanal, A und D) und S1PR1 (roter Kanal, B und E) unterzogen. Kerne wurden mit DAPI gefärbt (C und F, blauer Kanal). Maßstabsbalken = 100 μ m

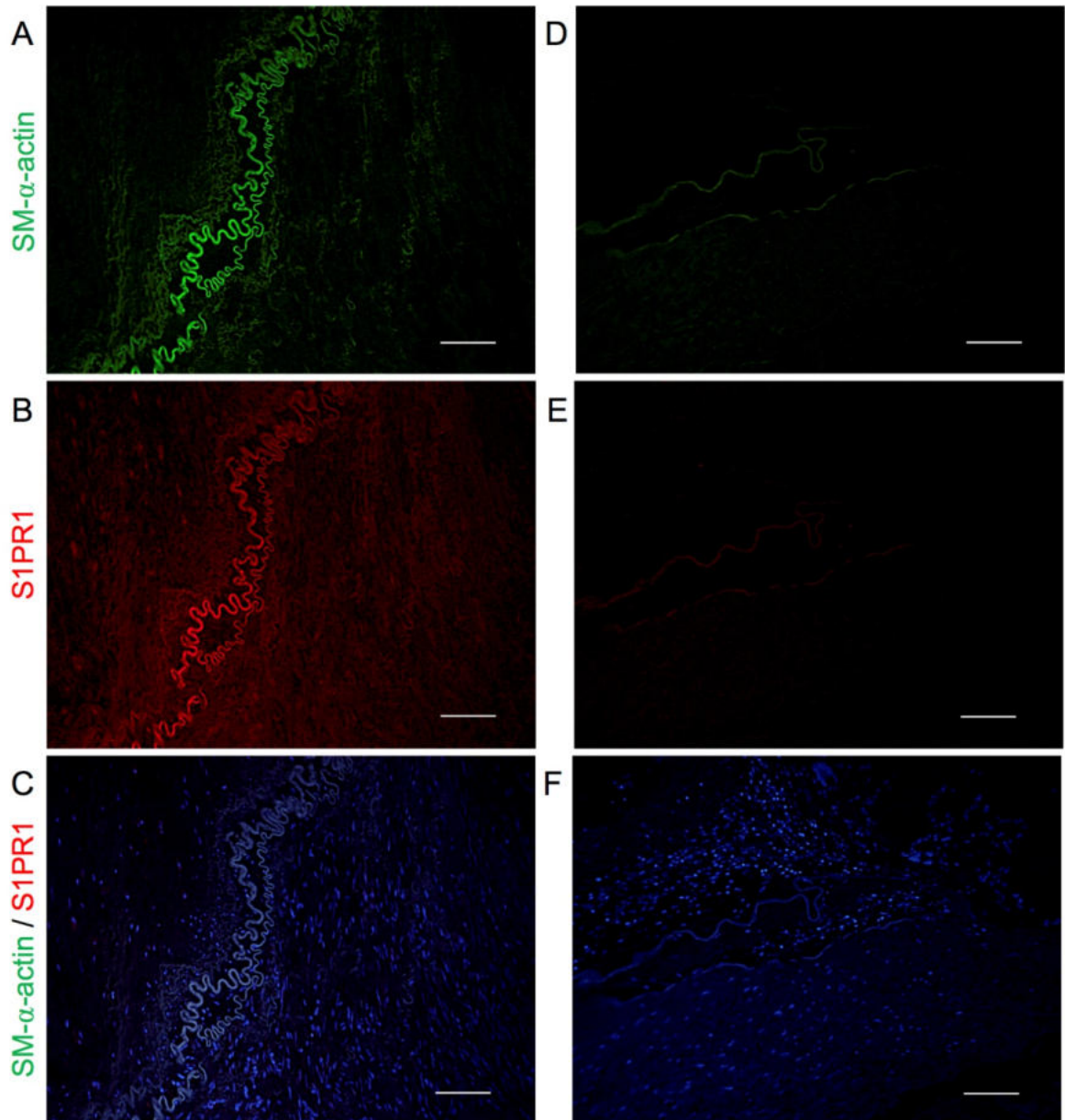


Abbildung 38: Darstellung der Isotyp-Kontrollen der SM- α /S1PR1 Immunfluoreszenzdoppelfärbungen. Chirurgisch gewonnene Plaques der A. iliaca (A-C: Präparat Nr. 3, vgl. Abbildung 31 A-C) und der A. femoralis (D-F: Präparat Nr. 8, vgl. Abbildung 31 D-F) wurden histologisch aufgearbeitet und die Schnitte einer Immunfluoreszenz-Färbung für SM- α -actin (grüner Kanal, A und D) und S1PR1 (roter Kanal, B und E) unterzogen. Kerne wurden mit DAPI gefärbt (C und F, blauer Kanal). Maßstabsbalken = 100 μ m

13 Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Larena-Avellaneda für die Möglichkeit der Promotion im Labor der Gefäßchirurgie sowie für das Überlassen dieses interessanten Themas danken. Außerdem gilt mein Dank meinem Betreuer Herrn Dr. Günter Daum, der mir während der Laborarbeit sowie beim Auswerten und Schreiben der Arbeit stets fachlich zur Seite stand.

Des Weiteren möchte ich mich bei Astrid Becker neben der hervorragenden und kompetenten Einführung in die Laborarbeit für die gute Zusammenarbeit, die mentale Unterstützung und die guten Gespräche bedanken.

Mein Dank gilt auch der Gefäßchirurgie des UKE sowie der Rechtsmedizin des UKE, die mir die Proben zur Verfügung stellten.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die immer für mich da sind. Ohne euch wären das Studium sowie diese Arbeit sicher nicht möglich gewesen. Ebenfalls möchte ich meinen Geschwistern und Freunden für die mentale Unterstützung danken. Eure positive Art und euer stets offenes Ohr haben mir während der gesamten Zeit viel Kraft gegeben. Ein besonderer Dank gilt Kiki, der mich als Mitdoktorand und Freund während der Arbeit mental und auch fachlich unterstützt hat.

14 Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt

15 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: