

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

I. Medizinische Klinik und Poliklinik

Klinikum rechts der Isar / Deutsches Herzzentrum München

Univ.-Prof. Dr. A. Schömig

**Die Bedeutung von S1P und Sphingosin für die Thrombozytenfunktion**

Mirjam Keßler

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. S. Massberg
2. Priv.-Doz. Dr. T. Ibrahim

Die Dissertation wurde am 22.03.2011 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.11.2012 angenommen.

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Morphologie und Funktion von Thrombozyten	1
1.2	Entstehung und Rolle von Sphingosin und Sphingosin-1-Phosphat	5
1.2.1	Synthese von Sphingosin und Sphingosin-1-Phosphat	5
1.2.2	S1P-Rezeptoren	8
1.2.3	Sphingosinkinasen	9
1.2.4	Rolle von Sphingosin und Sphingosin-1-Phosphat	10
1.2.5	Fingolimod (FTY 720)	13
1.2.6	VPC 23019	16
1.2.7	JTE-013	16
1.3	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	18
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1	Substanzen	19
2.1.1	ACD-Puffer	19
2.1.2	Tyrodes-Puffer	19
2.1.3	Dimethylsulfoxid	20
2.1.4	Sphingosin	21
2.1.5	Sphingosin-1-Phosphat	21
2.1.6	Fingolimod (FTY 720)	22
2.1.7	VPC 23019	23
2.1.8	JTE-013	23
2.2	Aggregometrie	25
2.2.1	Grundlagen	25
2.2.2	humane Thrombozytenpräparation	28
2.2.3	murine Thrombozytenpräparation	29
2.2.4	Versuchsaufbau und -durchführung	32
2.2.5	verwendete Thrombozytenagonisten	34
2.3	Versuchsprotokolle und experimentelle Gruppen	36
2.3.1	humane Versuche	36
2.3.1.1	Einfluss von FTY 720 auf die Thrombozytenaggregation	36
2.3.1.2	Rolle der S1P <sub>2</sub> -Rezeptoren für die Aggregationshemmung durch FTY 720	39
2.3.1.3	Rolle der S1P <sub>1</sub> - und S1P <sub>3</sub> -Rezeptoren für die Aggregationshemmung durch FTY 720	41
2.3.1.4	Einfluss von Sphingosin auf die Thrombozytenaggregation	43
2.3.1.5	Einfluss von S1P auf die Thrombozytenaggregation	45
2.3.1.6	Rolle der S1P <sub>2</sub> -Rezeptoren für die Aggregationshemmung durch S1P	47
2.3.1.7	Rolle der S1P <sub>1</sub> - und S1P <sub>3</sub> -Rezeptoren für die Aggregationshemmung durch S1P	48
2.3.2	Versuche mit Mäusen auf BALB/c-Hintergrund	50
2.3.2.1	Rolle der SphK-1 und SphK-2 für die Aggregation mit FTY 720	50
2.3.2.2	Einfluss von 100 µM FTY 720 auf die Aggregation von SphK-KO und SphK-1,2-WT bei Variation der Inkubationszeiten	52
2.3.3	Versuche mit Mäusen auf C57Bl6-Hintergrund	55
2.3.3.1	Rolle des S1P <sub>4</sub> -Rezeptors für die Aggregation mit FTY 720	55
2.3.3.2	Rolle des S1P <sub>4</sub> -Rezeptors für die Aggregation mit S1P	56
2.3.3.3	Rolle der SphK-1 und SphK-2 für die Aggregation mit Sphingosin	57
2.4	Auswertung und Statistik	59
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>60</b>

<b>3.1 humane Versuche</b>	<b>60</b>
3.1.1 Einfluss von FTY 720 auf die Thrombozytenaggregation	60
3.1.2 Einfluss der S1P <sub>2</sub> -Rezeptoren auf die Aggregationshemmung durch FTY 720	66
3.1.3 Einfluss der S1P <sub>1</sub> - und S1P <sub>3</sub> -Rezeptoren auf die Aggregationshemmung durch FTY 720	68
3.1.4 Einfluss von Sphingosin auf die Thrombozytenaggregation	71
3.1.5 Einfluss von S1P auf die Thrombozytenaggregation	74
3.1.6 Einfluss der S1P <sub>2</sub> -Rezeptoren auf die Aggregationshemmung durch S1P	76
3.1.7 Einfluss der S1P <sub>1</sub> - und S1P <sub>3</sub> -Rezeptoren auf die Aggregationshemmung durch S1P	78
<b>3.2 Versuche mit Mäusen auf BALB/c-Hintergrund</b>	<b>80</b>
3.2.1 Rolle der SphK-1 und SphK-2 für die Aggregation mit FTY 720	80
3.2.1.1 Einfluss von 100 µM FTY 720 auf die Aggregation von SphK-KO und SphK-1,2-WT bei Variation der Inkubationszeiten	82
<b>3.3 Versuche mit Mäusen auf C57Bl6-Hintergrund</b>	<b>84</b>
3.3.1 Rolle des S1P <sub>4</sub> -Rezeptors für die Aggregation mit FTY 720	84
3.3.2 Rolle des S1P <sub>4</sub> -Rezeptors für die Aggregation mit S1P	85
3.3.3 Rolle der SphK-1 und SphK-2 für die Aggregation mit Sphingosin	86
<b>4 Diskussion</b>	<b>88</b>
4.1 Ergebnisse, Limitationen und Ausblicke der vorliegenden Arbeit	88
4.2 Der Effekt von S1P auf die Atherosklerose	91
4.3 Der Effekt von FTY 720 auf die Atherosklerose	93
4.4 Klinischer Einsatz von FTY 720	94
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>96</b>
<b>6 Summary</b>	<b>97</b>
<b>7 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>98</b>
<b>8 Abbildungsverzeichnis</b>	<b>99</b>
<b>9 Tabellenverzeichnis</b>	<b>101</b>
<b>10 Literaturverzeichnis</b>	<b>103</b>
<b>11 Danksagung</b>	<b>110</b>
<b>12 Lebenslauf</b>	<b>111</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Morphologie und Funktion von Thrombozyten

Thrombozyten sind ein entscheidender Bestandteil der Hämostase. Während ihrer Zirkulation im peripheren Blutkreislauf überwachen sie die Integrität der Gefäßwände. Ist das Endothel geschädigt und subendotheliale Matrix wird frei, adhären die Zellen an diese Stelle, aggregieren und setzen eine Gerinnungskaskade in Gang. Die primäre Hämostase sorgt zusammen mit den plasmatischen Gerinnungsfaktoren, der sekundären Hämostase, für einen Verschluss des Defektes und eine Wiederherstellung des normalen Blutflusses. Aber auch bei pathologischen Zuständen spielt dieser Mechanismus eine wichtige Rolle: Im Rahmen der Atherosklerose binden Thrombozyten an Stellen endothelialer Dysfunktion. Es kommt zur Aktivierung und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, die zur Progression der Atherosklerose führen. Beim akuten Myokardinfarkt, dem ischämischen Schlaganfall und Thrombosen kommt es ebenfalls zur Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten, so dass es zu einem Gefäßverschluss durch den Thrombus kommen kann. [61], [23], [45], [65]

### Entstehung und Morphologie der Thrombozyten:

Thrombozyten entstehen im Knochenmark aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen. Aus diesen Zellen bilden sich reifere Vorläuferzellen, die man in lymphatische und myeloische unterteilen kann. Unter dem Einfluss von Colony Stimulating Factor (CSF), Interleukin-3 und Thrombopoetin entstehen aus diesen Vorläuferzellen Megakaryozyten. Diese sind mit 30-150 µm die größten Zellen des Knochenmarks. Die Kerne der polyploiden Zellen sind unregelmäßig gelappt. Das Zytoplasma ist basophil und enthält im Falle von reifen Megakaryozyten rote Granula. [64], [17]

Durch zytoplasmatische Abschnürungen entstehen kernlose Thrombozyten mit einem Durchmesser von 2-3 µm. Diese Zellfragmente sind im Blut durchschnittlich acht bis zehn Tage überlebensfähig. In dieser Zeit erfahren die Thrombozyten häufig keine feste Bindung an eine Endothelläsion. Danach werden sie vom

retikuloendotheliales System der Milz und Leber abgebaut und durch Makrophagen phagozytiert. [61], [23]

Im Zytoplasma der Thrombozyten befinden sich verschiedene Granula, Ribosomen, Mitochondrien, Glycogen und kontraktile Filamente. Dies ist in *Abbildung 1* dargestellt. Dieser zentrale Bereich des Blutplättchens wird als Granulomer bezeichnet.

Es werden folgende Granulumtypen unterschieden:

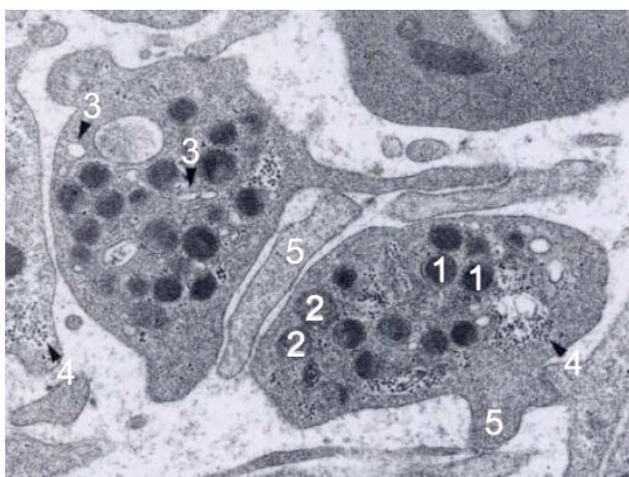
- Dichte Granula enthalten u.a.  $\text{Ca}^{2+}$ , Serotonin und Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosintriphosphat (ATP)
- $\alpha$ -Granula, die u.a. von-Willebrandt-Faktor (vWF), Fibronectin, Thrombospondin und Platelet-derived-growth-Factor (PDGF) beinhalten
- Lysosomale Granula, die Proteasen und Glucosidasen enthalten

Bei Aktivierung der Thrombozyten fusionieren die Granula mit der Plasmamembran und es kommt zur Ausschüttung der Inhaltsstoffe in das Blutplasma. [23], [64], [1]

Die granulumfreie Zone im Randbereich bezeichnet man als Hyalomer. Hier sind 10-15 ringförmige Mikrotubuli und andere kontraktile Filamente enthalten.

Eine weitere wichtige Komponente der Blutplättchen ist das Membransystem. Es besteht aus zwei Systemen: Einem offenen kanikulären, das mit der Plasmamembran in Verbindung steht und einem dichten tubulären, das den Hauptspeicherort für Calcium darstellt. [64], [1]

Steigt der Calciumgehalt an, kommt es zur Aktivierung der Thrombozyten. Ihre Form unterscheidet sich je nach Aktivierungszustand: Inaktive Thrombozyten sind scheiben- oder linsenförmig (diskoid). Durch Aktivierung kommt es zur Bildung von Pseudopodien. [65], [64]



- (1) Granula
- (2) Mitochondrien
- (3) Kanikuläres Membransystem
- (4) Glycogen
- (5) Pseudopodien

*Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Darstellung eines Thrombozyten  
24.000 fache Vergrößerung; Darstellung modifiziert nach [64]*

Von der Gesamtzahl der Thrombozyten befinden sich 150.000-400.000 Thrombozyten /  $\mu\text{l}$  im Blut, ein Drittel ist in der Milz gespeichert. [23]

#### Funktionen von Thrombozyten:

##### Adhäsion:

Bei Kontakt von Thrombozyten mit einer Stelle geschädigten Endothels kommt es zur Adhäsion. Durch Freilegung der subendothelialen Matrix werden die Thrombozyten gegenüber verschiedenen adhäsiven Makromolekülen, wie Laminin, Kollagen und Fibronectin, exponiert. Besonders wichtig ist hierbei Kollagen, das sofort mit im Blut zirkulierendem vWF markiert wird. Diese Bindung führt zu einer Konformationsänderung einer Domäne des vWF, wodurch die Rezeptoren des Glycoprotein GP Ib / IX / V-Komplexes, die in 25.000 facher Ausführung auf Thrombozyten vorliegen, an diesen binden können. [61], [45]

Durch diese Interaktion wird eine Bindung des thrombozytären Kollagenrezeptors GP VI an seinen Liganden ermöglicht. Dadurch wird eine Aktivierung und Degranulation der Thrombozyten gefördert. [61]

Zusätzlich kann eine direkte Bindung des Thrombozyten an Kollagen durch den Rezeptor GP Ia / IIa ausgebildet werden. [61]

Die Adhäsion führt zu einer lockeren Bindung der Blutplättchen an die Stellen der Endothelläsion, die Thrombozyten „rollen“ an der Stelle gestörter Integrität. [61]

##### Aktivierung und Aggregation:

Durch die Läsion und die freiwerdende subendotheliale Matrix bindet der Thrombozyt nicht nur an die Stelle des geschädigten Endothels, sondern wird auch aktiviert. Zu den Stimuli, die zu einer thrombozytären Aktivierung führen, zählen Kollagen und andere Komponenten der subendothelialen Matrix, ADP, Thrombin, Epinephrin, Serotonin und viele weitere Substanzen. Viele dieser Agonisten besitzen spezielle Rezeptoren auf der Oberfläche der Thrombozyten: Thrombin, ein sehr potenter Aktivator, der bei Freilegung von Thromboplastin, durch die plasmatische Gerinnungskaskade, entsteht. Es bindet an den Protease aktivierten Rezeptor PAR-I. Kollagen, das sowohl zur Adhäsion als auch zu starker Aktivierung führen kann, bindet z.B. an den GP Ia / IIa- und GP VI-Rezeptor. ADP als schwächerer Stimulus vermittelt seine Wirkung über die P2Y1- und P2Y12-Rezeptoren. Adrenalin und Serotonin können alleine keine

Aggregation auslösen, wirken aber, wie alle Agonisten, synergistisch. [61], [1], [11], [44]

Folgen der thrombozytären Aktivierung sind:

- Formveränderung der Thrombozyten mit Ausbildung von Pseudopodien, die vor allem durch Aktin ermöglicht wird (shape change)
- Konformationsänderung des GP IIb / IIIa-Rezeptors, der entscheidend für die Aggregation ist
- Degranulierung und Freisetzung diverser Mediatoren (Thromboxan A<sub>2</sub>, Leukotrienen, Serotonin, Plättchenfaktor 4, PDGF, Ca<sup>2+</sup> u.a.)
- Einbau negativ geladener Phospholipide in die Zellmembran, wodurch sich prokoagulatorische, Calcium-bindende Proteine anlagern. [45], [44]

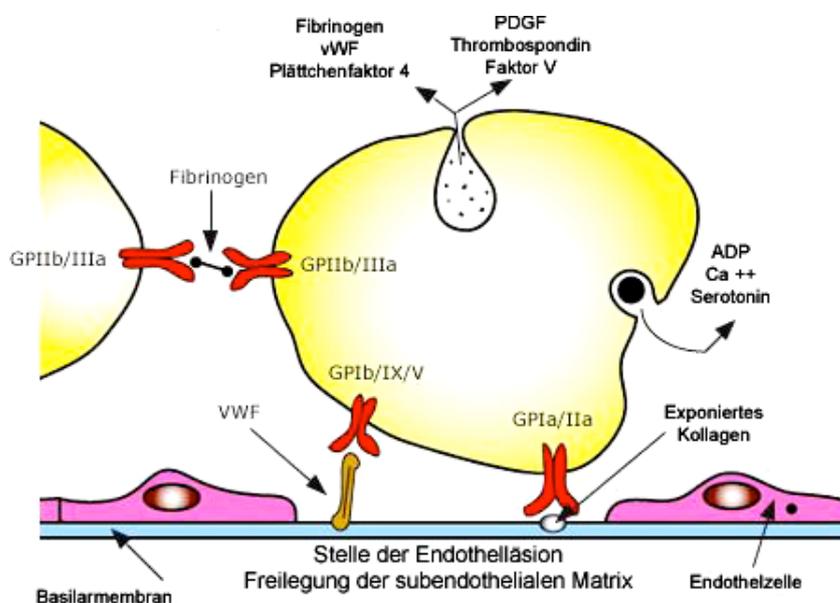


Abbildung 2: Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten an einer Gefäßläsion; Darstellung modifiziert nach [18]

Durch die Freisetzung der Mediatoren wie Thrombin, ADP und Thromboxan A<sub>2</sub> kommt es zur Rekrutierung weiterer Thrombozyten und zur Vasokonstriktion. [61]

Die Konformationsänderung des GP IIb / IIIa-Rezeptors führt zur stabilen Quervernetzung von Thrombozyten über Fibrinogenbrücken. Da sich auf einem Thrombozyten 60.000-80.000 Kopien des GP IIb / IIIa-Rezeptors befinden, kommt es zu Bildung von riesigen Aggregaten und ein weißer Thrombus entsteht. Dieser Rezeptor ist essentiell für die Aggregation. [61], [45], [44]

Prinzipiell ist eine Unterscheidung in reversible und irreversible Aggregation möglich. Bei der reversiblen Aggregation kommt es nach einigen Minuten zur

Auflösung des Thrombus. Im Rahmen einer irreversiblen Aggregation besteht der Thrombus über längere Zeit und der gesamte Granulainhalt wird ausgeschüttet. Dies findet vor allem unter Einwirkung der potenten Agonisten, wie Thrombin und Kollagen statt. [64], [1]

## 1.2 Entstehung und Rolle von Sphingosin und Sphingosin-1-Phosphat

### 1.2.1 Synthese von Sphingosin und Sphingosin-1-Phosphat

#### Synthese von Ceramid, Sphingosin und Sphingosin-1-Phosphat

In der Vergangenheit wurden Sphingosin und Sphingosin-1-Phosphat (S1P) als Zwischenschritte des Sphingolipid-Metabolismus angesehen. Sie gewinnen jedoch zunehmend an Bedeutung als Signalmoleküle in den verschiedensten zellulären Prozessen, wie z.B. Zellwachstum und Migration. [55]

Sphingolipide sind Bestandteile der eukaryotischen Zellmembran. Sie befinden sich in der äußeren Schicht der doppelschichtigen Plasmamembran. Dort scheinen die Sphingolipide die Zelloberfläche durch ihre mechanischen und chemischen Eigenschaften zu schützen. [55], [34]

Eine Schlüsselsubstanz im Sphingolipid-Metabolismus ist Ceramid. Es entsteht durch Acetylierung von Sphingosin, durch Hydrolyse von Sphingomyelin und kann zusätzlich de novo am endoplasmatischen Retikulum synthetisiert werden. [55]

Sphingosin wird nicht neu synthetisiert, sondern entsteht im Rahmen des Sphingolipid-Metabolismus bei der Deacetylierung von Ceramid durch das Enzym Ceramidase. [55], [51]

Das entstandene Sphingosin kann zu S1P phosphoryliert werden. Dies ist ein ATP-abhängiger Prozess, der durch Sphingosinkinasen katalysiert wird. Zwei Isoenzyme kommen hierzu infrage: Sphingosinkinase-1 (SphK-1) und Sphingosinkinase-2 (SphK-2). [55]

Eine Umkehr dieses Schrittes bzw. eine Degradation ist möglich. Dafür stehen drei unterschiedliche Wege zur Verfügung:

Eine Möglichkeit ist die Dephosphorylierung durch zwei spezifische S1P-Phosphatasen SPP-1 und SPP-2. Dadurch entsteht Sphingosin.

Der zweite Weg ist eine irreversible Degradation von S1P. Dies geschieht durch die Pyridoxal-phosphat-abhängige S1P-Lyase im endoplasmatischen Retikulum. Die Produkte dieses Schrittes sind Hexadecenal und Phosphoethanolamin.

Als dritter Abbauweg stehen drei Lysophospholipid-Phosphatasen zu Verfügung, die ebenfalls eine Degradation bewirken. [51], [31], [10], [34]

Die Halbwertszeit von S1P im Plasma scheint relativ kurz zu sein. Bei intravenöser Injektion von C17-S1P beträgt diese ca. 15 Minuten. [62]

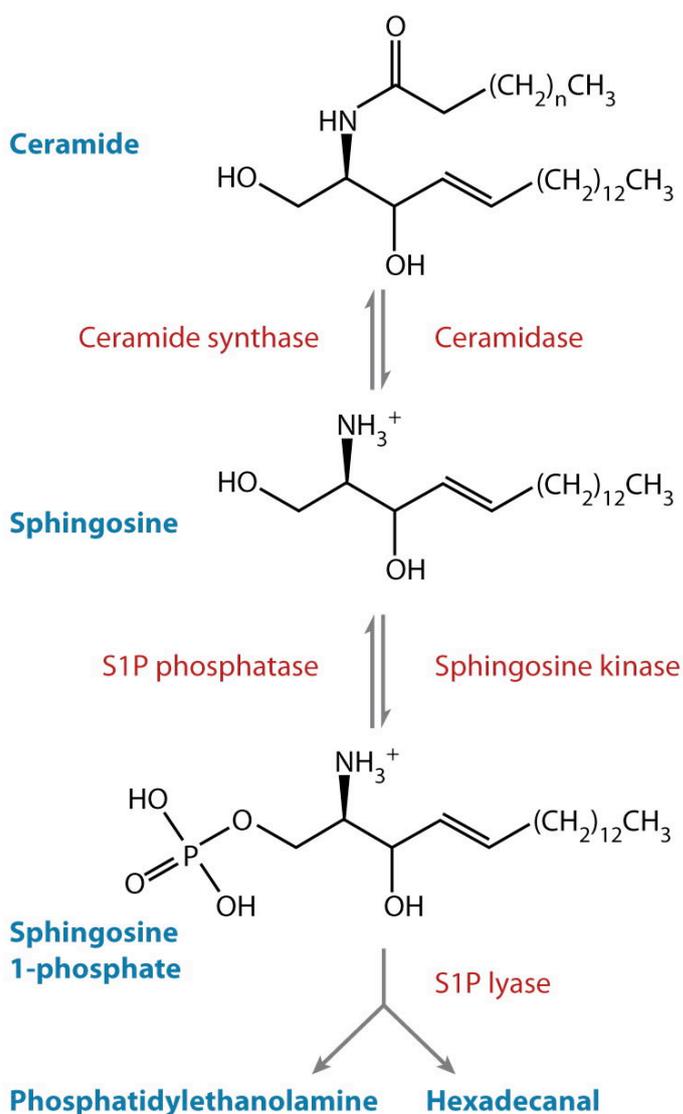


Abbildung 3: Struktur und Synthese der bioaktiven Sphingolipid-Metaboliten; Darstellung aus [46]

### Vorkommen und Entstehung von Sphingosin und Sphingosin-1-Phosphat

Sphingosin ist ein Bestandteil der äußeren Schicht der Plasmamembran-Doppelschicht.

Die phosphorylierte Form S1P wird in relativ hohen Konzentrationen in allen Körperflüssigkeiten gefunden, und in niedrigen Konzentrationen in verschiedenen Geweben. [10], [55]

Im Blutplasma beträgt die Konzentration 200-900 nM. Dort ist es, wie die meisten Lipide, an andere Moleküle gebunden. Albumin, das high-density Lipoprotein HDL und andere Lipoproteine spielen hierbei eine entscheidende Rolle.

Im Serum ist die Konzentration höher und liegt zwischen 400 nM und 1,1 µM. [55], [10]

Dadurch wird ein großes Reservoir an S1P in den extrazellulären Körperflüssigkeiten geschaffen, das relativ konstante S1P-Spiegel aufweist, und gleichzeitig die Quelle des Substrates der hochaffinen S1P-Rezeptoren darstellt. [10], [55]

Eine Vielzahl von Zellen sind an der Entstehung von S1P beteiligt: Thrombozyten, Erythrozyten, Mastzellen, Endothelzellen und viele andere Zellen leisten ihren Beitrag. [10], [55]

So wird S1P von Thrombozyten größtenteils während ihrer Aktivierung, also stimulusabhängig, freigesetzt. Als Stimuli können Thrombin und Proteinkinase C wirken. Die Freisetzung geschieht dabei durch einen ATP-abhängigen Transporter, der zur Familie der ATP-bindenden Cassette gehört (ABC-Transporter). Eine stimulus-unabhängige Sezernierung von S1P aus Thrombozyten ist zusätzlich möglich, spielt aber eine untergeordnete Rolle. Plättchen besitzen sehr aktive Sphingosinkinasen, während es ihnen an S1P-Lyase mangelt. Dadurch ist es möglich, dass sie große Mengen an S1P im Zellinneren speichern können. Bis vor kurzem wurde angenommen, dass Thrombozyten die Hauptquelle für das im Plasma befindliche S1P darstellen. Diese These widerspricht aber der Tatsache, dass NF-E2-defiziente Mäuse, deren Thrombozyten nicht im Plasma zirkulieren, normale S1P-Spiegel besitzen. [5], [55], [42], [62]

Eine zweite Quelle stellen Erythrozyten dar. Die Sphingosinkinase-Aktivität ist, verglichen mit Thrombozyten, in diesen Zellen zwar deutlich geringer, aber ihnen fehlt es sowohl an der S1P-Lyase als auch an den beiden S1P-Phosphatasen SPP-1 und SPP-2. Ihre Sezernierung von S1P erfolgt kontinuierlich. Somit stellen sie die optimale S1P-Quelle dar. [5], [27], [24]

Endothelzellen hingegen sezernieren SphK-1 und können somit zur Entstehung von extrazellulärem S1P beitragen, indem zirkulierendes Sphingosin phosphoryliert wird. [6], [62]

### 1.2.2 S1P-Rezeptoren

S1P bindet mit einer Affinität im nanomolaren Bereich an fünf G-Protein gekoppelte Rezeptoren S1P<sub>1</sub>-S1P<sub>5</sub>. In der Vergangenheit wurden diese auch als endotheliale Differenzierungsgene EDG-1, -5, -3, -6 und -8 bezeichnet. Jeder dieser Rezeptoren zeigt ein unterschiedliches Expressionsmuster, ist an verschiedene G-Proteine gekoppelt und vermittelt so das Spektrum an Wirkungen des Signalmoleküls. [10]

Generell kann S1P auf die produzierende Zelle, also autokrin, oder auf die Umgebung, also parakrin, wirken. [34]

Eine Bindung an einen G<sub>q</sub>-gekoppelten Rezeptor führt zur Aktivierung der Phospholipase C und somit zu einer Ca<sup>2+</sup>-Mobilisation und einer Proteinkinase C-Aktivierung. Bindet S1P an einen Rezeptor mit inhibitorischem G-Protein G<sub>i</sub> erfolgt eine Hemmung der Adenylatcyclase, wodurch der cyclische AMP (cAMP)-Spiegel sinkt. Außerdem werden mehrere Enzyme aktiviert. Eine Bindung an einen G12/13-gekoppelten Rezeptor ruft eine Aktivierung von Rho hervor, welches auf Aktin-Filamente wirkt. [10]

S1P<sub>1</sub>-, S1P<sub>2</sub>- und S1P<sub>3</sub>-Rezeptoren sind auf vielen Zelltypen im ganzen Körper zu finden, insbesondere im kardiovaskulären System. [10]

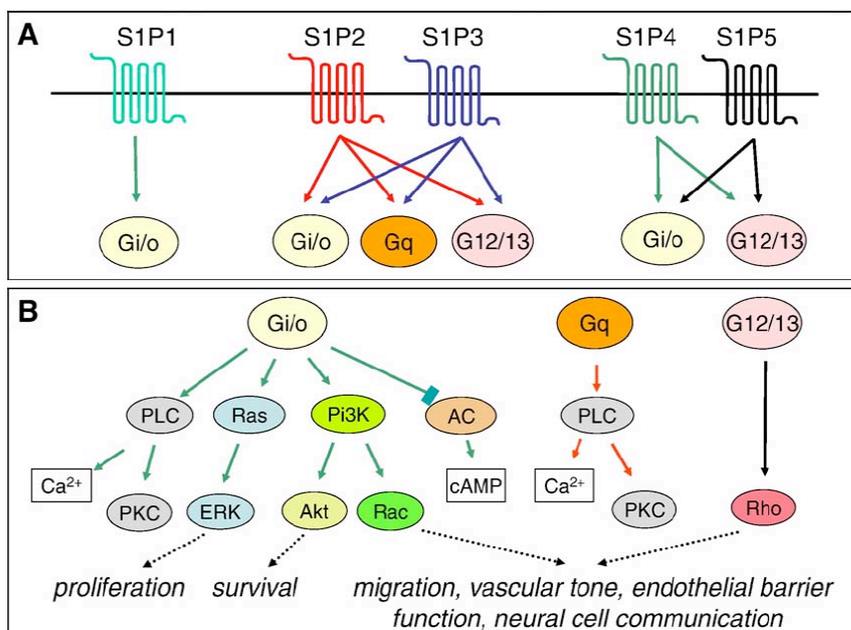


Abbildung 4: S1P-Rezeptoren: Kopplung an G-Proteine und deren Signalwege

[10]

S1P<sub>1</sub>-Rezeptoren werden auf Endothelzellen, im Gehirn, in der Lunge, im Herzen und im Gefäßsystem exprimiert. Dementsprechend spielen sie eine wichtige Rolle für die Angiogenese, die Neurogenese, die Regulation von Entzündungsreaktionen und die Endothelfunktion.

Die neuronale Erregbarkeit und die Funktion des auditorischen und vestibulären Systems werden durch S1P<sub>2</sub>-Rezeptoren moduliert. Außerdem sind die Rezeptoren auf den glatten Muskelzellen der Gefäßwand zu finden.

Der S1P<sub>3</sub>-Rezeptor wird in vielen Organsystemen exprimiert: Herz, Lunge, Milz, Niere und der Gastrointestinaltrakt zählen dazu.

S1P<sub>4</sub>-Rezeptoren sind hingegen im Immunsystem, vor allem auf Leukozyten, und auf glatten Muskelzellen nachweisbar.

In der weißen Substanz des zentralen Nervensystems findet sich der S1P<sub>5</sub>-Rezeptor. Besonders auf den Oligodendrozyten wird er exprimiert, wobei dessen funktionelle Bedeutung noch nicht endgültig geklärt ist. Des Weiteren scheinen die Rezeptoren für die Mobilisation von natürlichen Killer (NK)-Zellen eine Rolle zu spielen. [55], [10]

### 1.2.3 Sphingosinkinasen

Es existieren zwei Isoformen der Sphingosinkinase SphK-1 und SphK-2, die ubiquitär im Zytosol und endoplasmatischen Retikulum vorkommen. Sie können auch sezerniert werden. Beide Isoenzyme verfügen über eine ATP-Bindungsstelle, um die Phosphorylierung von Sphingosin katalysieren zu können. [55]

Trotz des gemeinsamen Substrates und Produktes unterscheiden sich die Enzyme in wichtigen Punkten.

Die SphK-1 bevorzugt D-Erythro-Sphingosin als Substrat. SphK-2 phosphoryliert hingegen ein größeres Spektrum an Sphingolipiden.

SphK-1 besitzt keine transmembrane Domäne. [51]

Bei der SphK-2 sind vier dieser hydrophoben Bereiche zur Verankerung in Plasmamembranen vorhanden. [55]

Außerdem unterscheidet sich das zelluläre Verteilungsmuster der Isoenzyme.

SphK-1 ist vorwiegend zytosolisch lokalisiert, kann aber auch in den extrazellulären Raum sezerniert werden. Das Enzym wird durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren stimuliert. Dazu zählen der platelet-derived growth factor (PDGF), der vascular endothelial growth factor (VEGF) und Zytokine wie

Tumor Nekrose Faktor (TNF)- $\alpha$ . Eine Aktivierung kann durch mehrere Mechanismen erfolgen. Zum einen kann das Enzym phosphoryliert und zur Zellmembran transloziert werden, in der sich das Substrat Sphingosin und die Rezeptoren des Produktes befinden. Zum zweiten ist eine Stimulation durch Interaktion mit sauren Phospholipiden möglich. Eine dritte Variante kann durch Wechselwirkung mit anderen Proteinen zur Aktivierung führen. [46], [51], [55], [34] Über die SphK-2 ist weitaus weniger bekannt. Sie ist vorwiegend nukleär lokalisiert. [46]

Außerdem unterscheidet sich die Wirkung der beiden Enzyme auf das Überleben von Zellen: SphK-1 wirkt anti-apoptotisch. Es besteht ein inverser Zusammenhang zwischen SphK-1-Überexpression und dem Ceramid-Level einer Zelle. SphK-2 hingegen bewirkt den programmierten Zelltod, indem der Gehalt an pro-apoptotischem Ceramid gesteigert wird. [34], [35]

Beide Enzyme können durch die SphK-Inhibitoren N,N-Dimethylsphingosin und DL-Threo-Dihydrosphingosin blockiert werden. [55], [51]

#### 1.2.4 Rolle von Sphingosin und Sphingosin-1-Phosphat

Die drei Substanzen Ceramid, Sphingosin und Sphingosin-1-Phosphat bilden aufgrund ihrer gegenseitigen Umwandelbarkeit ein dynamisches Gleichgewicht. Abhängig von der Aktivität der synthetisierenden Enzyme, SphK-1 und SphK-2 und der abbauenden Enzyme S1P-Lyase, S1P-Phosphatasen und den Lysophospholipid-Phosphatasen, verändern sich die Konzentrationen der Substanzen. [51], [52]

Dieses streng regulierte Gleichgewicht hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung als entscheidendes Mediatorsystem für das Überleben von Zellen und deren Apoptose gewonnen. S1P wirkt dabei anti-apoptotisch, während Ceramid das Gegenteil bewirkt. [52], [51]

Außerdem beeinflusst S1P das Zellwachstum, die Migration und Motilität. Hierbei scheinen vor allem die Aktivierung von intrazellulären GTPasen und eine Veränderung von Aktin im Zytoskelett entscheidend zu sein. [55], [10], [21]

S1P nimmt zudem Einfluss auf spezielle Organsysteme.

Das Immunsystem wird auf verschiedene Arten von dem Signalmolekül beeinflusst. Entzündungsprozesse und die beteiligten Immunzellen werden durch die Wirkung von S1P reguliert. Im Rahmen einer Entzündungsreaktion steigt der

S1P-Spiegel. Der Grund dafür liegt darin, dass mehrere pro-inflammatorische Zytokine, wie VEGF, IL-1 und TNF- $\alpha$ , die SphK-1 aktivieren und so pro-apoptotische Sphingolipide in das anti-apoptotische S1P umgewandelt werden. Dies führt zu einer steigenden Anzahl von Entzündungszellen. [16], [55]

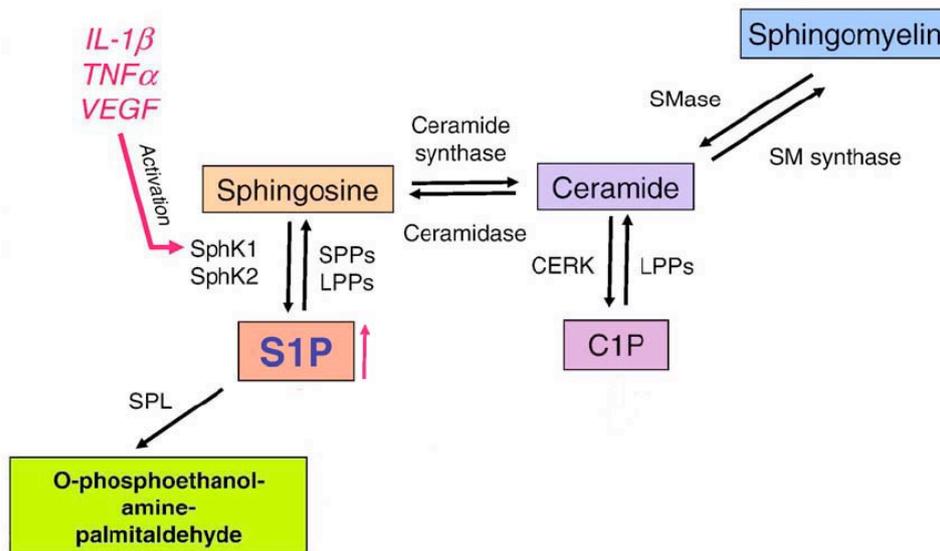


Abbildung 5: Sphingolipid-Metabolismus und Entzündungsreaktion; Darstellung modifiziert nach [10]

S1P-Rezeptoren auf den B- und T-Lymphozyten steuern ihren Egress aus sekundären lymphatischen Organen und dem Thymus und spielen so eine entscheidende Rolle für die adaptive Immunität. Die Wirkung des Signalmoleküls wird durch den S1P<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelt. Fehlt dieser, sinkt die Zahl zirkulierender Lymphozyten. [38], [10]

Diese Wirkung auf das Immunsystem ist entscheidend für den Einsatz des S1P-Rezeptoragonisten FTY 720 als Immunmodulator. Die Substanz ist Gegenstand des Abschnitts 1.2.5.

Endothelzellen sind nicht nur an der Synthese von S1P beteiligt, sondern werden auch durch das Signalmolekül beeinflusst. S1P hat einen Effekt auf die Angiogenese, verändert die Permeabilität des Endothels, führt zu einer Vasodilatation und einer eNOS-Aktivierung. Die Barrierefunktion der innersten Zellschicht von Gefäßen kann durch unterschiedliche Rezeptoren in gegensätzliche Richtungen beeinflusst werden. Durch Bindung an den S1P<sub>1</sub>-Rezeptor nimmt die Barrierefunktion zu, durch Bindung an die S1P<sub>2</sub>- und S1P<sub>3</sub>-Subtypen nimmt sie hingegen ab. [10]

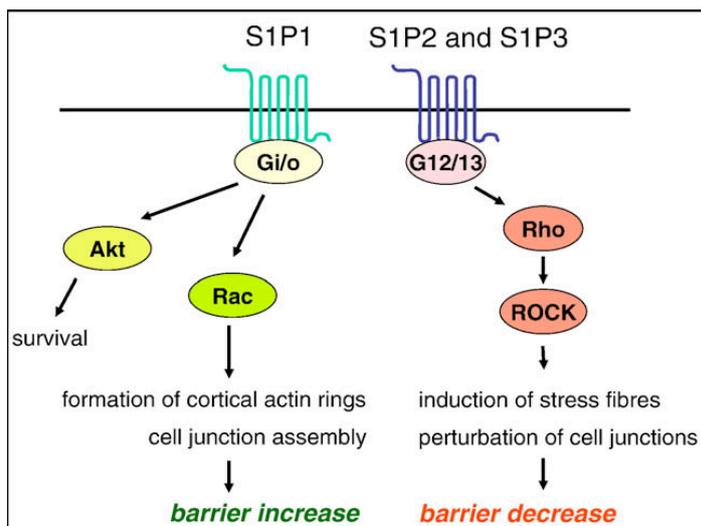


Abbildung 6: Modell zur Regulation der Barrierefunktion des Endothels durch S1P; Darstellung aus [10]

S1P beeinflusst das kardiovaskuläre System nicht nur über Endothelzellen, sondern auch über Herzfrequenzverlangsamung an den atrialen Kardiomyozyten. Glatte Muskelzellen sowohl in den Gefäßen, als auch in den Atemwegen können durch S1P das Signal zu einer Kontraktion vermittelt bekommen. Eine Vasokonstriktion mit konsekutivem Blutdruckanstieg und eine Bronchokonstriktion resultieren. [10]

Nicht zu vernachlässigen ist der Effekt des Signalmoleküls S1P auf das zentrale Nervensystem: Die embryonale Neurogenese wird durch S1P beeinflusst. Astrozyten, Nervenzellen und die neuronalen Endothelzellen, die die Blut-Hirn-Schranke bilden, stehen unter dem Einfluss des Moleküls, das eine Inhibition der Kommunikation über Gap Junctions vermitteln kann. [10]

Zusammenfassend zeigt *Tabelle 1* eine Übersicht der Wirkungen, die das Signalmoleküle S1P mit den zugehörigen Rezeptoren vermittelt:

Zelltyp	Wirkung	S1P-Rezeptorsubtyp
Viele Zelltypen	Migration	S1P <sub>1</sub> , S1P <sub>3</sub> : Induktion S1P <sub>2</sub> : Inhibition
Viele Zelltypen	Anti-Apoptose	S1P <sub>1</sub> , S1P <sub>3</sub>
T- und B-Lymphozyten	Verlassen des Lymphknotens	S1P <sub>1</sub>
Endothelzellen	Angiogenese	S1P <sub>1</sub>
	Barrierefunktion verstärkt	S1P <sub>1</sub>
	Barrierefunktion abgeschwächt	S1P <sub>3</sub> , S1P <sub>2</sub>
	Vasodilatation (eNOS)	S1P <sub>3</sub> , S1P <sub>1</sub>
Atriale Kardiomyozyten	Herzfrequenzreduktion	S1P <sub>3</sub> , S1P <sub>1</sub>
Glatte Muskelzellen	Kontraktion	S1P <sub>3</sub> , S1P <sub>2</sub>
Astrozyten, Neuronen, Endothelzellen	Inhibition der Kommunikation über Gap Junctions	S1P <sub>1</sub> , S1P <sub>3</sub> ?
Neuronen	Neurogenese	S1P <sub>1</sub>

*Tabelle 1: Ausgewählte Wirkungen von S1P und deren zellulären Ansatzpunkte; Eigene Darstellung der Tabelle aus [10]*

#### 1.2.5 Fingolimod (FTY 720)

Bei FTY 720 (2-Amino-2-[2(4-octylphenyl)ethyl]-1,3-propandiol) handelt es sich um einen S1P-Rezeptoragonisten. Es ist ein Derivat von ISP-1 (Myriocin), ein natürliches Produkt der Ascomycete *Isaria sinclairii*. Strukturell besitzt es Ähnlichkeiten mit Sphingosin. [3]

Bevor es an den S1P-Rezeptor binden kann, muss FTY 720, wie Sphingosin, phosphoryliert werden. Dies geschieht im Falle des Analogons durch SphK-2. Als Produkt entsteht das S-konfigurierte FTY 720-Phosphat; das R-konfigurierte Enantiomer ist nicht nachweisbar [66], [3].

An die S1P-Rezeptoren bindet nur das S-Enantiomer des FTY 720-Phosphats, aber weder die R-Konfiguration noch die unphosphorylierte Form. [10] Folgende Affinitäten bestehen zu den fünf Subtypen des S1P-Rezeptors:

Rezeptor-Subtyp	Affinität
S1P <sub>1</sub>	0,3 nM
S1P <sub>2</sub>	>10.000 nM
S1P <sub>3</sub>	3,1 nM
S1P <sub>4</sub>	0,6 nM
S1P <sub>5</sub>	0,3 nM

*Tabelle 2: Affinitäten von FTY 720-Phosphat zu den S1P-Rezeptor-Subtypen [10]*

Es zeigt sich, dass FTY-Phosphat eine hohe Affinität zu den S1P<sub>1</sub>-, S1P<sub>4</sub>- und S1P<sub>5</sub>-Rezeptoren besitzt. Die Affinität zum S1P<sub>3</sub>-Rezeptor ist 10-fach geringer. Eine Bindung an den S1P<sub>2</sub>-Rezeptor findet erst in einem sehr hohen Konzentrationsbereich statt. [10]

Als Quelle für FTY 720-Phosphat, also als Hauptort der Phosphorylierung, gelten Thrombozyten. Diese Zellen besitzen eine hohe Sphingosinkinase-Aktivität, wobei 75% der Kinase-Aktivität durch SphK-1 gewährleistet wird, und 25% durch SphK-2. Letztere ist verantwortlich für die Phosphorylierung von FTY 720. Das intrazellulär gebildete FTY 720-Phosphat kann, wie S1P, stimulus-abhängig und -unabhängig sezerniert werden. Während bei S1P der Großteil der Freisetzung durch Stimulation hervorgerufen wird, spielt dieser Mechanismus über einen ABC-Transporter bei FTY 720 eine untergeordnete Rolle. Vielmehr wird FTY 720-Phosphat stimulus-unabhängig sezerniert. [5]

Obwohl es sich um einen S1P-Rezeptoragonisten handelt, besitzt FTY 720 auch antagonistische Effekte: Bei Bindung an den S1P<sub>1</sub>-Rezeptor induziert die Substanz eine Internalisierung und Degradation des Rezeptors. Folglich ist dieser für längere Zeit an der Zelloberfläche nicht verfügbar, es kommt zur „Downregulation“ des S1P-Signals. Damit unterscheidet sich die Wirkung von FTY 720 von der des S1P und SEW2871, einem anderen S1P<sub>1</sub>-Rezeptoragonisten. Die beiden letzteren Substanzen führen zu einer Rezeptor-Internalisierung und einem Recycling, nicht zu einer Degradation. [55]

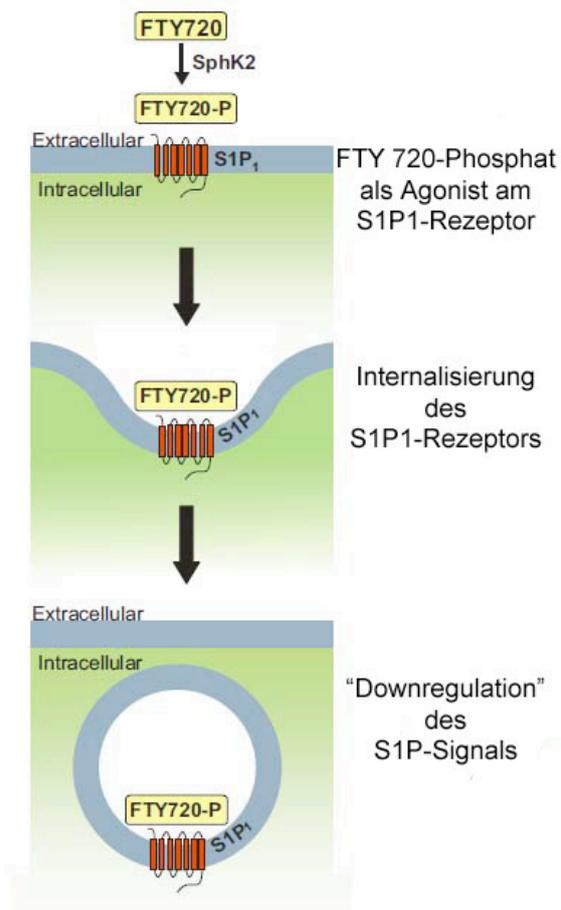


Abbildung 7: Internalisierung des S1P1-Rezeptors durch FTY 720 nach dessen Phosphorylierung durch SphK-2; Darstellung modifiziert nach [55]

Die Wirkungen von FTY 720 sind von den Funktionen des Signalmoleküls S1P, die unter 1.2.4 erläutert sind, ableitbar.

Der im Moment wichtigste Einsatzbereich von FTY 720 ist der als Immunmodulator. Wie zuvor beschrieben, ist S1P von essentieller Bedeutung für Lymphozyten, um die sekundären lymphatischen Organe verlassen zu können, so dass sie im peripheren Blut zirkulieren können. Bindet FTY 720-Phosphat an den S1P<sub>1</sub>-Rezeptor, findet eine Internalisierung und Degradation des Rezeptors statt. Die Folge ist eine längerfristige „Downregulation“ des S1P-Signals und damit ein Zurückbleiben und eine Sequestration von Lymphozyten in den sekundären lymphatischen Organen. FTY 720 wirkt in diesem Fall als „funktioneller S1P-Rezeptorantagonist“. Die Zahl peripherer Lymphozyten sinkt. FTY 720 bewirkt eine Immunmodulation durch eine Beeinflussung der adaptiven Immunantwort. Die Lymphozyten, die in den lymphatischen Organen verbleiben,

aber auch die zirkulierenden, bleiben funktionstüchtig. Damit unterscheidet sich FTY 720 von den meisten anderen Immunsuppressiva. Ein zweiter Effekt des S1P-Rezeptoragonisten trägt wahrscheinlich zu dieser peripheren Lymphopenie bei: Wenn FTY 720 an den S1P<sub>1</sub>-Rezeptor bindet, verstärkt sich die Barrierefunktion des Endothels und verhindert so die Diapedese von Lymphozyten. [55], [10], [38]

Mögliche klinische Einsatzgebiete des Immunmodulators sind die Verhinderung einer Abstoßungsreaktion bei Nierentransplantation, Multiple Sklerose und andere Autoimmunkrankheiten. [55], [36], [47]

#### 1.2.6 VPC 23019

Bei VPC 23019 handelt es sich um ein S1P-Analogon. Es liegt, im Gegensatz zu FTY 720, bereits in phosphorylierter Form vor und ist kompetitiver Antagonist am S1P<sub>1</sub>- und S1P<sub>3</sub>-Rezeptor. Dieser Effekt lässt sich bei K<sub>i</sub>-Werten am S1P<sub>1</sub>-Rezeptor um 25 nM und am S1P<sub>3</sub>-Rezeptor um 300 nM, je nach Literaturangabe und Versuchsaufbau, nachweisen. [20], [33]

Am S1P<sub>4</sub>- und S1P<sub>5</sub>-Rezeptor besitzt das Molekül agonistische Aktivität, die sich am S1P<sub>2</sub>-Rezeptor nicht nachweisen lässt. [20]

Die Bindung von S1P an diesem Rezeptor bleibt von VPC 23019-Konzentrationen bis 10µM unbeeinflusst. [20]

Durch Blockade der S1P<sub>1</sub>- und S1P<sub>3</sub>-Rezeptoren lässt sich die S1P induzierte Migration von Schilddrüsen-Carcinom-Zellen vermindern. Dies entspricht einer Verhinderung der S1P-Wirkung an den beiden Rezeptoren, wie in 1.2.4 beschrieben. [25]

#### 1.2.7 JTE-013

JTE-013 ist ein spezifischer Antagonist am S1P<sub>2</sub>-Rezeptor. Effekte an den übrigen S1P-Rezeptoren lassen sich nicht nachweisen. [41]

Die Bindung von S1P an die S1P<sub>1</sub>- und S1P<sub>3</sub>-Rezeptoren bleibt von JTE-013-Konzentrationen bis 10µM unbeeinflusst. [55], [40]

Die Zellmigration wird in Anwesenheit von S1P durch JTE-013 verstärkt. Dies passt zu der Annahme, dass der S1P<sub>2</sub>-Rezeptor einen negativen Effekt auf die Migration ausübt, während die S1P<sub>1</sub>- und S1P<sub>3</sub>-Rezeptoren diese verstärken. [41]

Den Effekten von S1P auf die Endothelfunktion entsprechend, die unter 1.2.4 und in *Abbildung 6* beschrieben sind, führt der Einsatz von JTE-013 zu einer Verminderung der vaskulären Permeabilität und damit zu einer Zunahme der Barrierefunktion des Endothels. [48]

### 1.3 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Thrombozyten stellen einen wichtigen Entstehungsort für S1P und die Hauptquelle für FTY 720-Phosphat dar. Sie bilden diese Substanzen durch Phosphorylierung aus Sphingosin bzw. FTY 720. Dies wird begünstigt durch ihre hohe Sphingosinkinase-Aktivität und den Mangel an S1P-Lyase. Die gebildeten Substanzen werden durch Sezernierung über Transportersysteme freigesetzt und nicht etwa bei der Zerstörung der Zellmembran.

Die Blutplättchen nehmen also eine essentielle Rolle in der Bildung und Freisetzung des ubiquitären Signalmoleküls ein, das Einfluss auf eine Vielzahl von Zellen hat.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zu analysieren, ob Thrombozyten nicht nur den Entstehungsort von S1P und FTY 720-Phosphat darstellen, sondern ob die S1P-Rezeptoragonisten auch Einfluss auf die Funktion der Zellen haben.

Dazu wird in den folgenden Versuchen die Thrombozytenfunktion mit Hilfe der Aggregometrie untersucht und das Aggregationsvermögen unter dem Einfluss von Sphingosin, S1P und FTY 720 beurteilt. Verschiedene Konzentrationen und Inkubationszeiten der Substanzen werden dazu überprüft.

Um Rückschlüsse auf Wirkmechanismen und vermittelnde Rezeptoren ziehen zu können, werden die isolierten Thrombozyten zusätzlich mit S1P-Rezeptorantagonisten inkubiert. Außerdem kommen S1P<sub>4</sub>-Rezeptor-KO-Mäuse zum Einsatz.

Im Rahmen der mechanistischen Überlegungen wird außerdem die Rolle der Sphingosinkinasen für die Effekte von Sphingosin und FTY 720 unter Zuhilfenahme von SphK-KO Mäusen überprüft.

Zusammenfassend sollen also folgende Fragen beantwortet werden:

- Welchen Einfluss haben Sphingosin, S1P und FTY 720 auf das Aggregationsvermögen von Thrombozyten?
- Welche Rezeptoren sind an der Wirkungsvermittlung beteiligt?
- Welche Rolle spielen die Sphingosinkinasen für die Wirkung von Sphingosin und FTY 720?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Substanzen

#### 2.1.1 ACD-Puffer

ACD ist die Abkürzung für „Acid Citrat-Dextrose“ und wird in-vitro zur Gerinnungshemmung eingesetzt. Es wird vor der Blutabnahme in eine Spritze gefüllt, um eine Aktivierung der Thrombozyten zu verhindern. Die Wirkweise beruht auf einer Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, und ähnelt damit der Wirkung von Natriumcitrat, das in der klinischen Routine häufig eingesetzt wird.

Um diesen Puffer herzustellen, werden 12,5 g Natriumcitrat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), 6,82 g Zitronensäure (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) und 10 g D-(+)-Glucose (Minimum 99,5%; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) abgewogen. Ein Volumen von 500 ml destilliertem Wasser wird hinzugefügt. Unter ständigem Rühren wird der pH-Wert auf 4,69 unter Verwendung von 2 M Natronlauge NaOH eingestellt. Eine Lagerung ist nach steriler Filtrierung und bei 2-8°C über längere Zeit möglich.

#### 2.1.2 Tyrodes-Puffer

Der verwendete Tyrodes-Puffer dient der Isolation und Präparation von Thrombozyten. Durch seine Eigenschaften als Puffer ermöglicht er ein Arbeiten in einem konstanten pH-Bereich und verhindert so eine vorzeitige Aktivierung der Blutplättchen. Um dies zu gewährleisten, wird die Lösung für jeden Versuch neu hergestellt. Während der gesamten Thrombozytenpräparation wird der Tyrodes-Puffer auf Raumtemperatur gehalten, um die Funktion der Zellen möglichst wenig zu beeinflussen.

Zur Herstellung eines Volumens von 100 ml der Lösung werden zunächst die zwei Trockensubstanzen D-(+)-Glucose (Minimum 99,5%; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) und bovines Serumalbumin Fraktion V (>95% fettsäurefrei; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) auf je 0,1 mg mit Hilfe einer geeichten Waage abgewogen. Diese werden in ein Becherglas gegeben und 90 ml destilliertes Wasser werden hinzugefügt. Im Anschluss werden

1 ml 1 M Hepes-Lösung (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) und 10 ml einer vorbereiteten 10-fach konzentrierten Tyrodes-Lösung hinzugegeben. Zu Herstellung dieser Lösung werden in 1000 ml destilliertem Wasser 80 g NaCl (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland), 10,15 g NaHCO<sub>3</sub> (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) und 1,95 g KCl (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) gelöst. Diese Flüssigkeit kann dann im Kühlschrank bei 4°C über mehrere Wochen gelagert werden. Das Becherglas wird nun, mit den darin befindlichen Lösungen, auf einer Rührvorrichtung platziert. Unter Zuhilfenahme eines pH-Meters und 2 M Salzsäure (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) wird der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Dieser Puffer soll später ein möglichst physiologisches Medium darstellen, da der Säuregrad dem des Blutes entspricht. Anschließend werden ca. 50 ml des Tyrodes-Puffers in ein zweites Becherglas gegeben und ein pH-Wert von 6,5 unter ständigem Rühren mit Hilfe derselben HCl-Lösung erreicht. Diese Lösung wird später bei der Thrombozytenpräparation in den ersten Arbeitsschritten verwendet, und soll, durch den niedrigen pH-Wert einer Aktivierung der Zellen entgegenwirken. So erhält man je 50 ml Tyrodes-Puffer der pH-Werte 7,4 bzw. 6,5, die sofort bei der Isolation der Blutplättchen eingesetzt werden können.

### 2.1.3 Dimethylsulfoxid

Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) ist eine bipolare Substanz. Die Summenformel lautet: (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO.

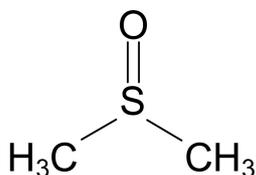


Abbildung 8: Strukturformel von Dimethylsulfoxid [49]

DMSO eignet sich als Lösungsmittel und als Gefrierschutzmittel bei der Kryokonservierung von Zellen. Es gefriert schnell und taut langsam bei Raumtemperatur auf, so dass es als klare, farblose Flüssigkeit vorliegt. Zytotoxische Effekte sind bei einer Konzentration von mehr als 10% zu erwarten. [19], [49]

### 2.1.4 Sphingosin

Das Sphingolipid Sphingosin ist ein zellulärer Membranbestandteil. In den folgenden Versuchen wurde D-Sphingosin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) verwendet. Dabei handelt es sich um ein natürliches Isomer von Sphingosin, welches synthetisch hergestellt wird. Die Substanz mit der Summenformel  $C_{18}H_{37}NO_2$  und der systematischen Bezeichnung Trans-D-erythro-2-amino-4-octadecene-1,3-diol hat folgende Struktur:

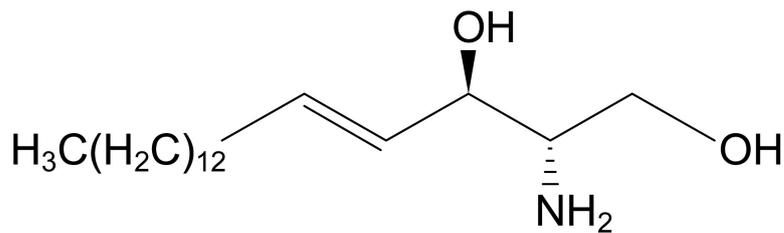


Abbildung 9: Strukturformel von D-Sphingosin [50]

Sie wird in ungelöster Form bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. [50]

Gelöst wird D-Sphingosin in DMSO, so dass eine Lösung mit einer Konzentration von 10 mM entsteht, welche dann bei  $4^{\circ}\text{C}$  im Kühlschrank aufbewahrt wird. Vor Verwendung in der Aggregometrie wird es langsam auf Raumtemperatur erwärmt und je nach benötigter Konzentration mit Tyrodes-Puffer, der einen pH-Wert von 7,4 hat, verdünnt.

### 2.1.5 Sphingosin-1-Phosphat

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA) entsteht durch Phosphorylierung aus Sphingosin durch Sphingosinkinasen. Das kristalline Pulver mit der Formel  $C_{18}H_{38}NO_5$  ist bei Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  mehr als ein Jahr haltbar. [15]

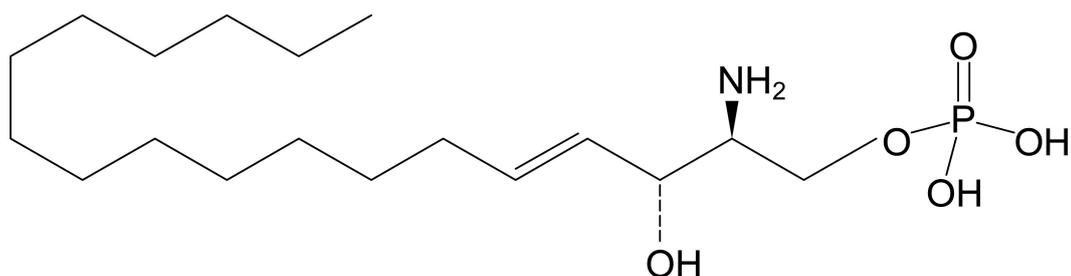


Abbildung 10: Strukturformel Spingosin-1-Phosphat [15]

Um S1P zu lösen, wird es in seine ionisierte Form überführt. Durch 2  $\mu\text{l}$  Morpholine (Acros Organics, Geel, Belgien) kann 1 mg S1P in sein Salz umgewandelt werden. Dieses wird anschließend mit Methanol (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) auf eine Konzentration von 10 mM verdünnt. [43]

Die Aufbewahrung ist über wenige Wochen im Gefrierschrank bei  $-20^{\circ}\text{C}$  möglich. Dabei ist auf einen besonders luftdichten Verschluss der gläsernen Aufbewahrungsgefäße und eine möglichst kurze Lagerungszeit zu achten, um das Verdampfen der Lösungsmittel und damit eine Konzentrierung des Sphingosin-1-Phosphats zu vermeiden. Da Methanol und Morpholine flüchtige Substanzen sind, und eine Verdunstung die Konzentration von S1P ändern würde, werden die Aufbewahrungsgefäße erst kurz vor dem Beginn der Aggregation aus dem Gefrierfach genommen und sofort mit Tyrodes-Puffer ( $\text{pH} = 7,4$ ) auf die benötigte Konzentration verdünnt.

#### 2.1.6 Fingolimod (FTY 720)

FTY 720 (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA) ist ein strukturelles Analogon zu Sphingosin mit der Summenformel  $\text{C}_{19}\text{H}_{33}\text{NO}_2$ , das durch die Sphingosinkinase-2 in seine biologisch aktive Form überführt werden kann. [66]

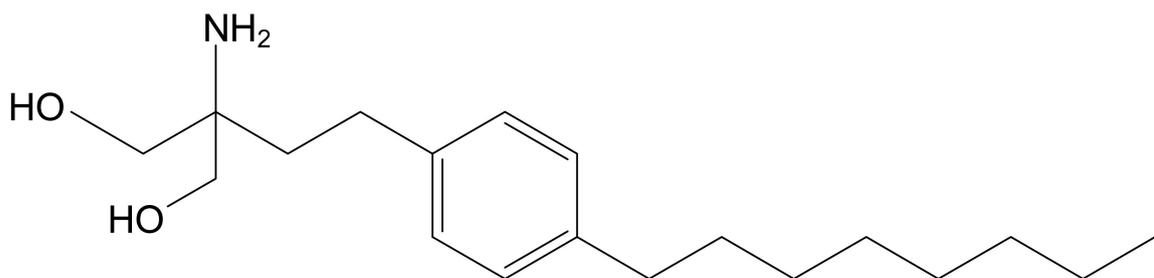


Abbildung 11: Strukturformel von FTY 720 [13]

Bei Raumtemperatur liegt FTY 720 als Hydrochlorid in Form von kristallinem Pulver vor und ist bei Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  mehr als zwei Jahre haltbar. Der Lösungsvorgang findet unter Argon-Atmosphäre statt, um eine Reaktion mit Luftsaurestoff zu vermeiden. Gelöst wird FTY 720 in DMSO, so dass eine Konzentration von 5mg/ml erreicht wird. Anschließend wird dieses ebenfalls bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Direkt vor Versuchsbeginn wird FTY 720 in einem Eisbad langsam aufgetaut und mit Tyrodes-Puffer versetzt. [13]

In vivo sollte FTY 720 oral verabreicht werden, da es in dieser Darreichungsform eine bessere Wirksamkeit aufweist als bei intravenöser Gabe. Ein Grund dafür könnte in der Phosphorylierung in der Leber liegen, die eine hohe Expression von SphK-2 aufweist. [55]

#### 2.1.7 VPC 23019

Bei VPC 23019 handelt es sich um einen S1P<sub>1</sub>- und S1P<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten. Seine Summenformel, C<sub>17</sub>H<sub>29</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>P, spiegelt sich in folgender Struktur wider:

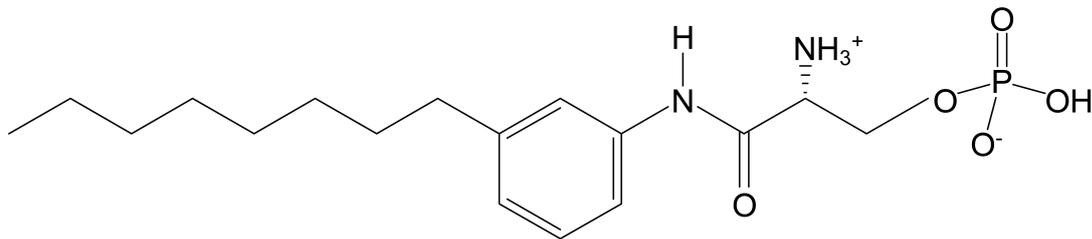


Abbildung 12: Strukturformel von VPC 23019 [8]

Es liegt also bereits, im Gegensatz zu FTY 720, in phosphorylierter Form vor, wie in der Strukturformel erkennbar. Um VPC 23019 (Avanti Polar Lipids, Inc. Alabaster, Alabama, USA) zu lösen, wird es zunächst mit DMSO versetzt, um eine Konzentration von 20 mM zu erreichen. Anschließend wird es 1:20 verdünnt mit einer dreiprozentigen wässrigen Lösung von bovinem Serumalbumin Fraktion V (>95% fettsäurefrei; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), so dass eine 1 mM Lösung entsteht, deren Lösungsmittel 95% der wässrigen Lösung von bovinem Serumalbumin und 5% DMSO enthält. Bevor VPC 23019 in den Versuchen zum Einsatz kommen kann, wird es im Eisbad langsam aufgetaut und anschließend mit Tyrodes-Puffer des pH-Wertes 7,4 verdünnt, um die gewünschte Konzentration zu erreichen. [55]

#### 2.1.8 JTE-013

JTE-013 (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA) ist ebenfalls ein S1P-Rezeptor-Antagonist, der selektiv den S1P<sub>2</sub>-Rezeptor blockiert. Wird das kristalline Pulver mit der Summenformel C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>7</sub>O bei -20°C gelagert, ist es mehr als zwei Jahre haltbar.

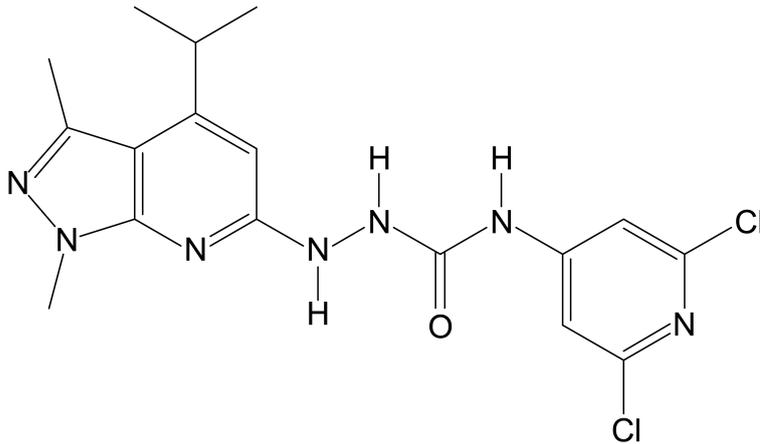


Abbildung 13: Strukturformel von JTE-013 [14]

Um JTE-013 zu lösen, wird es unter Argon-Atmosphäre mit DMSO versetzt, eine Konzentration von 5 mg/ml eingestellt und ebenfalls bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Zur Verwendung in den Aggregationsversuchen wird es langsam im Eisbad aufgetaut und anschließend mit Tyrodes-Puffer auf die benötigte Konzentration verdünnt. [14]

## 2.2 Aggregometrie

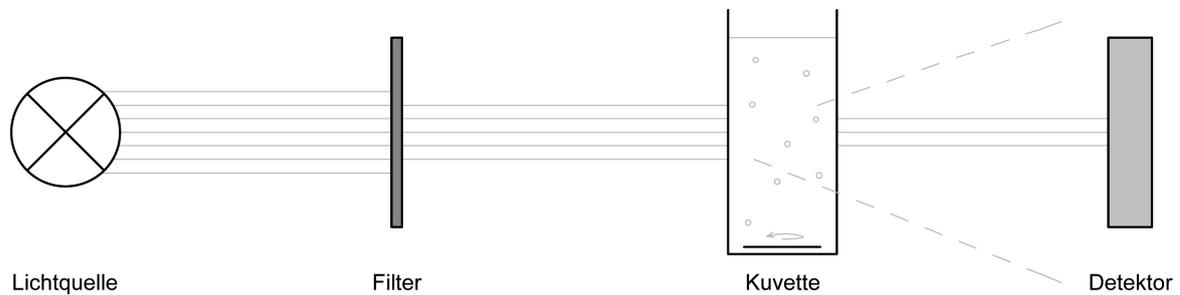
### 2.2.1 Grundlagen

Bei der Aggregometrie sind grundsätzlich zwei verschiedene Techniken zu unterscheiden. 1962 wurde das turbimetrische Verfahren nach Born etabliert, bei dem plättchenreiches Plasma oder gewaschene Thrombozyten auf ihr Aggregationsvermögen hin getestet werden können. Zum anderen existiert die Impedanz-Technik bei der Vollblut eingesetzt werden kann. Somit ergeben sich aus den unterschiedlichen verwendeten Medien die Vor- und Nachteile der zwei Verfahren: Bei der Impedanz-Technik ist die Verwendung von Vollblut möglich. Durch die physiologischen Konzentrationen der Blutbestandteile und das Vorhandensein anderer Blutzellen sind die Versuchsbedingungen besser vergleichbar mit den Bedingungen in vivo. Bei der Verwendung von plättchenreichem Plasma oder isolierten Thrombozyten befinden sich die Zellen in einem künstlichen Milieu. Wechselwirkungen mit anderen Zellen oder dem Plasma sind somit weniger gut erkennbar. Durch die Präparation in der Zentrifuge sedimentieren schwerere, oft reaktivere, Thrombozyten mit den Leukozyten und Erythrozyten und werden entfernt. Außerdem ist die Thrombozytenpräparation zeitaufwendig. Trotzdem bietet auch das turbimetrische Verfahren nach Born, das in den folgenden Versuchen angewendet wurde, Vorteile. Durch die Isolation der Zellen bei der Thrombozytenpräparation können Wechselwirkungen und damit eventuelle Störfaktoren weitgehend eliminiert werden. Eine Standardisierung der Zellzahlen und der Ionenkonzentrationen wird möglich. Dies verbessert die Vergleichbarkeit der Daten verschiedener Individuen, aber auch die eines Individuums an verschiedenen Versuchstagen. Deshalb eignet sich das turbimetrische Verfahren besonders für die isolierte Betrachtung von Blutplättchen, z.B. bei der Diagnostik von Funktionsstörungen, und für die Erforschung von Grundlagen der Thrombozytenfunktion. [11], [65]

Das turbimetrische Verfahren nach Born beruht auf dem Prinzip, dass die Lichtstreuung und damit die optische Dichte einer Suspension von der Anzahl der Partikel abhängig sind. [23], [11]

Die optische Dichte einer Thrombozytensuspension, sei es in Form von plättchenreichem Plasma oder isolierten Thrombozyten, nimmt also ab, sobald die

Zellen aggregieren. Durch die Aggregation nimmt die Anzahl der Partikel ab. [23], [11]



*Abbildung 14: Schematischer Aufbau eines Aggregometers*

Die in der Kuvette befindliche Thrombozytensuspension wird konstant auf 37°C temperiert, um den physiologischen Bedingungen möglichst ähnlich zu sein, und durch eine kunststoffbeschichtete Rührvorrichtung bei definierter Geschwindigkeit bewegt. Dieses Gefäß wird, wie in *Abbildung 14* ersichtlich, zwischen der Lichtquelle und dem Detektor in den Strahlengang des Lichtes platziert. Durch eine Filtervorrichtung wird zum Einen die Streustrahlung reduziert, und zum Anderen ausschließlich Licht einer bestimmten Wellenlänge transmittiert, so dass monochromatisches Licht entsteht. Der Detektor misst die Abnahme der Lichttransmission und überträgt die gewonnenen Daten an einen angeschlossenen Rechner.

Bei Zugabe definierter Mengen verschiedener Plättchenagonisten aggregieren die Thrombozyten, und die Lichtdurchlässigkeit steigt. Die Transmission wird fortwährend photometrisch registriert und als Kurve aufgezeichnet. Durch die Änderung der Lichttransmission im Zeitverlauf kann auf das Aggregationsvermögen der Thrombozyten rückgeschlossen werden. [44], [11], [23]

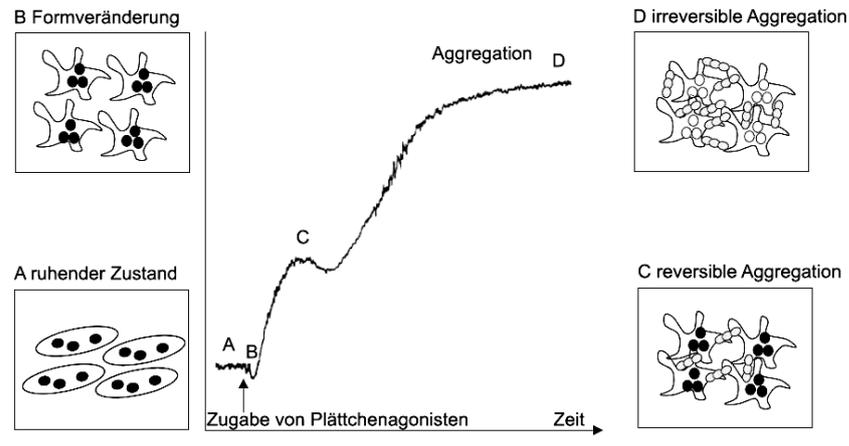


Abbildung 15: Darstellung der Transmissionsänderung während der Aggregation; Darstellung modifiziert nach [23]

Wie in *Abbildung 15* gezeigt, ist die optische Dichte zu Beginn der Messung hoch. Folglich ist die Lichtdurchlässigkeit gering (*Stadium A*).

Bei Zugabe von Plättchenagonisten in die Küvette vollzieht sich eine Formänderung der Thrombozyten. Dieser „shape change“ ist charakterisiert durch die Bildung von Pseudopodien. Im Kurvenverlauf ist dies durch eine kurzzeitige Abnahme der Lichtdurchlässigkeit gekennzeichnet (*Stadium B*).

Durch die fortdauernde Wirkung der Agonisten lagern sich die Thrombozyten zusammen, es kommt zu einer reversiblen Aggregation durch Fibrinogenbrücken. Dadurch nimmt die Anzahl der Partikel ab und die Lösung wird klarer. Die Transmission steigt (*Stadium C*).

Im weiteren Verlauf kann es zu grundsätzlich verschiedenen Kurvenverläufen kommen. Der Kurvenverlauf unterscheidet sich je nach verwendetem Plättchenagonisten.

Zum Einen ist eine Desaggregation möglich, in der die Lichtdurchlässigkeit wieder abnimmt. Eine andere Möglichkeit, wie in *Abbildung 15* dargestellt, ist ein biphasischer Verlauf, in der eine primäre, reversible Aggregation auftritt, gefolgt von einem Plateau und einer sekundären, irreversiblen Aggregation. Dieser Schritt ist an einer erneuten Zunahme der Lichtdurchlässigkeit erkennbar (*Stadium D*) und tritt bei Entleerung der gespeicherten Faktoren und Granula auf. Die Entstehung eines Plateaus ist typisch für die Verwendung von Kollagen. [65] Auch

ein monophasischer Verlauf mit direktem Übergang der reversiblen Aggregation zur irreversiblen kann unter bestimmten Bedingungen beobachtet werden.

Das Aggregationsvermögen kann als maximale Zunahme der Aggregation in % gemessen oder als Aggregationsrate, also durch die Steigung der Kurve pro Zeiteinheit, angegeben werden. [23], [11]

Das zweite mögliche Verfahren, die Vollblutaggregometrie durch Impedanzmessung, beruht auf einer elektrischen Widerstandszunahme bei Aggregation der Thrombozyten. Diese kann gemessen werden. [23]

### 2.2.2 humane Thrombozytenpräparation

Für Versuche mit humanen Thrombozyten wird den Spendern beider Geschlechter in ausgeglichenem Verhältnis im Alter von 20 bis 40 Jahren venöses Blut aus der Ellenbeuge entnommen. Hierzu werden zwei 20 ml Spritzen (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) mit je 4 ml ACD-Puffer zur Antikoagulation gefüllt. Die Spritzen werden mit einem Membran-Adapter verschlossen (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) und langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Zur Blutentnahme wird ein Micro-Flo Infusions-Set mit Flügelkanüle (21 G; Seidel Medizin, Technik, Forschung, Schulung GmbH; Buchendorf, Deutschland) mit einem Multiadapter (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) verwendet. Dabei muss auf eine möglichst behutsame Blutentnahme durch langsames Aufziehen der Spritze geachtet werden, um die Thrombozyten nicht vorzeitig zu aktivieren.

Nach einer vorsichtigen Durchmischung werden je 10 ml des Blutes langsam in zwei 15 ml Gefäße abgefüllt und anschließend 20 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0R, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, Massachusetts, USA) ohne Abbremsung am Ende des Zentrifugationsvorganges. Das als Überstand entstandene plättchenreiche Plasma wird mit Hilfe einer Transferpipette in ein 50 ml Gefäß überführt, wobei dies mit besonderer Vorsicht geschehen muss, um eine Aktivierung der Thrombozyten zu vermeiden. Anschließend wird das Plasma mit dem frisch hergestellten Tyrodes-Puffer, der einen pH-Wert von 6,5 besitzt, auf 35 ml aufgefüllt und erneut bei 2000 rpm zentrifugiert. Durch diesen Zentrifugationsvorgang entsteht ein Pellet, dessen Überstand vorsichtig dekantiert wird. Die im Pellet zusammengelagerten Thrombozyten werden mit 500 µl des sauren Tyrodes-Puffer behutsam

resuspendiert und im Anschluss mit dem gleichen Volumen des Puffers, dessen pH-Wert 7,4 ist, verdünnt. Um die standardisierte Konzentration von  $2 \times 10^8$  Thrombozyten / ml zu erreichen, wird eine Zellzählung vorgenommen (Sysmex Microcellcounter XE-2100, Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland) und die Thrombozyten-Lösung entsprechend mit dem physiologischen Tyrodes-Puffer eingestellt.

### 2.2.3 murine Thrombozytenpräparation

Die Präparation muriner Thrombozyten unterscheidet sich prinzipiell nur wenig von der menschlicher Thrombozyten. Zu beachten ist jedoch, dass wesentlich kleinere Volumina zur Verfügung stehen. So kann bei einer Maus im Alter von acht bis zwanzig Wochen, die ca. 20-40 g wiegt, ein Blutvolumen zwischen 1,0 und 2,5 ml erreicht werden.

Um diese Volumen gewährleisten zu können, erfolgt bei der Maus eine kardiale Blutentnahme.

#### Vorbereitung:

Zunächst wird pro Versuchstier eine 2 ml Spritze (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) mit 300  $\mu$ l ACD-Puffer gefüllt, um eine Gerinnung des Blutes zu verhindern. Die Spritze wird mit einer Kanüle (BD Microlance 3, 26G x  $\frac{1}{2}$ " , 0,45 x 13mm, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) versehen. Durch ein langsames Herunterdrücken des Stempels wird gewährleistet, dass auch die Kanüle mit ACD-Puffer gefüllt ist.

#### Inhalationsanästhesie:

Nach Vorbereitung wird das Versuchstier durch eine Inhalationsanästhesie mit Isofluran (Florene, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) narkotisiert. Da das volatile Anästhetikum Isofluran bei Raumtemperatur als Flüssigkeit vorliegt, wird ein Vapor (Ohmeda Isotec 3, Eickmeyer, Tuttlingen, Deutschland; eingerichtet von Völker GmbH, Kaltenkirchen, Deutschland) eingesetzt. Bei der Substanz handelt es sich um ein potentes Anästhetikum, das sich durch schnelle An- und Abflutung auszeichnet. Dadurch wird eine rasch reversible Anästhesietiefe erreicht, die sich besonders für kurz dauernde Eingriffe, wie Blutentnahmen, eignet. [4]

Isofluran besitzt „gute hypnotische“, „gute muskelrelaxierende“ und „schwache analgetische“ Eigenschaften. [4] Dadurch kann bei wenig schmerzhaften Eingriffen auf ein zusätzliches Analgetikum verzichtet werden.

Zur Narkoseeinleitung wird das Versuchstier vom Käfig aus in eine Röhre platziert, in die das Inhalationsanästhetikum und Sauerstoff eingeleitet werden. Sobald die hypnotische Wirkung eingesetzt hat, wird die Maus aus der Röhre entfernt und auf einer Wärmematte (ThermoLux-Wärmematte, Dehner, Deutschland) positioniert. Die Nase des Tieres wird in einer Narkosemaske platziert. Zur Fixierung dieser und der Extremitäten wird ein Pflasterband (Transpore™, 3M Health Care, Neuss, Deutschland) verwendet. Eine Ausleuchtung des Punktionsgebietes geschieht durch eine Schwanenhalslampe (Schott Kaltlichtquelle KL200 und Schwanenhals-Lichtleiter, Carl Zeiss AG, Göttingen, Deutschland).

Eine ausreichende Narkosetiefe wird durch eine Überprüfung des Zwischenzehenreflexes und der Atem- und Pulsfrequenz in regelmäßigen Abständen gewährleistet.

#### Kardiale Punktion:

Zur Vorbereitung der kardialen Punktion wird die Haut des Brustkorbes zunächst desinfiziert (Cutasept F, Bode Chemie, Hamburg, Deutschland) und durch einen Schnitt entlang des Sternums eröffnet und zur Seite geklappt. Die Punktionsstelle wird dort gewählt, wo der Herzspitzenstoß am besten fühlbar ist. Anschließend wird die Kanüle senkrecht zur Thoraxoberfläche, so tief wie es die Kanülenlänge zulässt, eingestochen. Unter Aspiration wird die Spritze langsam zurückgezogen. In der Position, in der Blut durch die Kanüle tritt, verharrt man möglichst ruhig und zieht langsam die Spritze auf. Durch mehrere, regelmäßige Pausen kann ein hoher negativer Druck und damit ein Kollaps der Herzkammer verhindert werden. Dies ist bei versehentlicher Punktion des wandschwachen rechten Ventrikels von besonderer Bedeutung.

Da die kardiale Punktion mit dem Risiko sehr schmerzhafter Komplikationen wie einem Pneumothorax oder einer Herzbeutelamponade einhergeht, empfiehlt es sich diese nur bei terminalen Versuchen einzusetzen. [7]

### Thrombozytenpräparation:

Beim weiteren Vorgehen ist unbedingt auf einen schonenden Umgang mit dem Blut zu achten, um eine Aktivierung der Thrombozyten zu vermeiden. So werden alle Flüssigkeiten und das Blut selbst stets an dem Rand der Gefäße appliziert und langsam hinunterlaufen gelassen.

Das gewonnene Blut wird in ein Glasröhrchen gefüllt und mit Tyrodes-Puffer des pH-Wertes 6,5 auf 2 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Es schließt sich eine Zentrifugation (Heraeus Megafuge 1.0, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, Massachusetts, USA) bei 600 rpm für 20 Minuten ohne Abbremsung am Ende des Zentrifugationsvorganges an. Das als Überstand entstandene plättchenreiche Plasma wird mit Hilfe einer Transferpipette in ein zweites Glasröhrchen überführt, und mit Tyrodes-Puffer, der einen pH-Wert von 6,5 besitzt, auf ein Volumen von 4 ml aufgefüllt. Nach einer Zentrifugation bei 2000 rpm entsteht ein Pellet, dessen Überstand vorsichtig durch eine Absaugpumpe entfernt wird. Die im Pellet zusammengelagerten Thrombozyten werden mit 250 µl des leicht sauren Tyrodes-Puffers behutsam resuspendiert und im Anschluss mit dem gleichen Volumen des zweiten Puffers, dessen pH-Wert bei 7,4 liegt, verdünnt. Um standardisierte Konzentration zu erreichen, wird eine Zellzählung vorgenommen (Sysmex Microcellcounter XE-2100, Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland) und die Thrombozyten-Lösung entsprechend mit physiologischem Tyrodes-Puffer eingestellt.

No.	23
Date	29/07/2009
Time	15:31
Mode	WB
WBC	! 0.0 × 10 <sup>3</sup> / µL
RBC	! 0.01 × 10 <sup>6</sup> / µL
HGB	! 0.0 g / dL
HCT	! 0.0%
MCV	---, -fL
MCH	---, -pg
MCHC	---, -g / dL
PLT	68 × 10 <sup>3</sup> / µL
LYM%	---, -%
MXD%	---, -%
NEUT%	---, -%
LYM#	---, - × 10 <sup>3</sup> / µL
MXD#	---, - × 10 <sup>3</sup> / µL
NEUT#	---, - × 10 <sup>3</sup> / µL
RDW_SD	---, -fL
RDW_CV	---, -%
PDW	- 6.2 fL
MPV	- 5.7 fL
P_LCR	- 2.9%

Abbildung 16: Beispiel einer Zellzählung muriner gewaschener Thrombozyten durch Sysmex Microcellcounter XE-2100

Für die murinen Experimente wird hauptsächlich eine Thrombozytenkonzentration von  $2 \times 10^8$  Zellen / ml verwendet. Für Versuche, die ein möglichst großes Volumen an isolierten Thrombozyten von demselben Versuchstier verlangen, wird ausnahmsweise eine Konzentration von  $1 \times 10^8$  Thrombozyten / ml eingesetzt.

#### Besonderheit bei BALB/c-Mäusen:

Bei der Präparation von Thrombozyten, die von Mäusen auf BALB/c -Hintergrund stammen, muss direkt vor dem zweiten Zentrifugationsvorgang Prostaglandin E1 (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA) hinzugefügt werden. Die Substanz ist bei einer Konzentration von  $2 \mu\text{M}$  in Ethanol gelöst und wird im Gefrierschrank bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Dadurch soll eine vorzeitige Aktivierung der Blutplättchen verhindert werden. Zu diesem Zweck werden  $5,7 \mu\text{l}$  zu  $4 \text{ ml}$  der Tyrodes-Plasma-Lösung gegeben. So wird eine Konzentration von  $3 \text{ nM}$  erreicht, die wahrscheinlich über die thrombozytäre IP-Rezeptoren antiaggregatorisch wirkt. [2] Das weitere Vorgehen entspricht dem oben beschriebenen.

Da Prostaglandin E1 eine sehr kurze Halbwertszeit von 30 Sekunden besitzt [60], ist von keiner Beeinflussung der Thrombozytenfunktion nach der Zentrifugation auszugehen.

#### 2.2.4 Versuchsaufbau und -durchführung

Für die Aggregometrie wurde das Modell „Platelet Aggregation Profiler PAP-8E“ der Firma BioData Corporation (Horsham, Pennsylvania, USA; Vertrieb durch MöLab GmbH, Langenfeld, Deutschland) verwendet.

Anzahl der Messkanäle	8
Rührgeschwindigkeit	1200 rpm
Temperatur	$37^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$
Lichtquelle	Light Emitting Diodes
Wellenlänge	400-430 nm

*Tabelle 3: Technische Daten des Gerätes „Platelet Aggregation Profiler PAP-8E“*

Die verwendeten Küvetten (silikonisiert; BioData Corporation, Horsham, Pennsylvania, USA; Vertrieb durch MöLab GmbH, Langenfeld, Deutschland) sind zur Messung eines Volumens von  $250 \mu\text{l}$  geeignet, wobei  $225 \mu\text{l}$  der eingesetzten Probe entsprechen.

Da das Gerät das turbimetrische Verfahren zu Aggregationsmessung anwendet, sind als Proben sowohl plättchenreiches Plasma als auch gewaschene Thrombozyten einsetzbar. Letztere werden für die nachfolgenden Versuche verwendet.

Bevor mit dem Experiment begonnen werden kann, ist eine Eichung des Gerätes nötig. Dies geschieht durch 250 µl des physiologischen Tyrodes-Puffers. Dieser wird zur Verdünnung aller Substanzen und der Plättchen verwendet. Er stellt somit den 100%-Punkt der Aggregationskurve dar. Die Probe kann nicht lichtdurchlässiger werden als der physiologische Tyrodes-Puffer.

225 µl der Probe werden am Rand der Küvette langsam mit Hilfe einer Pipette eingefüllt. Das Probenvolumen besteht aus 220,5 µl gewaschener Thrombozyten und je 2,25 µl 1 mM  $\text{CaCl}_2$ - (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) und  $\text{MgCl}_2$ -Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland). Da der verwendete Tyrodes-Puffer mit destilliertem Wasser hergestellt wird, sind diese Ionenlösungen nötig, um eine Aggregation zu ermöglichen.

Weitere Substanzen, beispielsweise Hemmstoffe in definierten Konzentrationen, werden sodann hinzugefügt und mit den Plättchen inkubiert. Ein kunststoffbeschichteter Rührstab (BioData Corporation, Horsham, Pennsylvania, USA; Vertrieb durch MöLab GmbH, Langenfeld, Deutschland) wird verwendet, um die Probe bei konstanter Geschwindigkeit in Bewegung zu halten. Luftblasen in der Küvette sollten unbedingt vermieden werden, da hierdurch die Messung verfälscht werden kann. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Küvetten auf die acht Kanäle verteilt, die Kanalreihe lichtdicht abgedeckt und die Messung gestartet. Anschließend wird auf dem Monitor geprüft, ob bereits eine Voraktivierung der Probe stattgefunden hat. Dies zeigt sich durch eine Aggregation der Zellen, ohne dass ein Plättchenagonist hinzugefügt wurde.

Ist dies nicht der Fall, kann mit dem eigentlichen Versuch begonnen werden. Dazu werden 2,5 µl eines Agonisten hinzugegeben. Es schließt sich eine siebenminütige photometrische Messung an.

Das Gerät erfasst folgende Parameter:

- Maximale Aggregation, gemessen in %
- Desaggregation
- Aggregation am Ende der Messung
- Steigung der Aggregationskurve, als Maß für die Aggregationsgeschwindigkeit
- Dauer der Plateauphase

Bei Auswertung der Versuchsdaten wird die maximale Aggregation verwendet.

Nach dem Messdurchgang werden die Küvetten entfernt. Vor dem Verwerfen sollten die Aggregate visuell überprüft werden. Eine Lyse der Thrombozytenmembran kann eine Aggregation vortäuschen, und würde auch einen typischen Kurvenverlauf zeigen, ohne dass sich Aggregate bilden. [11]

#### 2.2.5 verwendete Thrombozytenagonisten

Zur Aktivierung der Thrombozyten wurden zwei verschiedene Agonisten verwendet: Thrombin und Kollagen. Beide Substanzen werden verdünnt oder unverdünnt in einem Volumen von 2,5 µl während der Messung zugesetzt.

Thrombin (1000 U/ml; aus bovinem Plasma; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) gilt als stärkstes Aggreganz. Es sollte nur in Verbindung mit gewaschenen Thrombozyten eingesetzt werden. Durch das Vorhandensein von Fibrinogen im plättchenreichen Plasma würde es zu Bildung von Fibrin-Vernetzungen kommen, die thrombozytäre Aggregate vortäuschen könnten. Es sind Konzentrationen von 0,1 -0,5 U/ml möglich. [11], [44], [65]

In den nachfolgenden Versuchen wurden 0,2 U/ml angewandt. Diese Konzentration wird erzielt durch eine Verdünnung der Ausgangslösung im Verhältnis 1:5 mit physiologischem Tyrodes-Puffer.

Kollagen (Chrono-Par Collagen, Probe & go Labordiagnostica GmbH, Osburg, Deutschland) kann in einem Konzentrationsbereich von 0,5 µg/ml bis 20 µg/ml eingesetzt werden. Die Angaben unterscheiden sich je nach Hersteller und Verwendung von gewaschenen Thrombozyten oder plättchenreichem Plasma. [11], [44], [65]

In den folgenden Experimenten wurden 2 µg/ml und 10 µg/ml Kollagen verwendet. Dazu kann fertig gelöstes Kollagen 1:5 verdünnt mit physiologischem Tyrodes-Puffer bzw. unverdünnt eingesetzt werden.

## 2.3 Versuchsprotokolle und experimentelle Gruppen

### 2.3.1 humane Versuche

#### 2.3.1.1 Einfluss von FTY 720 auf die Thrombozytenaggregation

##### Konzentrationsreihen mit FTY 720:

Um den Effekt von FTY 720 auf die Aggregation und damit auf die Gerinnung zu analysieren, werden menschliche Thrombozyten mit der Substanz inkubiert.

Dazu werden die Thrombozyten von sechs Spendern wie oben beschrieben präpariert. Anschließend werden 225 µl der Zellen jedes Spenders für 20 Minuten mit sechs verschiedenen Konzentrationen von FTY 720 inkubiert.

Als Kontrolle dient das Lösungsmittel DMSO, das in der höchsten verwendeten Konzentration eingesetzt wird, und eine Probe, die nur die Thrombozyten und den physiologischen Tyrodes-Puffer enthält.

Zur Stimulation dienen zwei unterschiedliche Kollagenkonzentrationen.

<u>Versuchsbedingungen:</u>	
Inkubationszeit	20 Minuten
<u>Messansätze:</u>	
FTY 720	10 µM
FTY 720	20 µM
FTY 720	50 µM
FTY 720	100 µM
FTY 720	200 µM
FTY 720	500 µM
DMSO	Verdünnung entspricht [FTY 720] 500 µM
Tyrodes-Puffer (pH 7,4)	Kontrolle
<u>Aggregantien:</u>	
Kollagen	10 µg/ml
Kollagen	2 µg/ml

*Tabelle 4: Schematischer Versuchsaufbau der Konzentrationsreihe von FTY 720 mit humanen Thrombozyten*

Um zu zeigen, dass der Effekt von FTY 720 auf die Thrombozytenfunktion auch bei anderen Aggregantien nachweisbar ist, werden beispielhaft drei verschiedene FTY 720-Konzentrationen mit deren zugehöriger DMSO-Kontrolle durch zwei unterschiedliche Stimulantien zu Aggregation gebracht.

Die Thrombozyten stammen in diesem Fall von vier humanen Spendern.

<u>Versuchsbedingungen:</u>	
Inkubationszeit	20 Minuten
<u>Messansätze:</u>	
FTY 720	10 $\mu$ M
FTY 720	100 $\mu$ M
FTY 720	1 mM
DMSO	Verdünnung entspricht [FTY 720] 10 $\mu$ M
DMSO	Verdünnung entspricht [FTY 720] 100 $\mu$ M
DMSO	Verdünnung entspricht [FTY 720] 1 mM
<u>Aggregantien:</u>	
Kollagen	10 $\mu$ g/ml
Thrombin	0,2 U/ml

*Tabelle 5: Schematischer Versuchsaufbau des Vergleichs von Kollagen und Thrombin auf die Aggregation humaner Thrombozyten mit FTY 720*

#### Die Wirkung von FTY 720 im Zeitverlauf:

Um den Einfluss von FTY 720 auf die Thrombozyten genauer zu verstehen, wird die Wirkungsänderung im Zeitverlauf untersucht.

Dazu werden humane Thrombozyten (n = 12) unterschiedlich lange mit einer konstanten FTY 720-Konzentration inkubiert. Zunächst wird eine Zeitspanne von 0 Minuten, also ohne Vorinkubation, bis 20 Minuten Inkubation analysiert.

Als Kontrolle werden Blutplättchen eingesetzt, die 20 Minuten mit physiologischem Tyrodes-Puffer versetzt sind.

<u>Messansätze:</u>	
FTY 720 20 µM	Ohne Vorinkubation = 0 Minuten
FTY 720 20 µM	5 Minuten
FTY 720 20 µM	10 Minuten
FTY 720 20 µM	20 Minuten
Kontrolle; Tyrodes-Puffer (pH 7,4)	20 Minuten
<u>Aggreganz:</u>	
Kollagen	10 µg/ml

*Tabelle 6: Schematischer Versuchsaufbau der FTY 720-Wirkung auf humane Thrombozyten im 20-minütigen Zeitverlauf*

In einem zweiten Versuch (n = 12) wird die Inkubationszeit auf 60 Minuten verlängert.

Die Kontrolle stellen Thrombozyten dar, die ebenfalls 60 Minuten mit Tyrodes-Puffer versetzt sind.

<u>Messansätze:</u>	
FTY 720 20 µM	Ohne Vorinkubation = 0 Minuten
FTY 720 20 µM	20 Minuten
FTY 720 20 µM	20 Minuten
FTY 720 20 µM	60 Minuten
Kontrolle; Tyrodes-Puffer (pH 7,4)	60 Minuten
<u>Aggreganz:</u>	
Kollagen	10 µg/ml

*Tabelle 7: Schematischer Versuchsaufbau der FTY 720-Wirkung auf humane Thrombozyten im 60-minütigen Zeitverlauf*

Entscheidend für die Verwertbarkeit der Ergebnisse ist bei diesem Versuch, dass alle Messungen einer Messreihe vom gleichen Spender stammen und zum gleichen Zeitpunkt entnommen wurden. Somit handelt es sich um Thrombozyten, die sich gleich lange außerhalb des Körpers befanden, identischen Bedingungen ausgesetzt waren und theoretisch über dasselbe Aggregationsvermögen verfügen. Also werden alle Proben einer Messreihe gleichzeitig nach 20 Minuten

bzw. 60 Minuten gemessen. Der einzige Unterschied zwischen den Proben liegt in den verschiedenen Inkubationszeiten mit FTY 720. Dadurch soll eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine generell schlechtere Aktivierbarkeit nach 20 Minuten bzw. 60 Minuten im Puffermilieu verhindert werden.

#### 2.3.1.2 Rolle der S1P<sub>2</sub>-Rezeptoren für die Aggregationshemmung durch FTY 720

Um einen möglichen Rezeptor, über den die FTY 720-Wirkung vermittelt wird, zu ermitteln, werden die Plättchen zuerst mit dem S1P<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten JTE-013 inkubiert und anschließend mit dem Sphingosinanalogen FTY 720 inkubiert. Die Inkubationszeit des Antagonisten beträgt 10 Minuten, wobei die Konzentrationen 1 µM und 100 nM eingesetzt werden. Der Agonist wird 5 Minuten später hinzugefügt und inkubiert damit 5 Minuten.

Zwei unterschiedliche Kontrollen werden für diesen Versuch verwendet:

Als erste Kontrolle dienen Blutplättchen, die mit Tyrodes-Puffer pH 7,4 für 10 Minuten inkubiert werden. Nach 5 Minuten wird dann FTY 720 hinzugefügt. Diese Kontrolle zeigt die Aggregationshemmung durch FTY 720 ohne Einfluss des Antagonisten.

Als zweite Kontrolle wird ein Teil der Thrombozyten allein mit physiologischem Tyrodes-Puffer für 10 Minuten versetzt, um das Aggregationsvermögen der verwendeten Thrombozyten zu testen.

#### Versuch zur Austestung des Effekts von JTE-013 auf die Aggregation

Um zu testen, ob der S1P-Rezeptorantagonist JTE-013 selbst einen Einfluss auf die Thrombozytenaggregation hat, werden zunächst humane Plättchen (n = 2) alleine mit dieser Substanz inkubiert und durch Kollagen stimuliert.

Die Inkubationszeit beträgt 10 Minuten, wie in den anschließenden Versuchen mit JTE-013.

Als Kontrolle werden die Thrombozyten mit DMSO inkubiert, das in derselben Verdünnung vorliegt wie in den Proben mit JTE-013. Dadurch kann der Effekt des Antagonisten, ohne den Einfluss des Lösungsmittels beurteilt werden.

<u>Versuchsbedingungen:</u>	
Inkubationszeit	10 Minuten
<u>Messansätze:</u>	
JTE-013	100 nM
JTE-013	1 $\mu$ M
JTE-013	10 $\mu$ M
JTE-013	100 $\mu$ M
DMSO	Verdünnung entspricht [JTE-013] 100 nM
DMSO	Verdünnung entspricht [JTE-013] 1 $\mu$ M
DMSO	Verdünnung entspricht [JTE-013] 10 $\mu$ M
DMSO	Verdünnung entspricht [JTE-013] 100 $\mu$ M
<u>Aggreganz:</u>	
Kollagen	10 $\mu$ g/ml

*Tabelle 8: Versuchsparemeter bei Inkubation humaner Thrombozyten mit JTE-013*

#### Versuch mit JTE-013 und FTY 720 20 $\mu$ M

In einem ersten Versuch werden die Thrombozyten von sechs (n = 6) humanen Spendern mit 20  $\mu$ M FTY 720 inkubiert.

<u>Messansätze:</u>		
JTE-013 1 $\mu$ M (10 Min.)	plus	FTY 720 20 $\mu$ M (5 Min.)
JTE-013 100 nM (10 Min.)	plus	FTY 720 20 $\mu$ M (5 Min.)
Kontrolle; Tyrodes-Puffer (pH 7,4)	plus	FTY 720 20 $\mu$ M (5 Min.)
Kontrolle; Tyrodes-Puffer (pH 7,4)		
<u>Aggreganz:</u>		
Kollagen		10 $\mu$ g/ml

*Tabelle 9: Versuchsparemeter der Inkubation humaner Thrombozyten mit JTE-013 und 20  $\mu$ M FTY 720*

#### Versuch mit JTE-013 und FTY 720 100 $\mu$ M

Im zweiten Versuch (n = 12) wird der Effekt von JTE-013 auf die FTY 720-Wirkung durch eine höhere Konzentration von 100  $\mu$ M überprüft.

Durch diese höhere Konzentration von FTY 720 sollen mehr Rezeptoren durch den S1P-Rezeptoragonisten besetzt und die Aggregationshemmung stärker werden.

<u>Messansätze:</u>		
JTE-013 1 $\mu$ M (10 Min.)	plus	FTY 720 100 $\mu$ M (5 Min.)
JTE-013 100 nM (10 Min.)	plus	FTY 720 100 $\mu$ M (5 Min.)
Kontrolle; Tyrodes-Puffer (pH 7,4)	plus	FTY 720 100 $\mu$ M (5 Min.)
Kontrolle; Tyrodes-Puffer (pH 7,4)		
<u>Aggreganz:</u>		
Kollagen		10 $\mu$ g/ml

*Tabelle 10: Versuchsparmeter der Inkubation humaner Thrombozyten mit JTE-013 und 100  $\mu$ M FTY 720*

### 2.3.1.3 Rolle der S1P<sub>1</sub>- und S1P<sub>3</sub>-Rezeptoren für die Aggregationshemmung durch FTY 720

Um den möglichen Rezeptor zu ermitteln, der die Aggregationshemmung von FTY 720 vermittelt, werden die Plättchen mit dem S1P<sub>1</sub>- und S1P<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten VPC 23019 und mit FTY 720 inkubiert.

Der Antagonist wird 10 Minuten vor der Messung zu den Thrombozyten gegeben, wobei die Konzentrationen 10  $\mu$ M und 1  $\mu$ M eingesetzt werden. Der Agonist, also FTY 720, wird 5 Minuten später hinzugefügt und inkubiert damit 5 Minuten.

Als Kontrolle dienen zwei unterschiedliche Ansätze:

Die erste Kontrolle sind Thrombozyten, die mit Tyrodes-Puffer pH 7,4 für 10 Minuten inkubiert werden. Nach 5 Minuten wird dann FTY 720 für weitere 5 Minuten hinzugefügt. Diese Kontrolle zeigt die Aggregationsfähigkeit ohne Einfluss des Antagonisten.

Für die zweite Kontrolle wird ein Teil der Thrombozyten allein mit physiologischem Tyrodes-Puffer versetzt, um das Aggregationsvermögen der verwendeten Thrombozyten zu testen.

### Versuch zur Austestung des Effekts von VPC 23019 auf die Aggregation

Um zu testen, ob der S1P<sub>1</sub>- und S1P<sub>3</sub>-Rezeptorantagonist VPC 23019 die Thrombozytenaggregation beeinflusst, werden Thrombozyten (n = 2) mit dieser Substanz inkubiert und durch Kollagen stimuliert.

Die Inkubationszeit beträgt 10 Minuten.

Als Kontrolle werden die Thrombozyten mit DMSO und 3%-wässriger Lösung von bovinem Serumalbumin versetzt, das in derselben Verdünnung vorliegt wie in den Proben mit VPC 23019. Dadurch kann der Effekt des Antagonisten, ohne den Einfluss des Lösungsmittels beurteilt werden.

<u>Messansätze:</u>	
VPC 23019	100 nM
VPC 23019	1 µM
VPC 23019	10 µM
VPC 23019	60 µM
DMSO + 3% BSA-Lösung	Verdünnung entspricht [VPC 23019] 100 nM
DMSO + 3% BSA-Lösung	Verdünnung entspricht [VPC 23019] 1 µM
DMSO + 3% BSA-Lösung	Verdünnung entspricht [VPC 23019] 10 µM
DMSO + 3% BSA-Lösung	Verdünnung entspricht [VPC 23019] 60 µM
<u>Aggreganz:</u>	
Kollagen	10 µg/ml

*Tabelle 11: Versuchsparameter bei Inkubation humaner Thrombozyten mit VPC 23019*

### Versuch mit VPC 23019 und FTY 20 µM

Im ersten Versuch werden die Thrombozyten von vierzehn (n = 14) humanen Spendern mit VPC 23019 und 20 µM FTY 720 inkubiert.

<u>Messansätze:</u>		
VPC 23019 10 µM (10 Min.)	plus	FTY 720 20 µM (5 Min.)
VPC 23019 1 µM (10 Min.)	plus	FTY 720 20 µM (5 Min.)
Kontrolle; Tyrodes-Puffer (pH 7,4)	plus	FTY 720 20 µM (5 Min.)
Kontrolle; Tyrodes-Puffer (pH 7,4)		
<u>Aggreganz:</u>		
Kollagen		10 µg/ml

*Tabelle 12: Versuchsparmeter der Inkubation humaner Thrombozyten mit VPC 23019 und 20 µM FTY 720*

#### Versuch mit VPC 23019 und FTY 100 µM

In einem zweiten Versuch (n = 9) wird die Konzentration von FTY 720 auf 100 µM gesteigert. Damit wird die Anzahl der Rezeptoren, die durch das Molekül besetzt sind, erhöht und die Aggregation stärker gehemmt.

Die übrigen Versuchsparmeter bleiben unverändert.

<u>Messansätze:</u>		
VPC 23019 10 µM (10 Min.)	plus	FTY 720 100 µM (5 Min.)
VPC 23019 1 µM (10 Min.)	plus	FTY 720 100 µM (5 Min.)
Kontrolle; Tyrodes-Puffer (pH 7,4)	plus	FTY 720 100 µM (5 Min.)
Kontrolle; Tyrodes-Puffer (pH 7,4)		
<u>Aggreganz:</u>		
Kollagen		10 µg/ml

*Tabelle 13: Versuchsparmeter der Inkubation humaner Thrombozyten mit VPC 23019 und 100 µM FTY 720*

#### 2.3.1.4 Einfluss von Sphingosin auf die Thrombozytenaggregation

##### Konzentrationsreihe mit Sphingosin:

Um festzustellen, ob Sphingosin, das in Zellmembranen vorkommt, die Aggregation hemmen kann, werden humane Thrombozyten von sechs Spendern

für 5 Minuten mit dieser Substanz inkubiert. Dabei werden Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  getestet.

Als Kontrolle werden die Zellen mit der DMSO-Verdünnung, die auch bei Sphingosin 100  $\mu\text{M}$  verwendet wird, inkubiert. Die Inkubationszeit beträgt 5 Minuten.

<u>Versuchsbedingungen:</u>	
Thrombozyten-Konzentration	2 x 10 <sup>8</sup> / ml
<u>Messansätze:</u>	
Sphingosin	1 $\mu\text{M}$
Sphingosin	5 $\mu\text{M}$
Sphingosin	10 $\mu\text{M}$
Sphingosin	50 $\mu\text{M}$
Sphingosin	100 $\mu\text{M}$
DMSO	Verdünnung entspricht [Sphingosin] 100 $\mu\text{M}$
Kontrolle; Tyrodes-Puffer (pH 7,4)	
<u>Aggreganz:</u>	
Kollagen	10 $\mu\text{g/ml}$

*Tabelle 14: Versuchsparmeter der Konzentrationsreihe von Sphingosin und humaner Thrombozyten*

#### Die Wirkung von Sphingosin im Zeitverlauf:

Um zu untersuchen, wie sich der Effekt von Sphingosin durch unterschiedliche Inkubationszeiten ändert, werden humane Thrombozyten (n = 12) nicht vorinkubiert bzw. über einen Zeitraum bis 20 Minuten mit der Substanz inkubiert. Durch eine Veränderung der Wirkung im Zeitverlauf können Rückschlüsse auf einen Wirkmechanismus ermöglicht werden.

Als Kontrolle dienen Thrombozyten, die mit Tyrodes-Puffer (pH 7,4) für 20 Minuten versetzt werden, um ihre allgemeine Aggregationsfähigkeit zu prüfen.

<u>Messansätze:</u>	
Sphingosin 5 $\mu$ M	Ohne Vorinkubation = 0 Minuten
Sphingosin 5 $\mu$ M	5 Minuten
Sphingosin 5 $\mu$ M	10 Minuten
Sphingosin 5 $\mu$ M	20 Minuten
Kontrolle; Tyrodes-Puffer (pH 7,4)	20 Minuten
<u>Aggreganz:</u>	
Kollagen	10 $\mu$ g/ml

*Tabelle 15: Schematischer Versuchsaufbau der Sphingosin-Wirkung auf humane Thrombozyten im 20-minütigen Zeitverlauf*

### 2.3.1.5 Einfluss von S1P auf die Thrombozytenaggregation

#### Konzentrationsreihe S1P:

Im nächsten Experiment wird untersucht, ob die phosphorylierte Form des Sphingosin, also S1P, einen ähnlichen Effekt zeigt, wie die unphosphorylierte Form und FTY 720. Die beiden letzten Substanzen müssen noch phosphoryliert werden, bevor sie an die S1P-Rezeptoren binden können, während das bei S1P direkt möglich ist.

Dazu werden zunächst verschiedene Konzentrationen von S1P getestet, beginnend bei 1  $\mu$ M bis zu 100  $\mu$ M mit humanen Thrombozyten von sechs (n = 6) humanen Spendern.

Die Inkubationszeit beträgt bei diesem Versuch 5 Minuten.

Als Kontrolle werden Thrombozyten mit physiologischem Tyrodes-Puffer eingesetzt, um zu zeigen wie stark diese, ohne den Einfluss von S1P, aggregieren.

<u>Versuchsbedingungen:</u>	
Inkubationszeit	5 Minuten
<u>Messansätze:</u>	
S1P	1 $\mu\text{M}$
S1P	10 $\mu\text{M}$
S1P	50 $\mu\text{M}$
S1P	100 $\mu\text{M}$
Morpholine und Methanol	Verdünnung entspricht [S1P] 100 $\mu\text{M}$
Kontrolle; Tyrodes-Puffer (pH 7,4)	
<u>Aggreganz:</u>	
Kollagen	10 $\mu\text{g/ml}$

*Tabelle 16: Versuchsparmeter der Konzentrationsreihe von S1P und humanen Thrombozyten*

Die Wirkung von S1P im Zeitverlauf:

Um Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus von S1P ziehen zu können, werden die humanen Thrombozyten (n = 10) mit einer konstanten S1P-Konzentration unter variierenden Inkubationszeiten versetzt. Dabei werden die Zeiten zwischen 0 und 20 Minuten untersucht.

Das Aggregationsvermögen der Zellen wird durch ein Hinzufügen von Tyrodes-Puffer zur Probe kontrolliert.

<u>Messansätze:</u>	
S1P 50 $\mu\text{M}$	Ohne Vorinkubation = 0 Minuten
S1P 50 $\mu\text{M}$	5 Minuten
S1P 50 $\mu\text{M}$	10 Minuten
S1P 50 $\mu\text{M}$	20 Minuten
Kontrolle; Tyrodes-Puffer (pH 7,4)	20 Minuten
<u>Aggreganz:</u>	
Kollagen	10 $\mu\text{g/ml}$

*Tabelle 17: Schematischer Versuchsaufbau der S1P-Wirkung auf humane Thrombozyten im 20-minütigen Zeitverlauf*

### 2.3.1.6 Rolle der S1P<sub>2</sub>-Rezeptoren für die Aggregationshemmung durch S1P

Zur Prüfung, welcher der S1P-Rezeptoren die Wirkung von S1P auf die Thrombozyten vermittelt, werden die Zellen mit dem S1P<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten, JTE-013 1  $\mu$ M und 100 nM, inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wird S1P hinzugefügt und nochmals 5 Minuten inkubiert, so dass die gesamte Zeit nach Zugabe des Antagonisten bis zur Messung 10 Minuten beträgt.

Zwei unterschiedliche Kontrollen werden für diesen Versuch eingesetzt:

Zum einen Blutplättchen, die mit Tyrodes-Puffer pH 7,4 für 10 Minuten inkubiert werden. Nach 5 Minuten wird dann S1P hinzugefügt. Diese Kontrolle zeigt die Aggregationsfähigkeit unter Einfluss von S1P in Abwesenheit des Antagonisten.

Zum zweiten wird ein Teil der Thrombozyten allein mit physiologischem Tyrodes-Puffer für 10 Minuten versetzt, um das Aggregationsvermögen der verwendeten Thrombozyten zu testen.

Durch den unter 2.3.1.2 beschriebenen Versuch, in dem Thrombozyten allein mit JTE-013 inkubiert werden, wird der Einfluss des Antagonisten auf die Aggregation getestet.

#### Versuch mit JTE-013 und S1P 50 $\mu$ M

Zunächst wird S1P in einer Konzentration von 50  $\mu$ M fünf Minuten nach Zugabe des Antagonisten JTE-013 zu den Thrombozyten (n = 6) gefügt.

<u>Messansätze:</u>		
JTE-013 1 $\mu$ M (10 Min.)	plus	S1P 50 $\mu$ M (5 Min.)
JTE-013 100 nM (10 Min.)	plus	S1P 50 $\mu$ M (5 Min.)
Kontrolle; Tyrodes-Puffer (pH 7,4)	plus	S1P 50 $\mu$ M (5 Min.)
Kontrolle; Tyrodes-Puffer (pH 7,4)		
<u>Aggreganz:</u>		
Kollagen		10 $\mu$ g/ml

*Tabelle 18: Versuchparameter der Inkubation humaner Thrombozyten mit JTE-013 und 50  $\mu$ M S1P*

### Versuch mit JTE-013 und S1P 100 $\mu$ M

In einem zweiten Versuch ( $n = 11$ ) wird die S1P-Konzentration auf 100  $\mu$ M verdoppelt, da dadurch eine deutlichere Aggregationshemmung durch die Substanz zu erwarten ist und mehr Moleküle an den Rezeptor binden können.

Die restlichen Parameter bleiben unverändert.

<u>Messansätze:</u>		
JTE-013 1 $\mu$ M (10 Min.)	plus	S1P 100 $\mu$ M (5 Min.)
JTE-013 100 nM (10 Min.)	plus	S1P 100 $\mu$ M (5 Min.)
Kontrolle; Tyrodes-Puffer (pH 7,4)	plus	S1P 100 $\mu$ M (5 Min.)
Kontrolle; Tyrodes-Puffer (pH 7,4)		
<u>Aggreganz:</u>		
Kollagen		10 $\mu$ g/ml

*Tabelle 19: Versuchsparmeter der Inkubation humaner Thrombozyten mit JTE-013 und 100  $\mu$ M S1P*

#### 2.3.1.7 Rolle der S1P<sub>1</sub>- und S1P<sub>3</sub>-Rezeptoren für die Aggregationshemmung durch S1P

Um den Einfluss der S1P<sub>1</sub>- und S1P<sub>3</sub>-Rezeptoren auf die Wirkung von S1P auf Thrombozyten zu testen, werden diese durch VPC 23019 blockiert. Diese Substanz ist ein Antagonist an den Rezeptoren und wird den Thrombozyten 5 Minuten vor Zugabe von S1P hinzugefügt. Nach Ablauf dieser Zeit werden die Zellen zusätzlich mit S1P versetzt und wiederum 5 Minuten inkubiert, so dass der Antagonist insgesamt 10 Minuten, der Agonist 5 Minuten wirkt.

Als Kontrolle dienen zwei unterschiedliche Ansätze:

Die erste Kontrolle sind Blutplättchen, die mit Tyrodes-Puffer (pH 7,4) für 10 Minuten inkubiert werden. Nach 5 Minuten wird dann S1P für weitere 5 Minuten hinzugefügt. Diese Kontrolle zeigt die Aggregationshemmung durch S1P ohne Einfluss des Antagonisten.

Für die zweite Kontrolle wird ein Teil der Thrombozyten allein mit physiologischem Tyrodes-Puffer versetzt, um das Aggregationsvermögen der verwendeten Thrombozyten zu testen.

Durch den unter 2.3.1.3 beschriebenen Versuch, in dem Thrombozyten mit VPC 23019 inkubiert werden, wird der Einfluss des Antagonisten auf die Aggregation geprüft.

#### Versuch mit VPC 23019 und S1P 50 $\mu$ M

Für den ersten Versuch ( $n = 6$ ) werden die Thrombozyten mit 50  $\mu$ M S1P inkubiert. Dies ist eine Konzentration, die eine relativ geringe Aggregationshemmung hervorruft.

<u>Messansätze:</u>		
VPC 23019 10 $\mu$ M (10 Min.)	plus	S1P 50 $\mu$ M (5 Min.)
VPC 23019 1 $\mu$ M (10 Min.)	plus	S1P 50 $\mu$ M (5 Min.)
Kontrolle; Tyrodes-Puffer (pH 7,4)	plus	S1P 50 $\mu$ M (5 Min.)
Kontrolle; Tyrodes-Puffer (pH 7,4)		
<u>Aggreganz:</u>		
Kollagen		10 $\mu$ g/ml

*Tabelle 20: Versuchsparmeter der Inkubation humaner Thrombozyten mit VPC 23019 und 50  $\mu$ M S1P*

#### Versuch mit VPC 23019 und S1P 100 $\mu$ M

Im zweiten Versuch ( $n = 6$ ) wurde die S1P-Konzentration verdoppelt. Bei 100  $\mu$ M können deutlich mehr S1P-Moleküle an ihren Rezeptor binden. Die restlichen Parameter des Versuchs werden nicht verändert.

<u>Messansätze:</u>		
VPC 23019 10 $\mu$ M (10 Min.)	plus	S1P 100 $\mu$ M (5 Min.)
VPC 23019 1 $\mu$ M (10 Min.)	plus	S1P 100 $\mu$ M (5 Min.)
Kontrolle; Tyrodes-Puffer (pH 7,4)	plus	S1P 100 $\mu$ M (5 Min.)
Kontrolle; Tyrodes-Puffer (pH 7,4)		
<u>Aggreganz:</u>		
Kollagen		10 $\mu$ g/ml

*Tabelle 21: Versuchsparmeter der Inkubation humaner Thrombozyten mit VPC 23019 und 100  $\mu$ M S1P*

## 2.3.2 Versuche mit Mäusen auf BALB/c-Hintergrund

### 2.3.2.1 Rolle der SphK-1 und SphK-2 für die Aggregation mit FTY 720

FTY 720 wird durch die SphK-2 phosphoryliert, bevor es an die S1P-Rezeptoren binden kann. Diese Reaktion kann nicht durch das Isoenzym SphK-1 katalysiert werden. Deshalb ist es von besonderem Interesse, ob ein Ausschalten eines der beiden Isoenzyme zu einer Veränderung der FTY 720-Wirkung führt.

Um diese Frage zu beantworten, ist ein Tiermodell hilfreich. Hierzu werden drei verschiedenen Spendertiergruppen Blut durch kardiale Punktion entnommen: SphK-1-KO-, SphK-2-KO- und den SphK-1,2-WT-Mäusen. Der genetische Hintergrund aller Gruppen in diesem Versuch ist BALB/c. Phänotypisch handelt es sich um unauffällige, weiße Mäuse.

Nach der regulären Präparation der Thrombozyten werden diese anschließend mit FTY 720 für 20 Minuten inkubiert.

Als Kontrolle dient dieselbe DMSO-Verdünnung, wie sie auch bei den Proben mit FTY 720 verwendet wird. Im Nachhinein kann so die Aggregationshemmung die allein durch FTY 720 verursacht wird, beurteilt werden, unabhängig vom Lösungsmittel DMSO.

Die Stimulation erfolgt mit 10 µg/ml Kollagen.

### Versuch mit FTY 720 50 µM

Im ersten Versuch werden die Thrombozyten mit einer Konzentration von 50 µM inkubiert.

	<u>SphK-1-KO</u>		<u>SphK-2-KO</u>		<u>SphK-1,2-WT</u>	
<u>Anzahl</u>	n = 21		n = 11		n = 13	
<u>Geschlecht</u>	sex-matched		sex-matched		sex-matched	
<u>Alter</u>	12 bis 22 Wochen		8 bis 22 Wochen		8 bis 15 Wochen	
<u>Thrombozyten-konzentration</u>	2 x 10 <sup>8</sup> / ml		2 x 10 <sup>8</sup> / ml		2 x 10 <sup>8</sup> / ml	
<u>Substanz</u>	FTY 720	DMSO	FTY 720	DMSO	FTY 720	DMSO
Konzentration	50 µM	entspricht 50 µM	50 µM	entspricht 50 µM	50 µM	entspricht 50 µM

*Tabelle 22: Versuchsparmeter bei Inkubation der Thrombozyten von SphK-1-KO, SphK-2-KO und SphK-1,2-WT mit FTY 720 50 µM*

### Versuch mit FTY 720 100 µM

In einem zweiten Versuch wird die Konzentration auf 100 µM erhöht.

	<u>SphK-1-KO</u>		<u>SphK-2-KO</u>		<u>SphK-1,2-WT</u>	
<u>Anzahl</u>	n = 11		n = 10		n = 13	
<u>Geschlecht</u>	sex-matched		sex-matched		sex-matched	
<u>Alter</u>	12 bis 22 Wochen		8 bis 22 Wochen		8 bis 15 Wochen	
<u>Thrombozyten-konzentration</u>	2 x 10 <sup>8</sup> / ml		2 x 10 <sup>8</sup> / ml		2 x 10 <sup>8</sup> / ml	
<u>Substanz</u>	FTY 720	DMSO	FTY 720	DMSO	FTY 720	DMSO
Konzentration	100 µM	entspricht 100 µM	100 µM	entspricht 100 µM	100 µM	entspricht 100 µM

*Tabelle 23: Versuchsparmeter bei Inkubation der Thrombozyten von SphK-1-KO, SphK-2-KO und SphK-1,2-WT mit FTY 720 100 µM*

### 2.3.2.2 Einfluss von 100 $\mu\text{M}$ FTY 720 auf die Aggregation von SphK-KO und SphK-1,2-WT bei Variation der Inkubationszeiten

Im folgenden Versuch werden verschiedene Versuchstiergruppen untersucht: SphK-2-KO, SphK-1-KO und SphK-1,2-WT. Die Thrombozyten der Tiergruppen werden mit FTY 720 100  $\mu\text{M}$  inkubiert.

Die Proben unterscheiden sich durch verschiedene Inkubationszeiten: Je eine Untergruppe wird direkt nach Zugabe des S1P-Analogons bzw. nach 5 Minuten, 10 Minuten und 20 Minuten Inkubationszeit der aggregometrischen Messung unterzogen.

Als Kontrolle werden Thrombozyten eingesetzt, die 20 Minuten mit physiologischem Tyrodes-Puffer versetzt waren.

Die Stimulation der Thrombozyten geschieht durch Kollagen in der Konzentration 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Wie bereits bei den humanen Versuchen, die eine Aggregationsfähigkeit über einen längeren Zeitraum prüfen, erwähnt, ist es auch hier von entscheidender Bedeutung, dass alle Messungen gleichzeitig nach 20 Minuten stattfinden. So soll eine Verfälschung der Ergebnisse durch unterschiedliche Wartezeit bis zur Messung verhindert werden.

Zunächst wird der Versuch mit  $1 \times 10^8$  / ml Thrombozyten, die von SphK-2-KO und SphK-1,2-WT stammen, durchgeführt.

<u>Versuchsbedingungen:</u>	
Thrombozyten-Konzentration	1 x 10 <sup>8</sup> / ml
<u>Messansätze:</u>	
<i>SphK-2-KO</i>	n = 4; sex-matched; 8-20 Wochen
FTY 720 100 µM	Ohne Vorinkubation = 0 Minuten
FTY 720 100 µM	5 Minuten
FTY 720 100 µM	10 Minuten
FTY 720 100 µM	20 Minuten
Tyrodes-Puffer pH 7,4	20 Minuten
<i>SphK-1,2-WT</i>	n = 2; sex-matched; 8-20 Wochen
FTY 720 100 µM	Ohne Vorinkubation = 0 Minuten
FTY 720 100 µM	5 Minuten
FTY 720 100 µM	10 Minuten
FTY 720 100 µM	20 Minuten
Tyrodes-Puffer pH 7,4	20 Minuten
<u>Aggreganz:</u>	
Kollagen	10 µg/ml

*Tabelle 24: Versuchsparemeter bei Inkubation von Thrombozyten von SphK-2-KO und SphK-1,2-WT mit FTY 720 über eine Zeit von 0 bis 20 Minuten*

In einem zweiten Versuch wird die Thrombozyten-Konzentration auf  $2 \times 10^8$  / ml erhöht und das thrombozytäre Aggregationsvermögen bei SphK-2-KO-, SphK-1-KO- und SphK-1,2-WT-Mäusen untersucht.

<u>Versuchsbedingungen:</u>	
Thrombozyten-Konzentration	$2 \times 10^8$ / ml
<u>Messansätze:</u>	
<i>SphK-2-KO</i>	n = 10; sex-matched; 8-20 Wochen
FTY 720 100 $\mu$ M	Ohne Vorinkubation = 0 Minuten
FTY 720 100 $\mu$ M	10 Minuten
FTY 720 100 $\mu$ M	20 Minuten
Tyrodes-Puffer pH 7,4	20 Minuten
<i>SphK-1-KO</i>	n = 12; sex-matched; 8-20 Wochen
FTY 720 100 $\mu$ M	Ohne Vorinkubation = 0 Minuten
FTY 720 100 $\mu$ M	10 Minuten
FTY 720 100 $\mu$ M	20 Minuten
Tyrodes-Puffer pH 7,4	20 Minuten
<i>SphK-1,2-WT</i>	n = 9; sex-matched; 8-20 Wochen
FTY 720 100 $\mu$ M	Ohne Vorinkubation = 0 Minuten
FTY 720 100 $\mu$ M	10 Minuten
FTY 720 100 $\mu$ M	20 Minuten
Tyrodes-Puffer pH 7,4	20 Minuten
<u>Aggreganz:</u>	
Kollagen	10 $\mu$ g/ml

*Tabelle 25: Versuchsparmeter bei Inkubation von Thrombozyten von SphK-1-KO, SphK-2-KO und SphK-1,2-WT mit FTY 720 über eine Zeit von 0 bis 20 Minuten*

### 2.3.3 Versuche mit Mäusen auf C57Bl6-Hintergrund

#### 2.3.3.1 Rolle des S1P<sub>4</sub>-Rezeptors für die Aggregation mit FTY 720

In den vorhergehenden Versuchen mit humanen Thrombozyten, die in 2.3.1.2 und 2.3.1.3 beschrieben sind, wurde versucht die Rolle der S1P<sub>1</sub>-, S1P<sub>2</sub>- und S1P<sub>3</sub>-Rezeptoren für die Aggregationshemmung durch FTY 720 zu klären.

Eine Überprüfung der Rolle des S1P<sub>4</sub>-Rezeptors für den Wirkmechanismus lässt sich durch ein Mausmodell verwirklichen. Dazu werden Thrombozyten von S1P<sub>4</sub>-KO-Mäusen und dem S1P-Rezeptor-WT, die beide einen C57Bl6-Hintergrund besitzen, isoliert. Diese Zellen werden dann mit FTY 720 inkubiert und nach 20 Minuten mit Kollagen zur Aggregation angeregt.

Als Kontrolle werden die Thrombozyten der beiden Tierstämme mit DMSO in derselben Verdünnung versetzt, so dass man Rückschlüsse auf den FTY 720-Effekt ohne Einfluss des Lösungsmittels ziehen kann.

Dieser Versuch wurde zunächst mit einer Konzentration von 100 µM durchgeführt.

	<u>S1P<sub>4</sub>-KO</u>		<u>S1P-Rezeptor-WT</u>	
<u>Anzahl</u>	n = 4		n = 5	
<u>Geschlecht</u>	sex-matched		sex-matched	
<u>Alter</u>	8 bis 22 Wochen		8 bis 22 Wochen	
<u>Thrombozyten-konzentration</u>	2 x 10 <sup>8</sup> / ml		2 x 10 <sup>8</sup> / ml	
<u>Substanz</u>	FTY 720	DMSO	FTY 720	DMSO
<u>Konzentration</u>	100 µM	entspricht 100 µM	100 µM	entspricht 100 µM

*Tabelle 26: Versuchsparemeter bei Inkubation der Thrombozyten von S1P<sub>4</sub>-KO-Mäusen und dem zugehörigen Wildtyp mit FTY 720 100 µM*

Anschließend wurde in einem neuen Versuch die FTY 720-Konzentration auf 50 µM halbiert. Dadurch können vor allem Effekte in einem niedrigen Konzentrationsbereich nachgewiesen werden, die bei einer Konzentration von 100 µM nicht mehr sichtbar sein könnten.

	<u>S1P<sub>4</sub>-KO</u>		<u>S1P-Rezeptor-WT</u>	
<u>Anzahl</u>	n = 7		n = 4	
<u>Geschlecht</u>	männlich		männlich	
<u>Alter</u>	12 Wochen		12 Wochen	
<u>Thrombozyten- konzentration</u>	2 x 10 <sup>8</sup> / ml		2 x 10 <sup>8</sup> / ml	
<u>Substanz</u>	FTY 720	DMSO	FTY 720	DMSO
<u>Konzentration</u>	50 µM	entspricht 50 µM	50 µM	entspricht 50 µM

*Tabelle 27: Versuchsparemeter bei Inkubation der Thrombozyten von S1P<sub>4</sub>-KO-Mäusen und dem zugehörigen Wildtyp mit FTY 720 50 µM*

### 2.3.3.2 Rolle des S1P<sub>4</sub>-Rezeptors für die Aggregation mit S1P

Um die Rolle des S1P<sub>4</sub>-Rezeptors für die Aggregationshemmung durch S1P zu prüfen, werden analog zum vorhergehenden Versuch, beschrieben in 2.3.3.1, die Thrombozyten der beiden Mausstämme mit S1P 100 µM inkubiert. Der Einfluss der S1P<sub>1</sub>-, S1P<sub>2</sub>- und S1P<sub>3</sub>-Rezeptoren für die Aggregationshemmung durch S1P wurde in den Versuchen unter 2.3.1.6 und 2.3.1.7 behandelt.

Die Inkubationszeit beträgt 10 Minuten, bevor die Zellen durch Kollagen stimuliert werden.

Als Kontrolle werden die Thrombozyten der beiden Tierstämme mit Morpholine und Methanol in derselben Verdünnung wie bei den Proben mit S1P versetzt, so dass man Rückschlüsse auf den S1P-Effekt ohne Einfluss des Lösungsmittels ziehen kann.

	<u>S1P<sub>4</sub>-KO</u>		<u>S1P-Rezeptor-WT</u>	
<u>Anzahl</u>	n = 9		n = 9	
<u>Geschlecht</u>	sex-matched		sex-matched	
<u>Alter</u>	11 bis 13 Wochen		11 bis 12 Wochen	
<u>Thrombozyten- konzentration</u>	2 x 10 <sup>8</sup> / ml		2 x 10 <sup>8</sup> / ml	
<u>Substanz</u>	S1P	Morpholine + Methanol	S1P	Morpholine + Methanol
<u>Konzentration</u>	100 µM	entspricht 100 µM	100 µM	entspricht 100 µM

*Tabelle 28: Versuchsparemeter bei Inkubation der Thrombozyten von S1P<sub>4</sub>-KO-Mäusen und dem zugehörigen Wildtyp mit S1P 100 µM*

### 2.3.3.3 Rolle der SphK-1 und SphK-2 für die Aggregation mit Sphingosin

Sphingosin kann prinzipiell durch beide SphK phosphoryliert werden. Deshalb ist es interessant, ob ein Ausschalten eines der beiden Gene den Effekt von Sphingosin auf Thrombozyten beeinflussen kann.

Um dies zu untersuchen, werden Thrombozyten von drei Tierstämmen mit Sphingosin 50 µM für 20 Minuten inkubiert: SphK-1-KO-, SphK-2-KO- und den SphK-1,2-WT-Mäusen (alle auf C57Bl6-Hintergrund).

Als Kontrolle dienen Thrombozyten, die mit DMSO derselben Verdünnung versetzt sind.

	<u>SphK-1-KO</u>		<u>SphK-2-KO</u>		<u>SphK-1,2-WT</u>	
<u>Anzahl</u>	n = 12		n = 6		n = 6	
<u>Geschlecht</u>	sex-matched		sex-matched		sex-matched	
<u>Alter</u>	13 bis 18 Wochen		15 bis 19 Wochen		14 Wochen	
<u>Thrombozyten- konzentration</u>	2 x 10 <sup>8</sup> / ml		2 x 10 <sup>8</sup> / ml		2 x 10 <sup>8</sup> / ml	
<u>Substanz</u>	Sphingosin	DMSO	Sphingosin	DMSO	Sphingosin	DMSO
<u>Konzentration</u>	50 µM	entspr. 50 µM	50 µM	entspr. 50 µM	50 µM	entspr. 50 µM

*Tabelle 29: Versuchsparameter bei Inkubation der Thrombozyten von SphK-1-KO, SphK-2-KO und SphK-1,2-WT mit Sphingosin 50 µM*

## 2.4 Auswertung und Statistik

Zur Auswertung der Daten, die durch die Aggregometrie erhoben wurden, wird die maximale Aggregation jeder Probe ermittelt. Diese werden dann mit Hilfe von Excel, Microsoft Corporation, graphisch dargestellt und mit SPSS Statistics 17.0 ausgewertet.

Die Graphiken zeigen Mittelwerte und den dazugehörigen Standardfehler.

Um verlässliche Aussagen treffen zu können, werden in dieser Arbeit zur Auswertung der Daten Methoden der deskriptiven Statistik verwendet.

Als „signifikant“ werden Ergebnisse bezeichnet, bei denen der Unterschied zwischen den Ergebnissen nur mit einer definierten, geringen Wahrscheinlichkeit durch Zufall zustande gekommen sein kann. Mittels eines Signifikanztest kann die Signifikanz der Ergebnisse überprüft werden. Dazu wird anfangs eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  festgelegt. Ein Unterschied wird als signifikant bezeichnet wenn  $p < 0,05$ , also kleiner 5 Prozent ist. Dies wurde in den nachfolgenden Graphiken mit einem „\*“ gekennzeichnet. Wenn  $p < 0,001$  spricht man von hochsignifikanten Ergebnissen, die mit „\*\*\*“ markiert wurden. Nicht-signifikante Resultate sind mit „n.s.“ markiert.

Die statische Prüfung der erhobenen Daten wurde mit Hilfe des Auswertungsprogrammes SPSS Statistics 17.0 durchgeführt.

Da die Ergebnisse der Versuche keine Normalverteilung aufweisen, wurden die entsprechenden statistischen Tests für nicht-normalverteilte Proben verwendet. Dazu kommt der Wilcoxon Signed Rank Test bei den verbundenen Proben zum Einsatz. Dies ist vor allem bei den humanen Versuchen von entscheidender Bedeutung, da hier mehrere Messungen mit Thrombozyten von einem Spender durchgeführt werden.

Wird hingegen das Aggregationsvermögen der Thrombozyten von unterschiedlichen Tierstämmen verglichen, spricht man von unverbundenen Proben. Zur Auswertung wird dann der Mann-Whitney-U-Test angewandt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 humane Versuche

##### 3.1.1 Einfluss von FTY 720 auf die Thrombozytenaggregation

###### Konzentrationsreihen mit FTY 720:

Zur Überprüfung, ob FTY 720 die Aggregation humaner Thrombozyten beeinflusst, werden die Zellen mit der Substanz in sechs verschiedenen Konzentrationen versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten wird die maximale Aggregation ermittelt.

Wird Kollagen in einer Konzentration von 10 µg/ml zur Stimulation der Thrombozyten eingesetzt, zeigt sich, dass FTY 720 in einem bestimmten Konzentrationsbereich die Aggregation hemmt. Diese Inhibition tritt auf, wenn FTY 720 in einem Konzentrationsbereich zwischen 20 µM und 500 µM zugesetzt wird; es handelt sich um signifikante Unterschiede mit einem  $p < 0,05$ . Die Substanz in 10 µM Konzentration führt zu keiner signifikanten Verminderung ( $p > 0,05$ ) des Aggregationsvermögens bei der eingesetzten Kollagenmenge. Wie in *Abbildung 17* zu erkennen, zeigt sich, dass beim Vergleich der Thrombozytenaggregation mit dem Lösungsmittel DMSO, das der Verdünnung bei FTY 720 500 µM entspricht, mit Kontrolle mit Tyrodes-Puffer (pH 7,4) keine Hemmwirkung besteht.

Die Dosis-Wirkungs-Beziehung in diesem Versuch lässt sich mit folgender Gleichung beschreiben:

$$\text{Maximale Aggregation} = 255,4 - 266,3 * \log [\text{FTY 720}] + 71,2 * \log [\text{FTY 720}]^2;$$

Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  ist für die oben angegebene Gleichung 0,738; d.h. 73,8% der erlangten Werte lassen sich mit der geschätzten Regressionsgleichung errechnen. Je höher das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  ist, desto besser stimmt die Approximation mit den tatsächlichen Werten überein.

Der beschriebene Zusammenhang zwischen der FTY 720-Konzentration und der maximalen Aggregation, d.h. die Dosis-Wirkungs-Beziehung ist hochsignifikant mit  $p < 0,001$ .

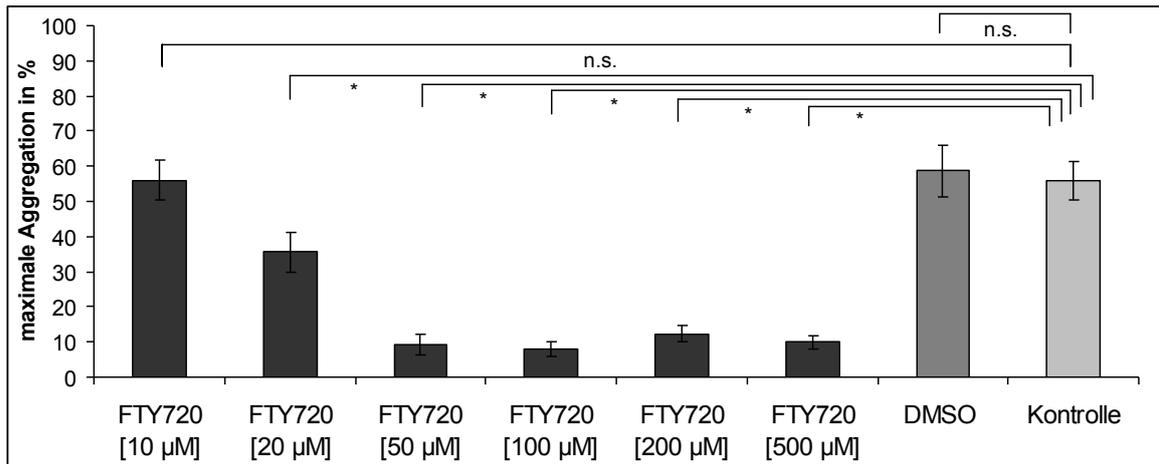
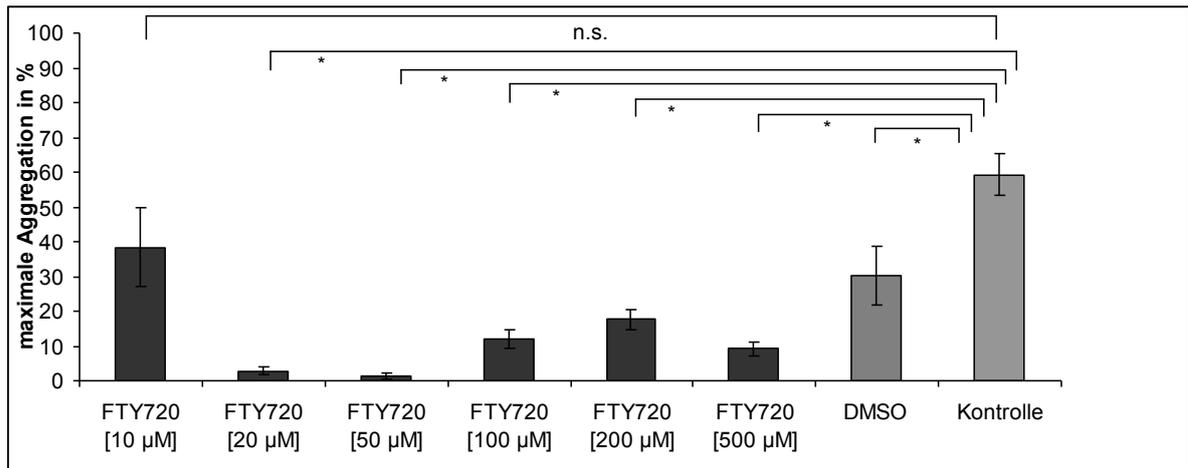


Abbildung 17: Aggregation humaner Thrombozyten mit FTY 720

Stimulation durch Kollagen 10 µg/ml

Lässt man den Versuchsaufbau unverändert mit Ausnahme der Kollagenkonzentration, die auf 2 µg/ml reduziert wird, zeigt sich ebenfalls eine Aggregationshemmung durch FTY 720. In diesem Versuch vermindern die FTY 720-Konzentrationen zwischen 20 µM und 500 µM das Aggregationsvermögen signifikant. Der Hemmeffekt der geringsten FTY-Konzentration, 10 µM, ist statistisch nicht signifikant. Dies ist in *Abbildung 18* dargestellt. Durch die Reduktion von Kollagen wirkt auch das Lösungsmittel DMSO, in der stärksten verwendeten Konzentration, aggregationshemmend. Da diese Verminderung des Aggregationsvermögens schwächer ausgeprägt ist als die durch FTY 720 500 µM, kann davon ausgegangen werden, dass der Effekt auch auf den Rezeptoragonisten und nicht allein auf das Lösungsmittel zurückzuführen ist.



**Abbildung 18: Aggregation humaner Thrombozyten mit FTY 720**  
 Stimulation durch Kollagen 2 µg/ml

Testet man drei verschiedene FTY 720-Konzentrationen mit den zugehörigen Lösungsmittel-Verdünnungen als Kontrolle, erhält man die in *Abbildung 19* und *Abbildung 20* dargestellten Ergebnisse. Es werden humane Thrombozyten für 20 Minuten mit diesen Substanzen inkubiert, wobei Thrombin und Kollagen als Stimulantien eingesetzt werden. Durch die Anwendung zweier verschiedener Substanzen, die eine Aggregation auslösen, kann überprüft werden, ob sich die Effekte unabhängig vom Aggreganz reproduzieren lassen. Dazu wird Thrombin 0,2 U/ml und Kollagen 10 µg/ml verwendet.

Man erkennt, dass die drei verwendeten FTY 720-Konzentrationen zu einer Aggregationshemmung führen, unabhängig vom Aggreganz. Bei Stimulation durch Thrombin, dem potenteren Aggreganz ist die Hemmung geringer ausgeprägt. Dieser Effekt ist bei den drei vorliegenden Konzentrationen statistisch signifikant.

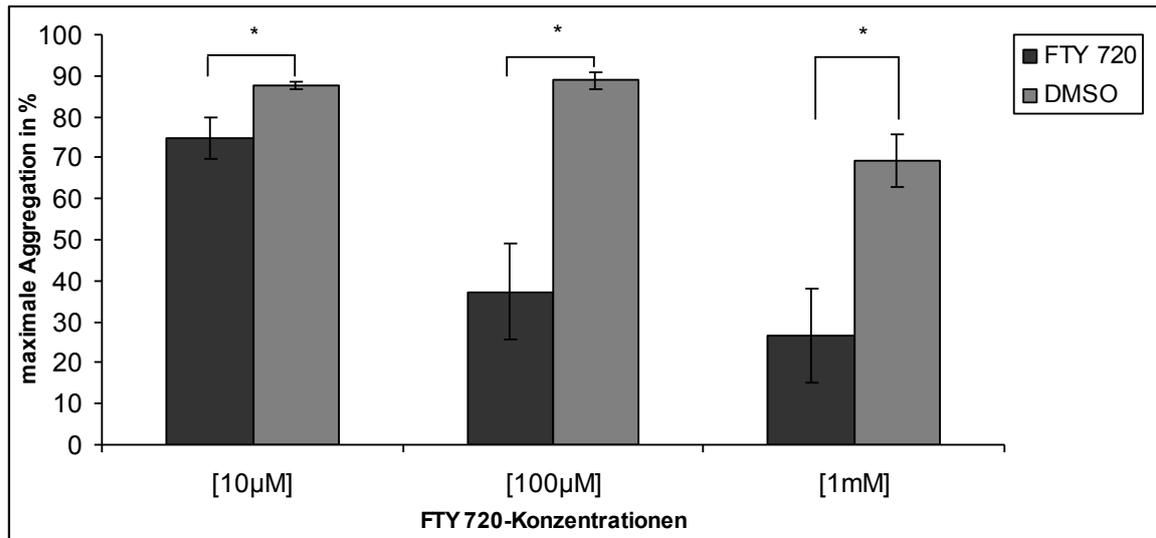


Abbildung 19: Aggregation humaner Thrombozyten mit FTY 720  
Stimulation durch Thrombin 0,2 U/ml

Bei Kollagen, dem schwächeren Aggreganz, findet im Bereich von FTY 720 1 mM keine Aggregation mehr statt. Das Lösungsmittel alleine bewirkt hier zudem eine starke Hemmung. Die Ergebnisse sind bei den verwendeten geringen Fallzahlen nicht signifikant.

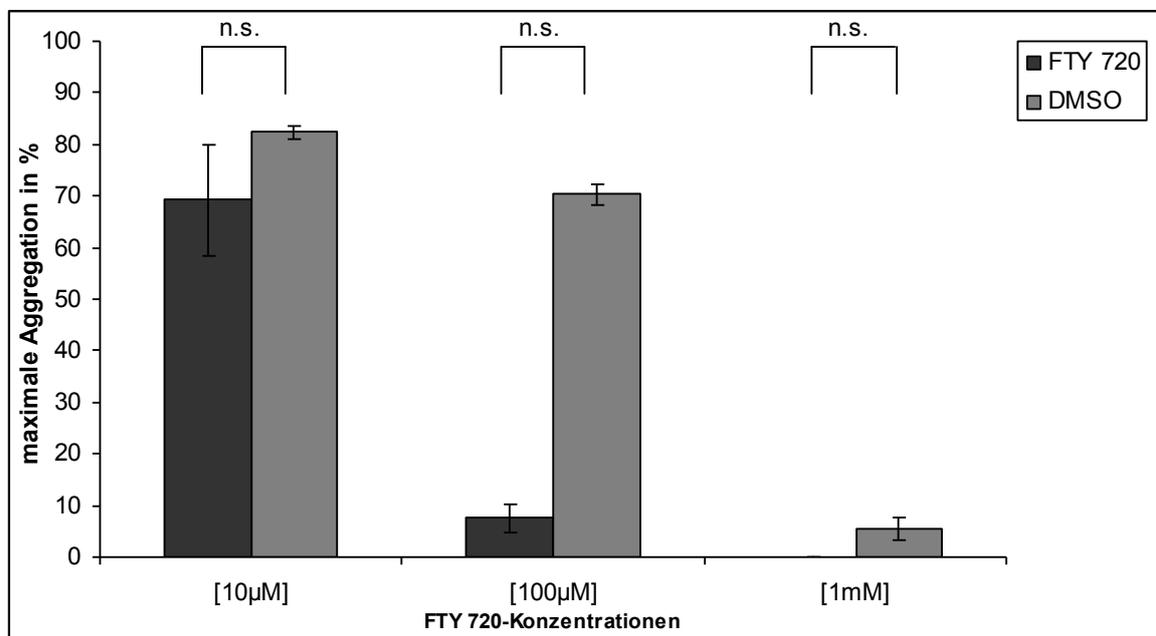


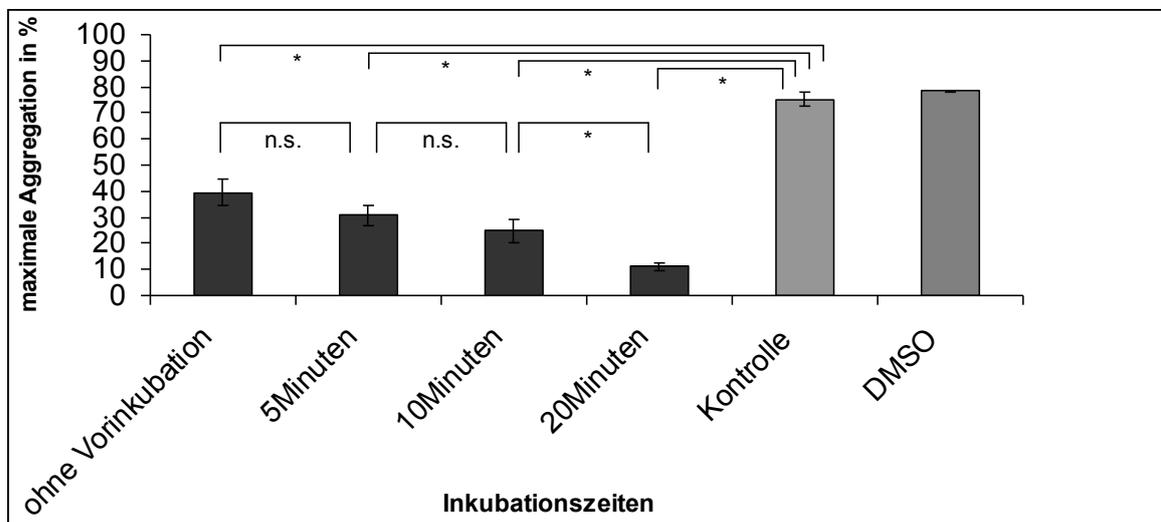
Abbildung 20: Aggregation humaner Thrombozyten mit FTY 720  
Stimulation durch Kollagen 10 µg/ml

### Die Wirkung von FTY 720 im Zeitverlauf:

Für die vorangegangenen Versuche wurde eine Inkubationszeit von 20 Minuten verwendet. Durch eine Austestung verschiedener Zeiten soll analysiert werden, wie sich der Effekt von FTY 720 im Zeitverlauf ändert. Dadurch können Rückschlüsse auf den zugrundeliegenden Wirkmechanismus gezogen werden. Da FTY 720, bevor es an die S1P-Rezeptoren binden kann, phosphoryliert werden muss, würden ein Wirkmaximum bei fehlender Vorinkubation (0 Minuten) und eine Wirkungsabnahme über den Zeitverlauf gegen eine Phosphorylierung und Rezeptorbindung sprechen. Nimmt die Wirkung zu, je länger die Thrombozyten mit FTY 720 inkubiert werden, ist dies vereinbar mit der Hypothese, dass eine Phosphorylierung und eine Rezeptorbindung stattfinden.

Um dies herauszufinden, werden die humanen Thrombozyten mit FTY 720 20  $\mu\text{M}$  unterschiedliche lange, zunächst bis maximal 20 Minuten, inkubiert.

In *Abbildung 21* ist zu erkennen, dass der Effekt durch FTY 720 über den Zeitraum von 20 Minuten zunimmt. Die Zunahme der Aggregationshemmung zwischen der Aggregation mit 10- und 20-minütiger Inkubationszeit ist signifikant. Das Lösungsmittel DMSO, das ebenfalls 20 Minuten einwirkt, hat keinen Effekt.

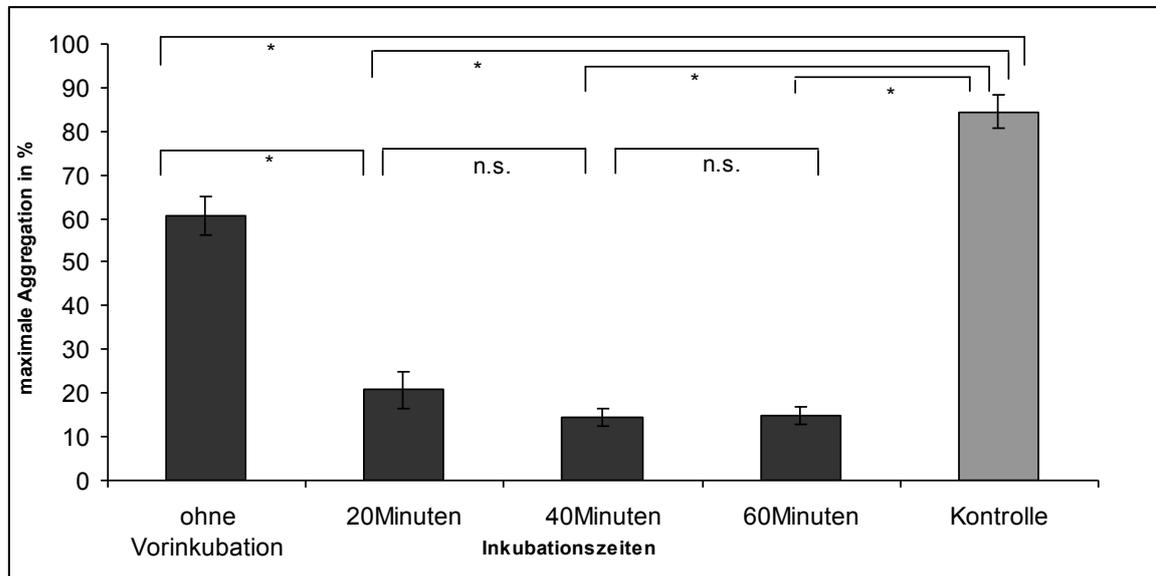


*Abbildung 21: Aggregation humaner Thrombozyten mit FTY 720 und unterschiedlichen Inkubationszeiten bis 20 Minuten*

Um zu überprüfen, wie sich die Aggregationshemmung bei Inkubationszeiten von mehr als 20 Minuten verändert, wird die Zeitspanne auf 60 Minuten erhöht.

Die restlichen Versuchsparameter bleiben unverändert.

Es zeigt sich in *Abbildung 22*, dass die Aggregationshemmung durch FTY 720 bis zu einer Inkubationszeit von 40 Minuten zunimmt. Bis 60 Minuten bleibt sie weitgehend konstant.



*Abbildung 22: Aggregation humaner Thrombozyten mit FTY 720 und unterschiedlichen Inkubationszeiten bis 60 Minuten*

Um diese Ergebnisse zusammenzufassen, wird jeder Messwert in Relation zu dem Messwert ohne Vorinkubation gesetzt. Somit wird deutlich, um wieviel Prozent die Aggregation durch Inkubation mit FTY 720 gesenkt wird. Die Werte der beiden Versuche werden vergleichbar und können in einer Graphik dargestellt werden.

Aus *Abbildung 23* ist ersichtlich, dass eine starke Wirkungszunahme zwischen 10 und 20 Minuten stattfindet.

Nach 5 Minuten Inkubation nimmt die Aggregation um 7% ab. Die Aggregationsabnahme ist nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten 25%. Der größte Unterschied im Intervall zwischen 10 und 20 Minuten führt zu einer Senkung um 51%. Zwischen 20 und 40 Minuten nimmt die Aggregationshemmung nochmals um 34% zu. Danach bleibt sie relativ konstant.

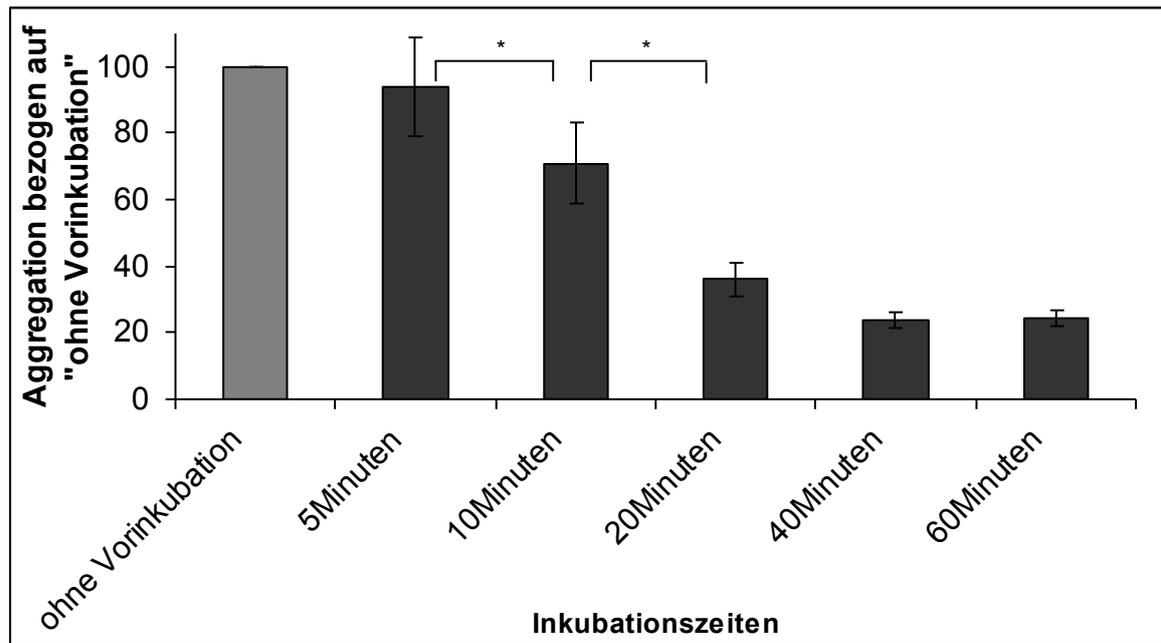


Abbildung 23: Zusammenfassung der Aggregationen humaner Thrombozyten mit FTY 720 und unterschiedlichen Inkubationszeiten bis 60 Minuten

### 3.1.2 Einfluss der S1P<sub>2</sub>-Rezeptoren auf die Aggregationshemmung durch FTY 720

Um den Rezeptor zu identifizieren, der die FTY 720-Wirkung vermittelt, werden humane Thrombozyten mit einem S1P-Rezeptorantagonisten für 10 Minuten inkubiert und nach 5 Minuten der Agonist FTY 720 hinzugefügt.

Davor muss ausgeschlossen werden, dass der S1P<sub>2</sub>-Rezeptorantagonist JTE-013 selbst die Aggregation hemmt.

#### Versuch zur Testung des Effekts von JTE-013 auf die Aggregation

Bei Inkubation humaner Thrombozyten mit JTE-013 für 10 Minuten zeigt sich, dass JTE-013 selbst bei einer Konzentration, die 100-mal größer ist, als die in den folgenden Versuchen eingesetzte, keine Aggregationshemmung im Vergleich zur Kontrolle mit den entsprechenden DMSO-Verdünnungen bewirkt. Dies ist in *Abbildung 24* dargestellt.

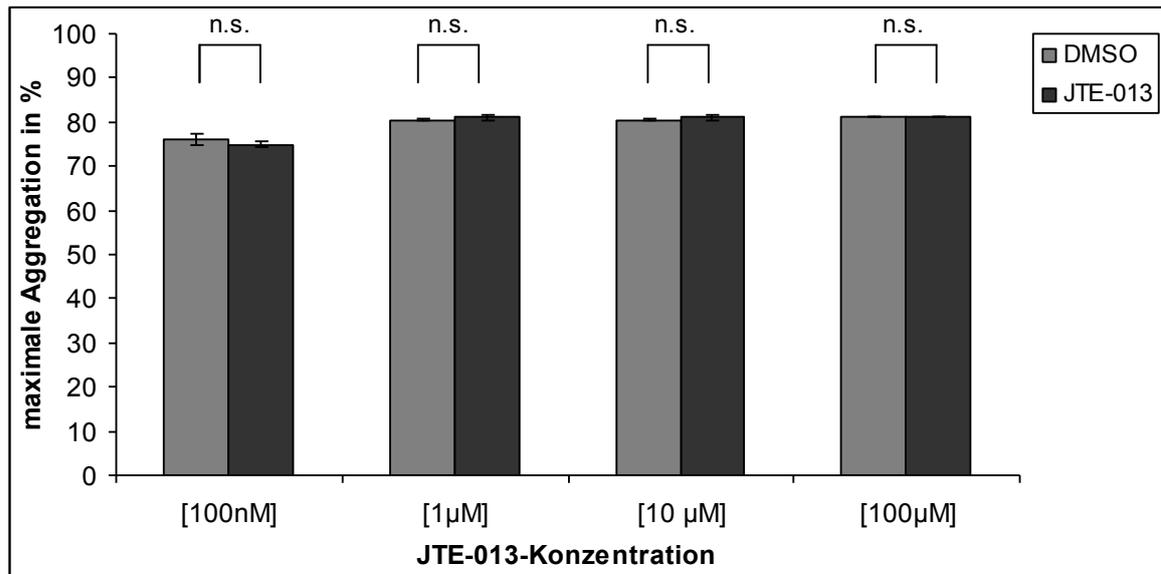


Abbildung 24: Aggregation humaner Thrombozyten mit JTE-013

#### Versuch mit JTE-013 und FTY 720 20 μM

In diesem Versuch werden Thrombozyten zunächst mit JTE-013 und im Anschluss mit FTY 720 20 μM inkubiert. Als Kontrollen dienen zum Einen Thrombozyten die mit FTY 720 in der gleichen Konzentration versetzt werden, ohne dass JTE-013 hinzugefügt wird. Zum Anderen werden Thrombozyten ausschließlich mit Tyrodes-Puffer inkubiert, um das Aggregationsvermögen zu testen.

Wie in *Abbildung 25* dargestellt, zeigt sich, dass FTY 720 20 μM eine schwache Hemmwirkung besitzt, die sich durch vorherige Zugabe von JTE-013 in den Konzentrationen 100 nM und 1 μM nicht ändert.

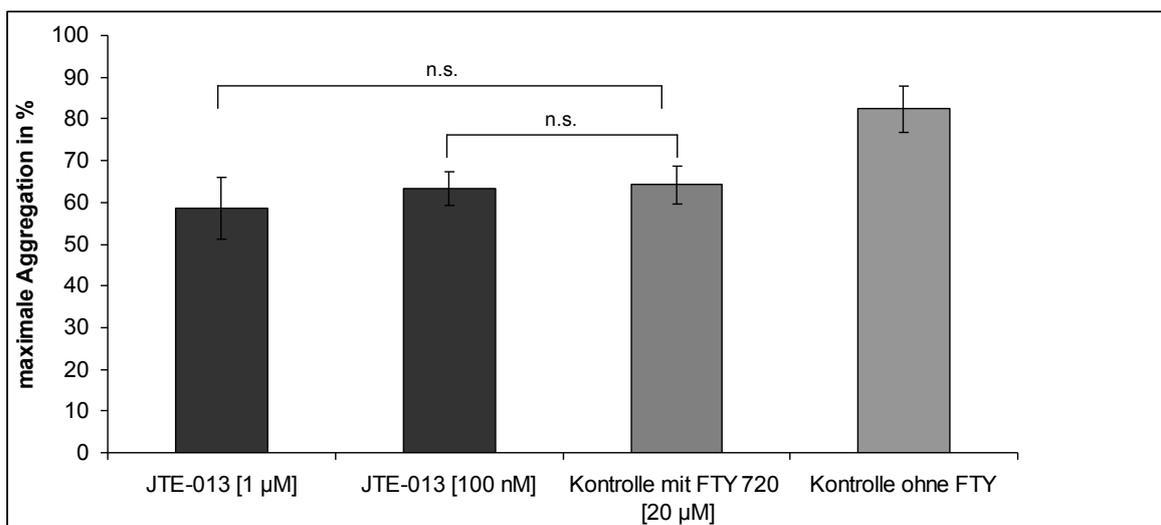
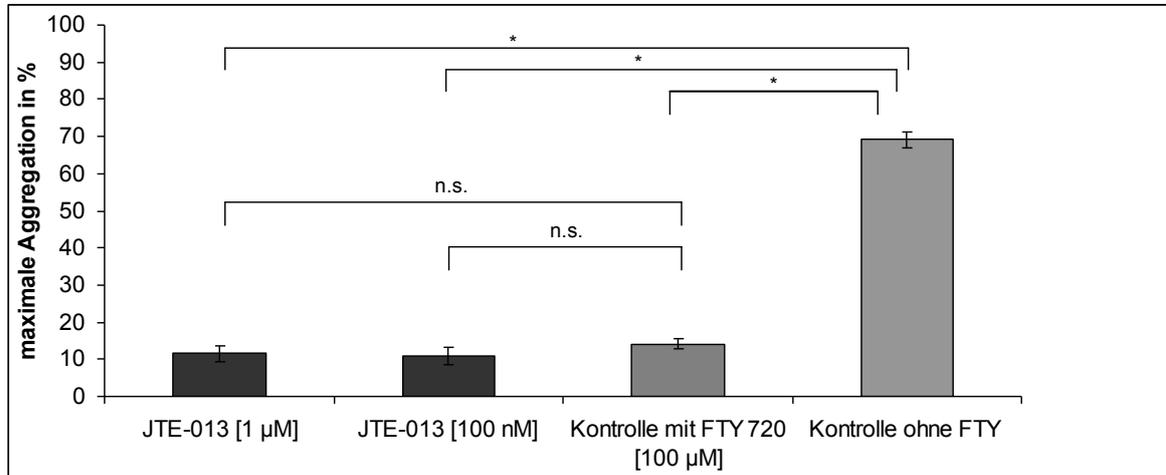


Abbildung 25: Aggregation humaner Thrombozyten mit JTE-013 und FTY 720

### Versuch mit JTE-013 und FTY 720 100 $\mu$ M

Wenn man die FTY 720-Konzentration auf 100  $\mu$ M erhöht und die restlichen Versuchsparameter nicht verändert, bleibt der Effekt durch die JTE-013-Zugabe unverändert. Dies ist aus *Abbildung 26* ersichtlich.



*Abbildung 26: Aggregation humaner Thrombozyten mit JTE-013 und FTY 720*

### 3.1.3 Einfluss der S1P<sub>1</sub>- und S1P<sub>3</sub>-Rezeptoren auf die Aggregationshemmung durch FTY 720

Um die Suche nach dem vermittelnden Rezeptor für die FTY 720-Wirkung an Thrombozyten weiterzuführen, wird im Folgenden die Rolle der S1P<sub>1</sub>- und S1P<sub>3</sub>-Rezeptoren getestet. Der Versuchablauf und -aufbau ist hierbei analog zum vorangegangenen Experiment.

#### Versuch zur Testung des Effekts von VPC 23019 auf die Aggregation

Analog zum Versuch mit JTE-013 muss getestet werden, ob VPC 23019 durch seine Blockade der S1P<sub>1</sub>- und S1P<sub>3</sub>-Rezeptoren die Thrombozytenaggregation beeinflusst. Die Blutplättchen werden deshalb mit der Substanz für 10 Minuten inkubiert und anschließend mit Kollagen 10  $\mu$ g/ml stimuliert. Als Kontrolle dienen Thrombozyten, die mit dem Lösungsmittel DMSO und 3%-wässriger Lösung von fettsäurefreiem bovinem Serumalbumin versetzt werden.

Es ist aus *Abbildung 27* erkennbar, dass die Substanz in den vorliegenden Konzentrationen keinen Einfluss auf die Thrombozytenaggregation nimmt.

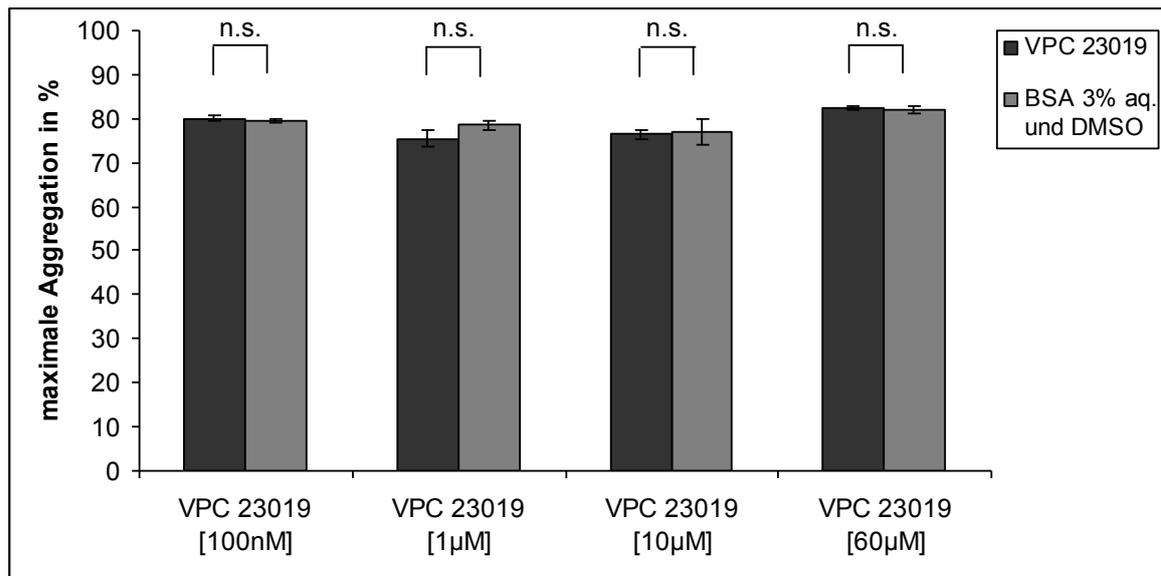


Abbildung 27: Aggregation humaner Thrombozyten mit VPC 23019

#### Versuch mit VPC 23019 und FTY 20 µM

In diesem Versuch werden die Thrombozyten für 10 Minuten mit VPC 23019 inkubiert und nach 5 Minuten FTY 720 20 µM hinzugefügt. Zum Vergleich werden Thrombozyten ausschließlich mit dem Rezeptoragonisten inkubiert. Die Kontrolle sind Blutplättchen, die ausschließlich mit Tyrodes-Puffer verdünnt werden, und so eine Aussage über das Aggregationsvermögen der verwendeten Thrombozyten zulassen.

In *Abbildung 28* zeigt sich, dass FTY 720 einen Hemmeffekt hat, der durch Zugabe des Rezeptorantagonisten abgeschwächt werden kann.

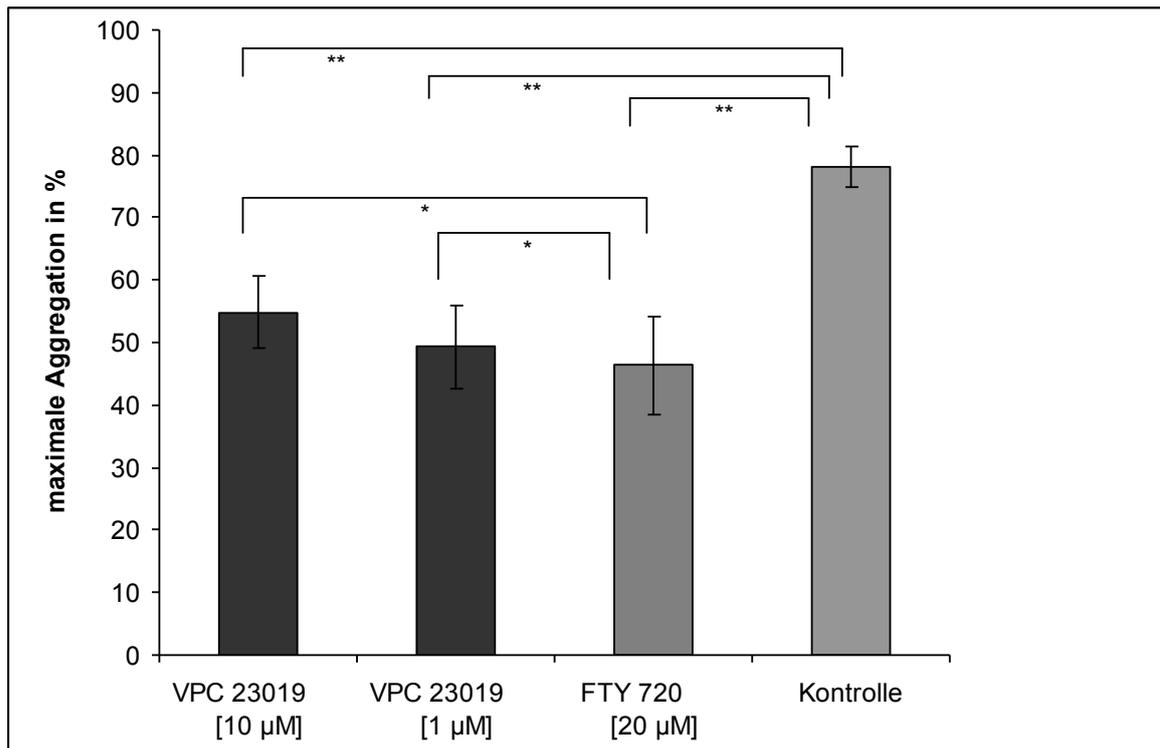


Abbildung 28: Aggregation humaner Thrombozyten mit VPC 23019 und FTY 720

#### Versuch mit VPC 23019 und FTY 100 µM

Erhöht man die FTY 720-Konzentration auf 100 µM, werden theoretisch mehr Rezeptoren durch die Substanz besetzt. Eine Blockade der Rezeptoren könnte so die Wirkung stärker beeinflussen.

Die restlichen Parameter bleiben unverändert.

Die *Abbildung 29* zeigt, dass die Wirkung von FTY 720 100 µM stark ausgeprägt ist. Wenn zuvor VPC 23019 zugegeben wurde, nimmt die Aggregationshemmung ab. Je höher die Konzentration des Rezeptorantagonisten ist, desto schwächer ist die FTY 720-Wirkung. Mit steigender VPC 23019-Konzentration werden zunehmend mehr Rezeptoren blockiert.

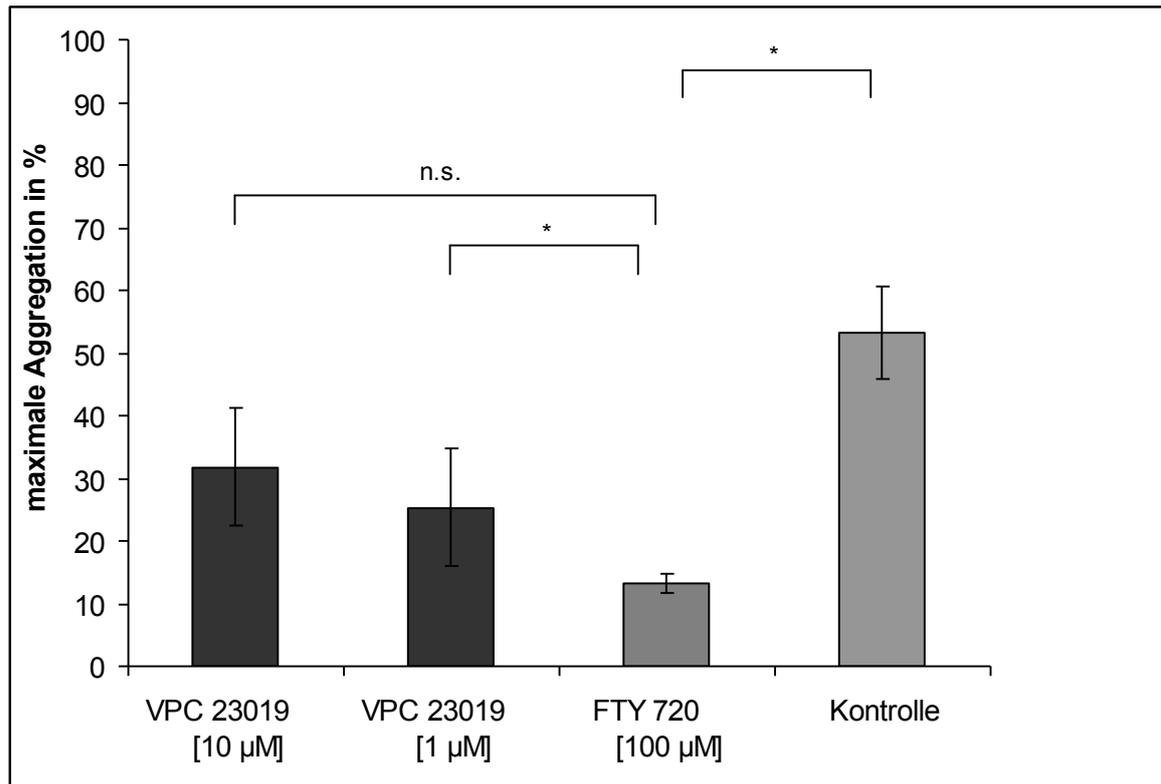


Abbildung 29: Aggregation humaner Thrombozyten mit VPC 23019 und FTY 720

### 3.1.4 Einfluss von Sphingosin auf die Thrombozytenaggregation

Um zu testen, ob Sphingosin, das wie FTY 720 nach Phosphorylierung an S1P-Rezeptoren binden kann, ebenfalls eine Aggregationshemmung hervorrufen kann, werden humane Thrombozyten mit der Substanz für 5 Minuten inkubiert. Die Kontrollen stellen Blutplättchen mit der höchsten DMSO-Konzentration und Tyrodes-Puffer dar.

Die Aggregometrie (Abbildung 30) zeigt, dass jede der fünf getesteten Sphingosin-Konzentrationen zwischen 1 µM und 100 µM zu einer signifikanten Aggregationshemmung führt, wobei diese bei 10 µM am stärksten ausgeprägt ist. DMSO als Lösungsmittel hat in der stärksten Konzentration zwar einen hemmenden Effekt auf die Aggregation, der aber statistisch nicht signifikant und deutlich schwächer ist als bei der stärksten Sphingosin-Konzentration. Die Hemmung ist also nicht allein durch das Lösungsmittel erklärbar.

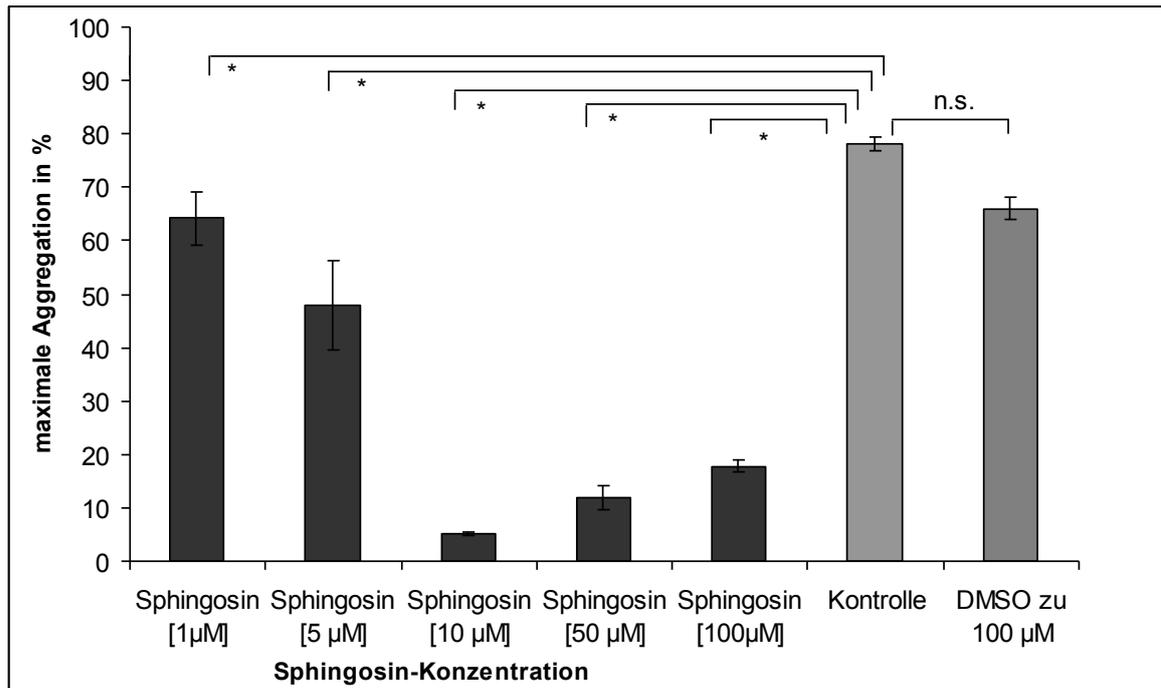


Abbildung 30: Aggregation humaner Thrombozyten mit Sphingosin

#### Die Wirkung von Sphingosin im Zeitverlauf:

Ähnlich wie bei FTY 720 ist es auch bei Sphingosin interessant, wie sich die Wirkung durch verschiedene Inkubationszeiten ändert. Analog zu FTY 720 ist bei Sphingosin ebenfalls eine Phosphorylierung nötig, bevor es zu S1P-Rezeptorbindung kommen kann. Es wäre also zu erwarten, dass beide Substanzen ein ähnliches Zeit-Wirkungsprofil besitzen.

Dazu werden Thrombozyten mit Sphingosin 5 µM unterschiedlich lange inkubiert. Zur Kontrolle werden Blutplättchen alleine mit Tyrodes-Puffer (pH 7,4) versetzt.

Die Aggregationshemmung durch Sphingosin ist in dieser Konzentration bei den verschiedenen Inkubationszeiten signifikant.

Abbildung 31 zeigt, dass die Wirkung innerhalb der ersten 5 Minuten Inkubationszeit relativ konstant bleibt. Bei 10-minütiger Inkubationszeit nimmt der Sphingosin-Effekt stark zu, um bei 20 Minuten nochmals zuzunehmen.

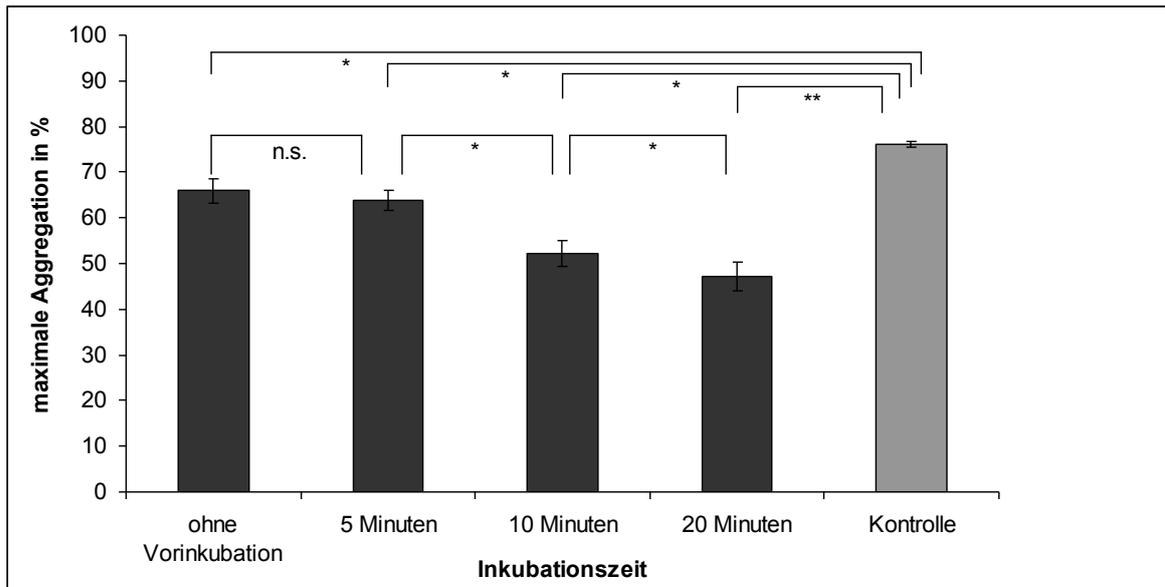


Abbildung 31: Aggregation humaner Thrombozyten mit Sphingosin 5  $\mu\text{M}$

Setzt man diese Angaben erneut in Relation zu Aggregationshemmung ohne Vorinkubation, kann man Rückschlüsse auf den Effekt der Inkubationszeit ziehen. Es zeigt sich, dass bei 5-minütiger Inkubation die Aggregationshemmung um 2% zunimmt. Der Unterschied zwischen der Aggregation ohne Vorinkubation und 5-minütiger Inkubationszeit ist nicht signifikant. Zwischen 5 und 10 Minuten steigt sie um 16% an. Bis 20 Minuten Inkubation erhöht sie sich wiederum um 13%. Die Änderung ist bei beiden Zeitintervallen statistisch signifikant.

Dies ist in *Abbildung 32* dargestellt.

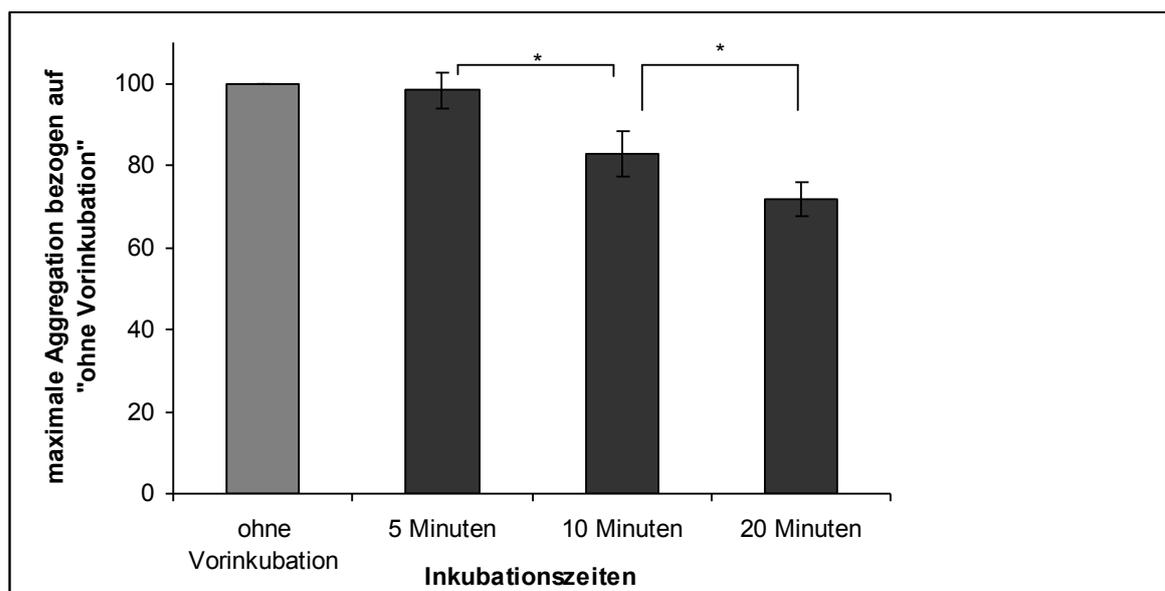


Abbildung 32: Aggregation humaner Thrombozyten mit Sphingosin 5  $\mu\text{M}$

### 3.1.5 Einfluss von S1P auf die Thrombozytenaggregation

Bei FTY 720 und Sphingosin handelt es sich um S1P-Rezeptoragonisten, die erst nach ihrer Phosphorylierung an den Rezeptor binden können. Da S1P bereits in phosphorylierter Form vorliegt, kann es direkt an den Rezeptor binden und möglicherweise so die Thrombozytenaggregation beeinflussen.

#### Konzentrationsreihe S1P:

Um dies zu analysieren werden Thrombozyten mit vier verschiedenen S1P-Konzentrationen für 5 Minuten inkubiert. Als Kontrollen dienen Blutplättchen, die zum Einen mit der höchsten Konzentration des Lösungsmittels Methanol und Morpholine versetzt sind, und zum Anderen mit Tyrodes-Puffer verdünnt sind.

Die aggregometrische Messung, die in *Abbildung 33* dargestellt ist, macht deutlich, dass S1P in einem bestimmten Konzentrationsbereich die Thrombozytenaggregation statistisch signifikant hemmen kann. Diese Konzentrationen sind 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$ . Das Lösungsmittel hat in der stärksten Konzentration auch einen Hemmeffekt, der statistisch nicht signifikant und deutlich geringer ist, als der der entsprechenden S1P-Konzentration von 100  $\mu\text{M}$ . Die Aggregationshemmung ist also nicht allein durch das Lösungsmittel zu erklären.

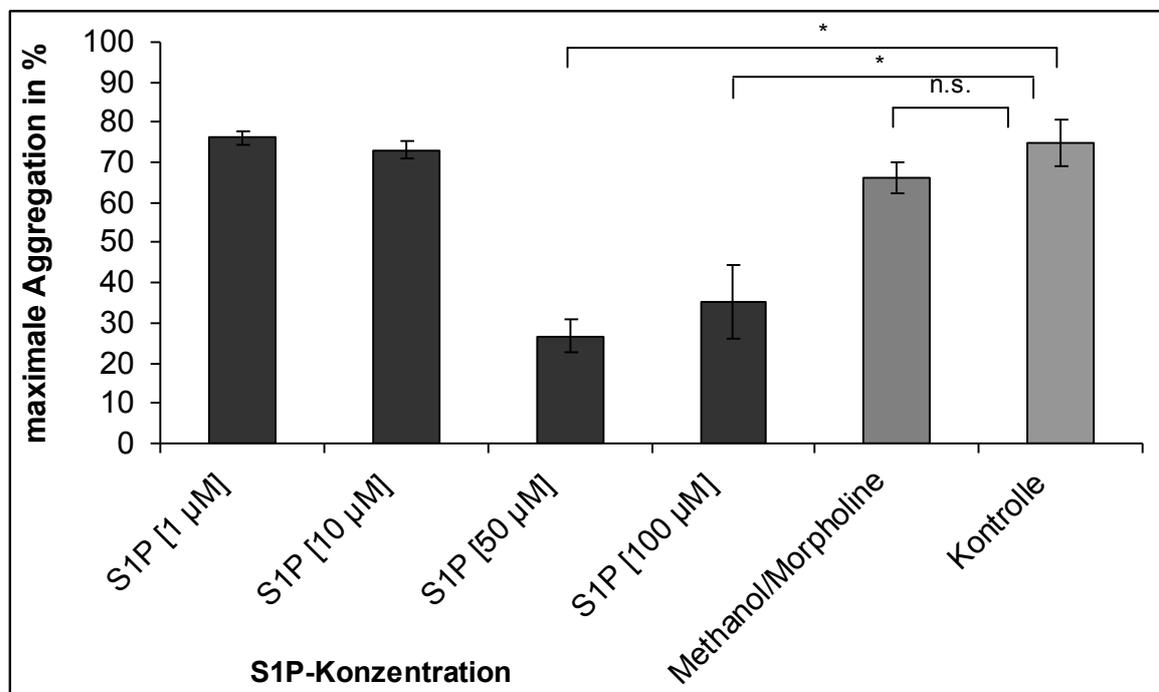
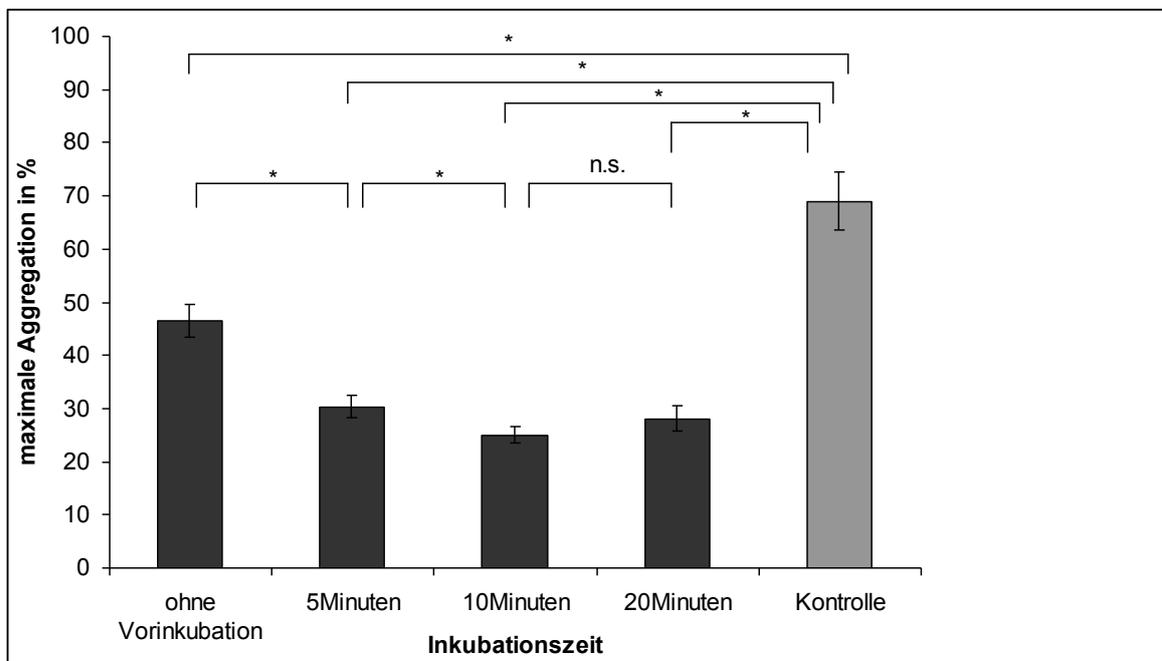


Abbildung 33: Aggregation humaner Thrombozyten mit S1P

### Die Wirkung von S1P im Zeitverlauf:

Analog zu den Experimenten mit FTY 720 und Sphingosin, wird auch bei S1P die Wirkung bei Veränderung der Inkubationszeit getestet. Da die Substanz bereits in phosphorylierter Form vorliegt und direkt an den Rezeptor binden kann, ist es denkbar, dass die Aggregation bereits bei kürzerer Inkubation gehemmt wird.

In den vorliegenden Versuchen führt S1P 50  $\mu\text{M}$  bei jeder der getesteten Inkubationszeiten zu einer statistisch signifikanten Hemmung der Thrombozytenaggregation. Wie aus *Abbildung 34* zu entnehmen, tritt ein deutlicher Wirkunterschied zwischen der Aggregation ohne Vorinkubation und der nach 5-minütiger Inkubationszeit auf. Die Aggregationshemmung nimmt weiter zu, wenn 10 Minuten inkubiert wird. Eine weitere Verlängerung der Inkubationszeit, führt zu keiner weiteren Zunahme des Effektes.



*Abbildung 34: Aggregation humaner Thrombozyten mit S1P 50  $\mu\text{M}$*

Somit unterscheidet sich das Zeit-Wirkungsprofil von S1P deutlich von dem von FTY 720 und Sphingosin. Dies wird in *Abbildung 35* deutlich. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 5 Minuten führt zu einer Zunahme der Aggregationshemmung um 32%. Wird eine 10-minütige Inkubationszeit angewandt, nimmt die S1P-Wirkung um 17% zu. Werden die Thrombozyten 20 Minuten vorinkubiert, nimmt der Effekt von S1P um 15% ab.

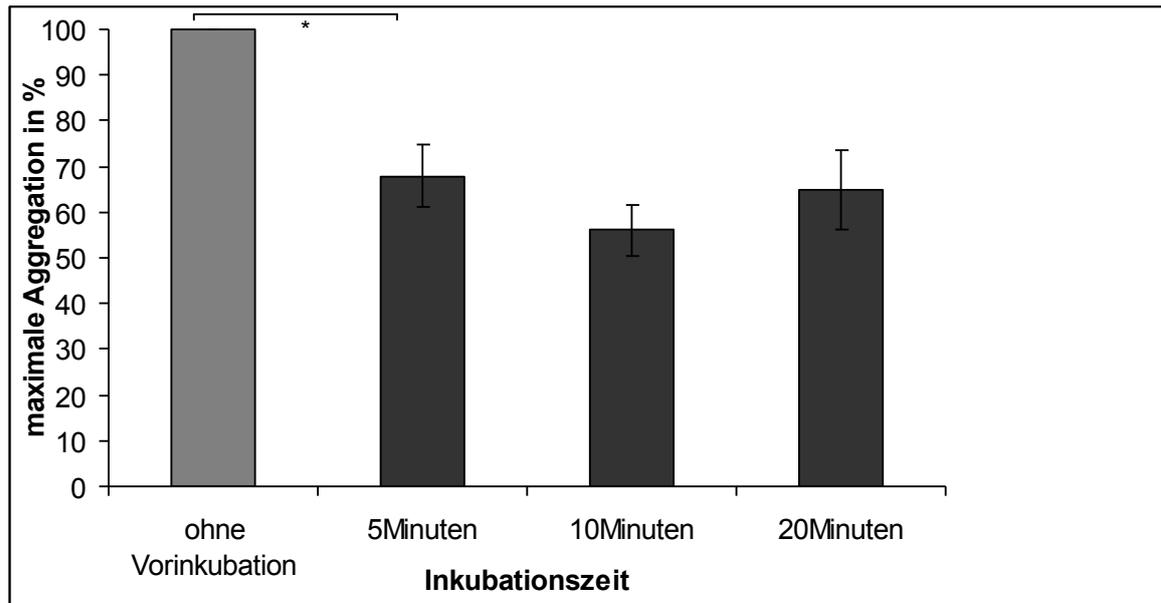


Abbildung 35: Aggregation humaner Thrombozyten mit S1P 50 µM

### 3.1.6 Einfluss der S1P<sub>2</sub>-Rezeptoren auf die Aggregationshemmung durch S1P

Um zu analysieren, ob eine Rezeptorbindung für den Wirkmechanismus von S1P entscheidend ist und welcher Rezeptor die Wirkung vermittelt, werden Thrombozyten mit einem Rezeptorantagonisten und S1P inkubiert. Zur Überprüfung des S1P<sub>2</sub>-Rezeptors wird JTE-013 eingesetzt.

Analog zu den Experimenten mit FTY 720 werden Thrombozyten für 10 Minuten mit dem Antagonisten und 5 Minuten mit dem Agonisten inkubiert.

Die Ergebnisse der Aggregometrie sind in *Abbildung 36* dargestellt. Es zeigt sich, dass JTE-013 unabhängig von der S1P-Konzentration keinen Einfluss auf die aggregationshemmende Wirkung hat.

Versuch mit JTE-013 und S1P 50  $\mu\text{M}$

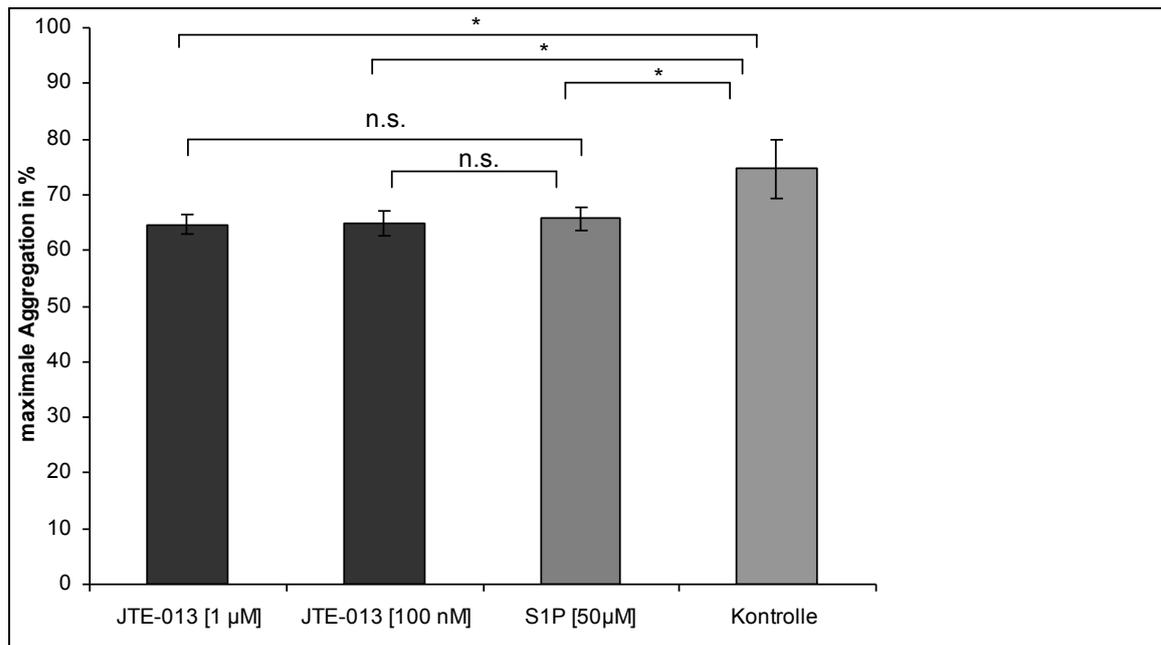


Abbildung 36: Aggregation humaner Thrombozyten mit S1P 50  $\mu\text{M}$  und JTE-013

Versuch mit JTE-013 und S1P 100  $\mu\text{M}$

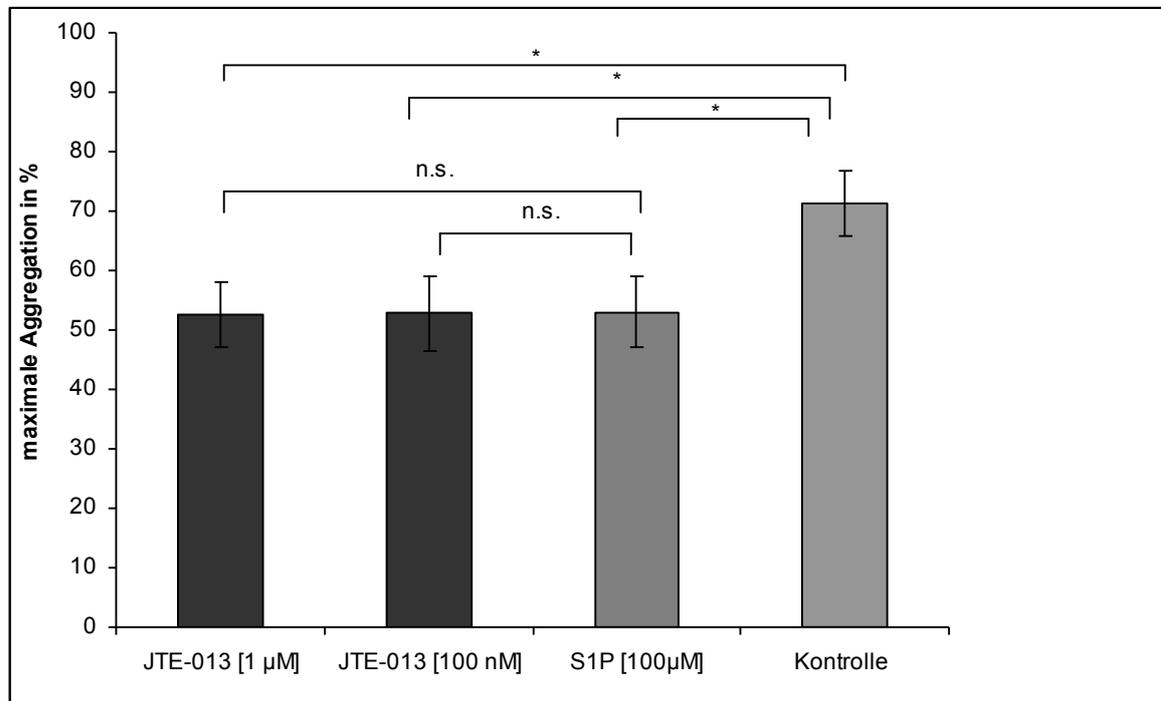


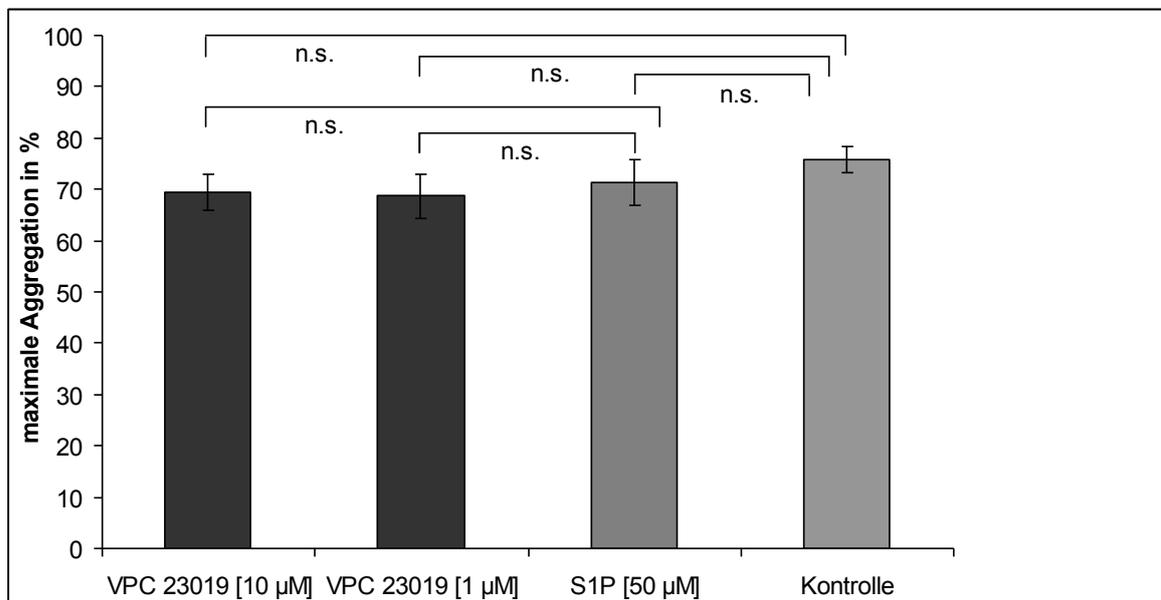
Abbildung 37: Aggregation humaner Thrombozyten mit S1P 100  $\mu\text{M}$  und JTE-013

### 3.1.7 Einfluss der S1P<sub>1</sub>- und S1P<sub>3</sub>-Rezeptoren auf die Aggregationshemmung durch S1P

Um zu überprüfen, ob die S1P<sub>1</sub>- und S1P<sub>3</sub>-Rezeptoren die S1P-Wirkung vermitteln, wird der Rezeptorantagonist VPC 23019 eingesetzt. Analog zu den vorangegangenen Experimenten werden die Thrombozyten für 10 Minuten mit dem Antagonisten inkubiert und nach 5 Minuten S1P hinzugefügt.

Zunächst wurde S1P 50 µM verwendet. Die Ergebnisse sind in *Abbildung 38* dargestellt. Hier zeigen sich keine Unterschiede im Aggregationsvermögen unabhängig davon, ob VPC 23019 hinzugefügt wurde.

#### Versuch mit VPC 23019 und S1P 50 µM



*Abbildung 38: Aggregation humaner Thrombozyten mit S1P 50 µM und VPC 23019*

Um zu analysieren, ob eine Veränderung eintritt, wenn die Menge der S1P-Rezeptoragonisten erhöht wird, wird die S1P-Konzentration auf 100 µM erhöht. Aus *Abbildung 39* ist ersichtlich, dass bei VPC 23019 10 µM eine Hemmung des S1P-Effektes stattfindet. Diese ist bei der niedrigeren VPC 23019-Konzentration von 1 µM nicht zu erkennen.

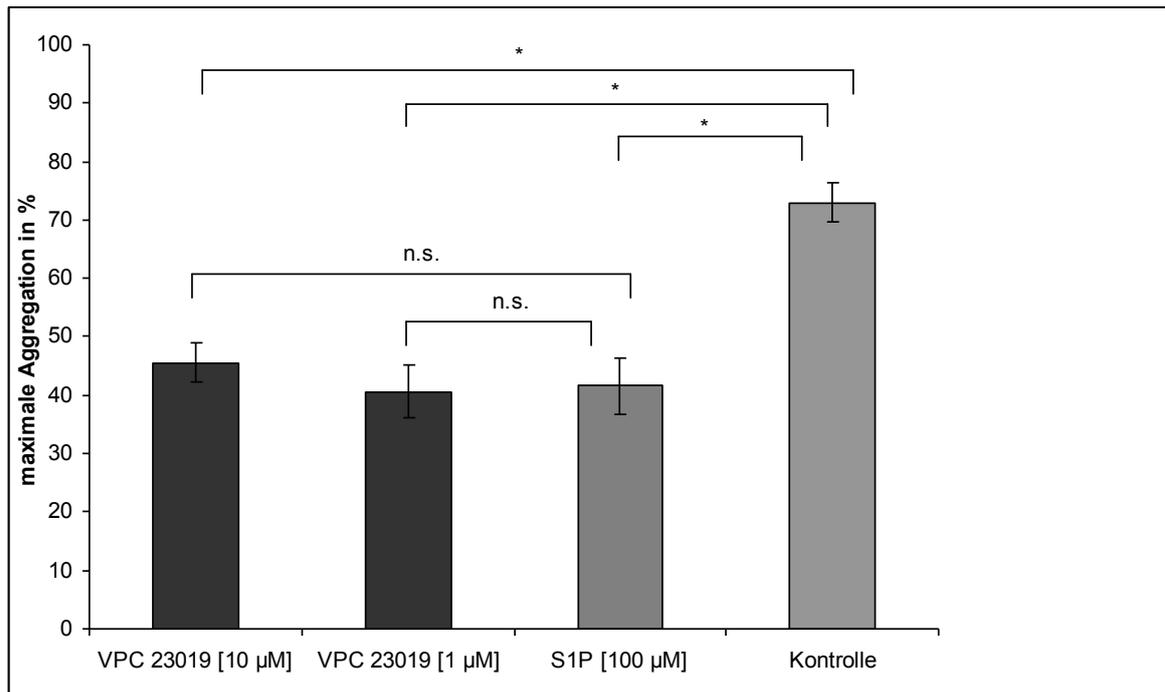
Versuch mit VPC 23019 und S1P 100  $\mu$ M

Abbildung 39: Aggregation humaner Thrombozyten mit S1P 100  $\mu$ M und VPC 23019

## 3.2 Versuche mit Mäusen auf BALB/c-Hintergrund

### 3.2.1 Rolle der SphK-1 und SphK-2 für die Aggregation mit FTY 720

Die SphK-2 katalysiert die Phosphorylierung von FTY 720. Die SphK-1 ist dazu nicht in der Lage. Deshalb ist es von besonderem Interesse, wie sich ein Ausschalten der Gene der Isoenzyme auf die Aggregationshemmung durch FTY 720 auswirkt.

Um dies zu analysieren, kommen SphK-1-KO, SphK-2-KO und SphK-1,2-WT-Mäuse zum Einsatz.

Die Thrombozyten der Versuchstiere werden mit FTY 720 für 20 Minuten inkubiert. Als Kontrolle wird DMSO in derselben Verdünnung, wie es als Lösungsmittel von FTY 720 verwendet wird, eingesetzt.

Um die Ergebnisse vergleichbar zu machen, werden alle Messwerte in Relation zur Kontrolle gesetzt. So könnte z.B. eine schlechtere Erregbarkeit von Thrombozyten durch Präparation die Ergebnisse verfälschen, was durch den Bezug auf die Kontrolle minimiert werden kann.

Die aggregometrischen Messungen, die in *Abbildung 40* und *Abbildung 41* dargestellt sind, verdeutlichen, dass bei Fehlen der SphK-2 der Effekt von FTY 720 deutlich eingeschränkt ist.

Bei beiden verwendeten FTY 720-Konzentrationen sinkt der hemmende Effekt von 37,1% bzw. 24,6% Aggregation beim Wildtyp auf 66,1% bzw. 44,1% wenn die SphK-2 fehlt.

Dies entspricht einer Reduktion der Aggregationshemmung bei SphK-2-KO um 44% gegenüber dem Wildtyp.

Versuch mit FTY 720 50  $\mu\text{M}$

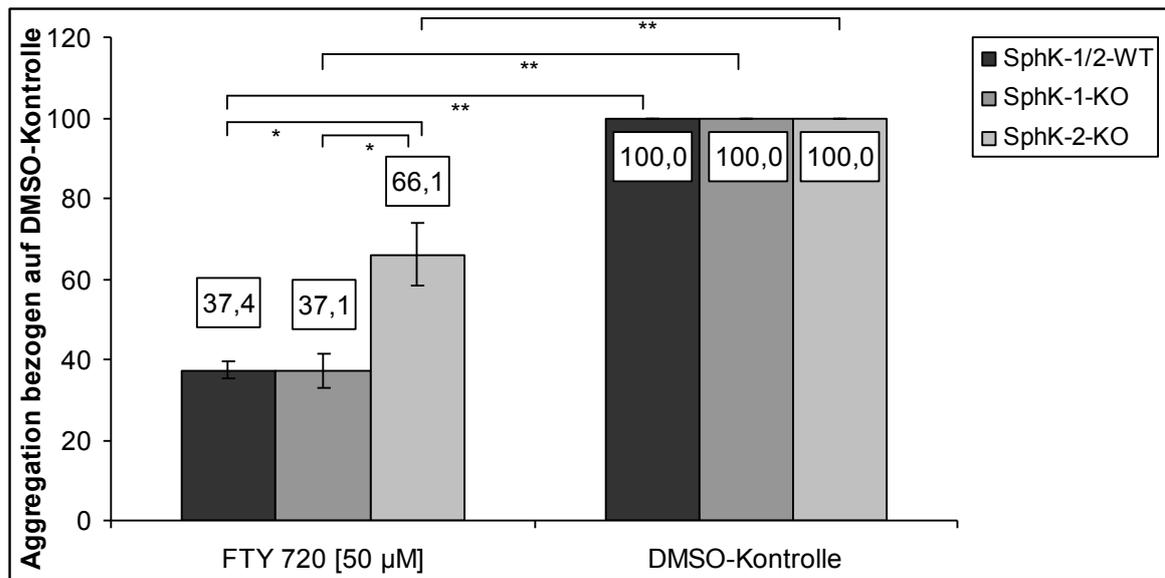


Abbildung 40: Aggregation muriner Thrombozyten (BALB/c) mit FTY 720 50  $\mu\text{M}$

Versuch mit FTY 720 100  $\mu\text{M}$

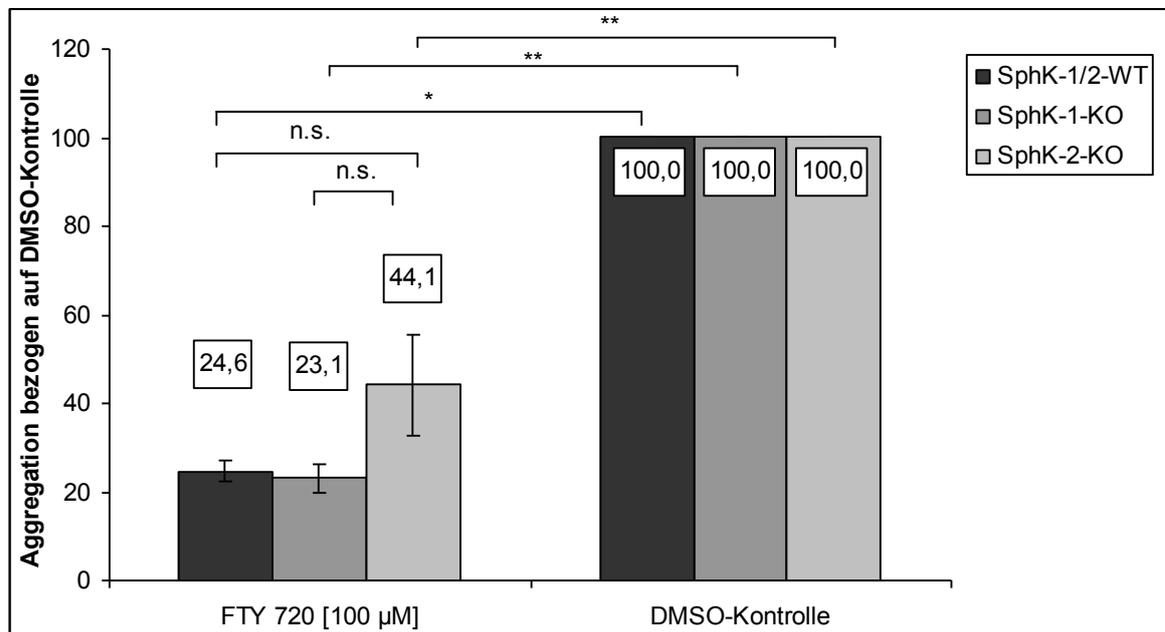


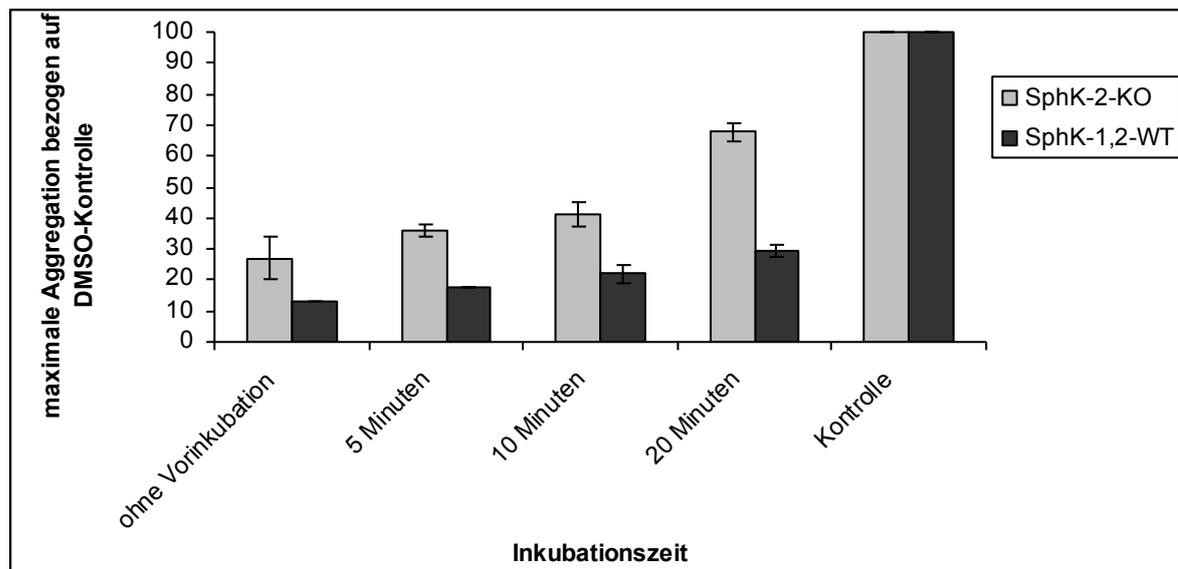
Abbildung 41: Aggregation muriner Thrombozyten (BALB/c) mit FTY 720 100  $\mu\text{M}$

### 3.2.1.1 Einfluss von 100 $\mu\text{M}$ FTY 720 auf die Aggregation von SphK-KO und SphK-1,2-WT bei Variation der Inkubationszeiten

Beim vorangegangenen Versuch wurde eine Inkubationszeit von 20 Minuten untersucht. Um zu analysieren, wie sich die Aggregationshemmung verändert durch Variation der Inkubationszeit, werden die Thrombozyten verschiedener Versuchstiergruppen (SphK-1-KO, SphK-2-KO und SphK-1,2-WT) mit FTY 720 100  $\mu\text{M}$  unterschiedlich lange inkubiert.

Es zeigt sich in *Abbildung 42*, dass die Aggregationshemmung durch FTY 720 stark sinkt, je länger die Inkubationszeit ist. Im Vergleich dazu zeichnet sich der Wildtyp durch eine leichte Abnahme aus bei Verlängerung der Inkubation.

Zu jedem Messzeitpunkt ist der Effekt von FTY 720 beim Fehlen der SphK-2 deutlich geringer ausgeprägt.



*Abbildung 42: Aggregation muriner Thrombozyten (BALB/c) mit FTY 720 [100  $\mu\text{M}$ ]*

Ähnliche Ergebnisse zeigen sich bei höherer Thrombozyten-Konzentration bei den drei Tiergruppen (*Abbildung 43*). Die Aggregationshemmung durch FTY 720 ist bei SphK-2-KO-Mäusen am geringsten ausgeprägt und nimmt über den Zeitverlauf ab. Der Hemmeffekt ist bei den anderen beiden Tiergruppen, mit regelrecht exprimierter SphK-2 vergleichbar.

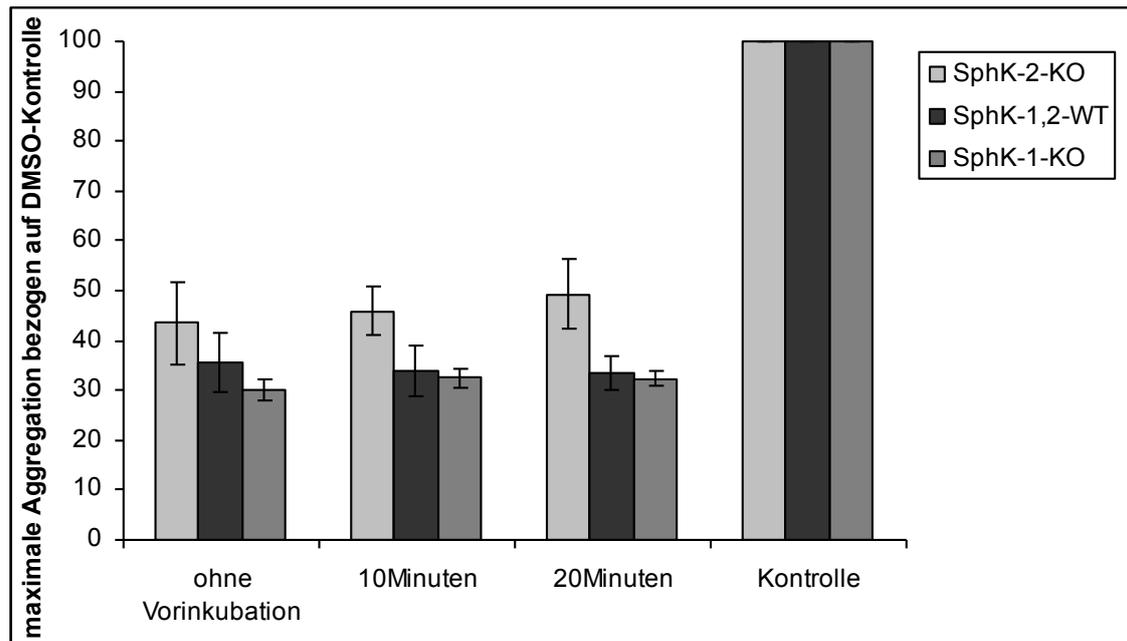


Abbildung 43: Aggregation muriner Thrombozyten (BALB/c) mit FTY 720 100  $\mu$ M

Es zeigt sich also, dass eine Phosphorylierung von FTY 720 insbesondere bei langer Inkubationszeit eine Rolle spielt.

### 3.3 Versuche mit Mäusen auf C57Bl6-Hintergrund

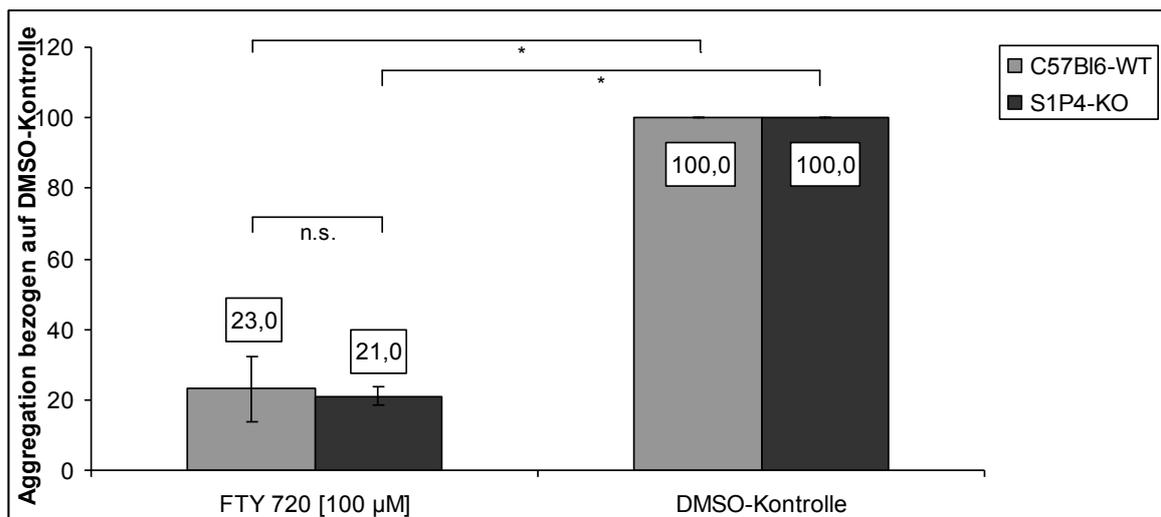
#### 3.3.1 Rolle des S1P<sub>4</sub>-Rezeptors für die Aggregation mit FTY 720

Die Rolle des S1P<sub>1</sub>-, S1P<sub>2</sub>- und S1P<sub>3</sub>-Rezeptors für die Aggregationshemmung wurde in 3.1.2 und 3.1.3 ausgetestet. Um den Einfluss des S1P<sub>4</sub>-Rezeptors zu analysieren, werden Mäuse verwendet, bei denen das Gen für den Rezeptor ausgeschaltet ist. Zum Vergleich werden Rezeptor-Wildtypen eingesetzt.

Die Thrombozyten der beiden Versuchstiergruppen werden mit FTY 720 für 20 Minuten inkubiert. Das Lösungsmittel in derselben Verdünnung dient zur Kontrolle.

FTY 720 wird in den Konzentrationen 100 µM (*Abbildung 44*) und 50 µM (*Abbildung 45*) eingesetzt.

Unabhängig von dieser Konzentration und dem Vorhandensein des S1P<sub>4</sub>-Rezeptors zeigen beide Versuchstiergruppen dasselbe Reaktionsmuster.



*Abbildung 44: Aggregation muriner Thrombozyten (C57Bl6) von S1P<sub>4</sub>-KO und Wildtyp mit FTY 720 100 µM*

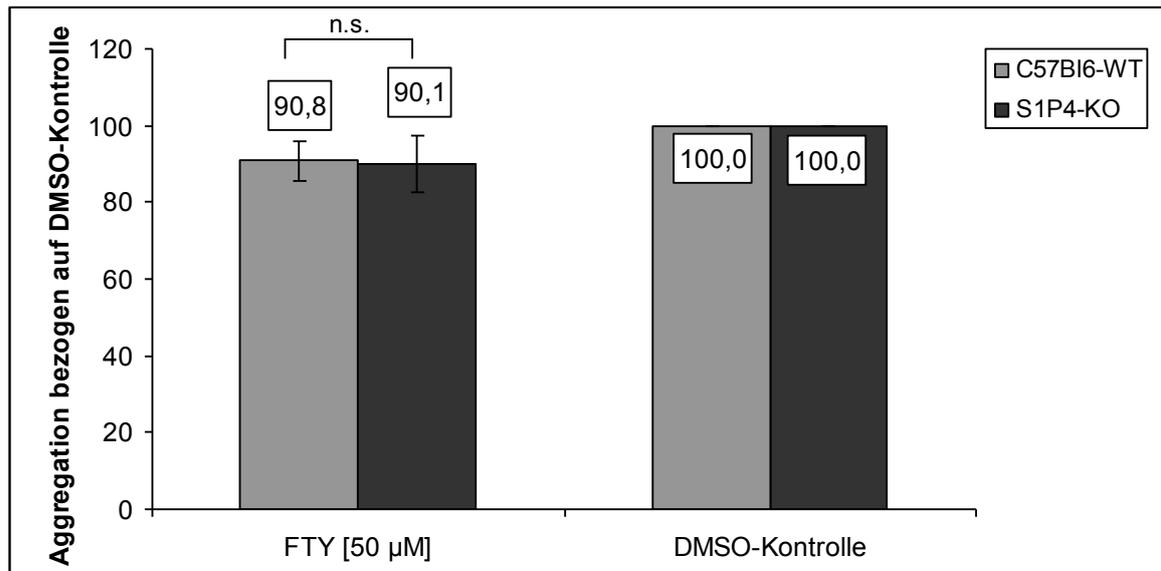


Abbildung 45: Aggregation muriner Thrombozyten (C57Bl6) von S1P4-KO und Wildtyp mit FTY 720 50 µM

### 3.3.2 Rolle des S1P<sub>4</sub>-Rezeptors für die Aggregation mit S1P

Der Einfluss des S1P<sub>1</sub>-, S1P<sub>2</sub>- und S1P<sub>3</sub>-Rezeptors auf die Aggregationshemmung durch S1P wurde in 3.1.6 und 3.1.7 getestet. Um die Einfluss des S1P<sub>4</sub>-Rezeptors zu analysieren, werden S1P<sub>4</sub>-Rezeptor-KO-Mäuse verwendet. Zum Vergleich werden wiederum Rezeptor-Wildtypen eingesetzt.

Die Thrombozyten der beiden Versuchstiergruppen werden mit S1P 100 µM für 20 Minuten inkubiert. Das Lösungsmittel Methanol/Morpholine in derselben Verdünnung dient zur Kontrolle.

Die aggregometrische Messung, deren Ergebnisse in *Abbildung 46* dargestellt sind, macht deutlich, dass kein Unterschied in der S1P-Wirkung zwischen S1P<sub>4</sub>-KO und Wildtyp vorhanden ist. Ein Fehlen des S1P<sub>4</sub>-Rezeptors scheint die aggregationshemmende Wirkung von S1P 100 µM nicht zu beeinträchtigen.

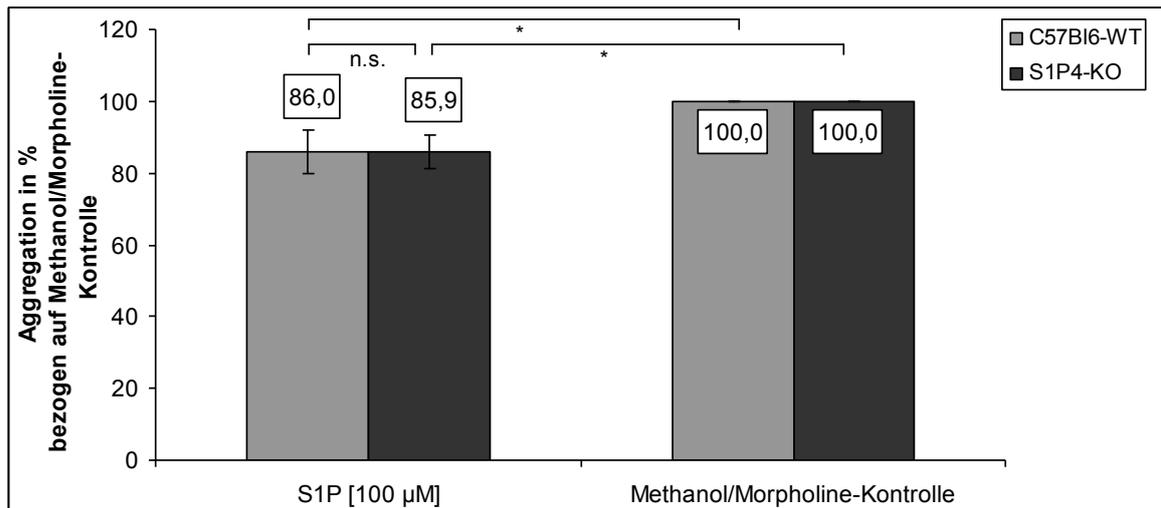


Abbildung 46: Aggregation muriner Thrombozyten (C57Bl6) von S1P<sub>4</sub>-KO und Wildtyp mit S1P 100 µM

### 3.3.3 Rolle der SphK-1 und SphK-2 für die Aggregation mit Sphingosin

Analog zum Versuch 3.2.1 wird der Einfluss der beiden Isoenzyme auf die Aggregationshemmung durch Sphingosin analysiert.

Thrombozyten von SphK-1-KO-, SphK-2-KO- und SphK-1,2-WT-Mäusen werden mit Sphingosin 50 µM für 20 Minuten inkubiert.

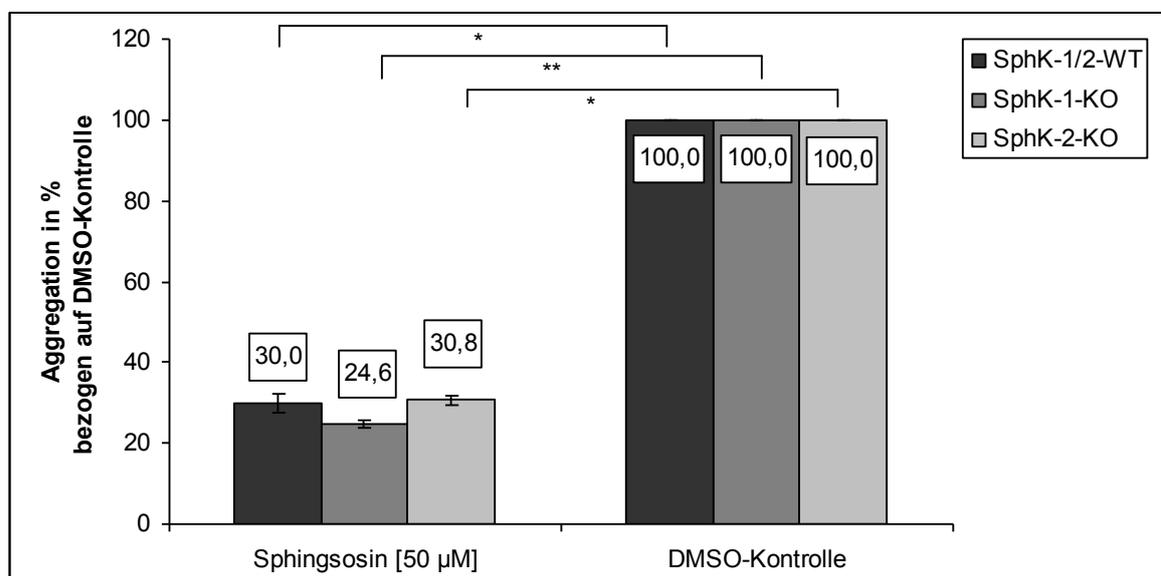


Abbildung 47: Aggregation muriner Thrombozyten (C57Bl6) mit Sphingosin 50 µM

Die drei Versuchstiergruppen zeigen geringe Unterschiede im Aggregationsverhalten unter dem Einfluss von Sphingosin 50 µM.

Die beiden Enzyme SphK-1 und -2 sind in der Lage Sphingosin zu phosphorylieren. Ein Fehlen einer der Kinasen scheint demnach keine Rolle für den aggregationshemmenden Effekt von Sphingosin in Thrombozyten zu spielen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Ergebnisse, Limitationen und Ausblicke der vorliegenden Arbeit

Die durchgeführten Versuche lassen sich in folgende drei Gruppen unterteilen:

- Versuche mit den Substanzen FTY 720, Sphingosin und S1P mit unterschiedlichen Konzentrationen und Inkubationszeiten;
- Versuche zur Identifikation eines wirkungsvermittelnden Rezeptors;
- Versuche zur Bestimmung der Rolle der Isoenzyme SphK-1 und -2 für die Aggregationshemmung durch FTY 720 und Sphingosin;

In den Experimenten mit den drei oben genannten Substanzen zeigt sich eine signifikante Aggregationshemmung in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen. Bei FTY 720 tritt diese ab 20  $\mu\text{M}$  auf, bei Sphingosin ab 1  $\mu\text{M}$  und bei S1P ab 50  $\mu\text{M}$ . Die unterschiedlichen Konzentrationen können sowohl durch die verschiedenen Lösungsmittel, aber auch durch die unterschiedliche Affinität zu den S1P-Rezeptoren oder Halbwertzeiten der Substanzen begründet sein.

Im Zeit-Wirkungsprofil zeigen FTY 720 und Sphingosin ein ähnliches Muster. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 10 bzw. 20 Minuten führt zu einer signifikanten Zunahme der Aggregationshemmung. Kürzere Inkubationszeiten schränken die thrombozytäre Funktion weniger stark ein. Bei S1P, der phosphorylierten Form von Sphingosin, findet hingegen die stärkste Zunahme der Hemmung bei kurzer Inkubationsdauer statt. Eine weitere Verlängerung der Inkubationszeit führt zu keiner signifikanten Verstärkung des Effektes, oder gar zu dessen Abnahme. Das Wirkmaximum liegt im Bereich kurzer Inkubationszeiten. Eine potentielle Ursache für das unterschiedliche Zeit-Wirkungsprofil könnte die Phosphorylierung darstellen. Die beiden unphosphorylierten Substanzen FTY 720 und Sphingosin müssen zunächst phosphoryliert werden, bevor sie ihre Wirkung am S1P-Rezeptor entfalten können. Diese, durch Sphingosinkinasen katalysierte, und in Thrombozyten stattfindende Reaktion, benötigt Zeit. S1P hingegen kann direkt an den Rezeptor binden. Die Abnahme der Wirkung von S1P nach mehr als 20 Minuten Inkubation kann auf dessen kurze Halbwertszeit und den schnellen Abbau durch Phosphatasen zurückgeführt werden.

Bei den Versuchen zur Identifikation eines wirkungsvermittelnden Rezeptors kamen verschiedene Methoden zum Einsatz. Sowohl Rezeptorantagonisten als auch Thrombozyten von KO-Mäusen wurden verwendet. Als Rezeptorantagonisten wurden JTE-013, das den S1P<sub>2</sub>-Rezeptor blockiert, und VPC 23019, das an die S1P<sub>1</sub>- und S1P<sub>3</sub>-Rezeptoren bindet, eingesetzt. Zunächst wurde in Vorversuchen ausgeschlossen, dass diese Substanzen selbst die Aggregation hemmen. In den Experimenten wurden dann die Thrombozyten mit jeweils einem der Antagonisten inkubiert und anschließend mit FTY 720 oder S1P gehemmt.

JTE-013 beeinflusst die Aggregationshemmung durch die Rezeptoragonisten nicht. Der S1P<sub>2</sub>-Rezeptor scheint die Wirkung somit nicht zu vermitteln. Diese Ergebnisse sind auch vereinbar mit der Tatsache, dass FTY 720 nicht an diesen Rezeptor bindet.

Durch VPC 23019 wird der Effekt von FTY 720 abgeschwächt. Die Aggregationshemmung ist bei Blockade der S1P<sub>1</sub>- und S1P<sub>3</sub>-Rezeptoren weniger stark ausgeprägt. Zudem besteht eine Dosis-Wirkungsbeziehung: die Wirkung des Rezeptoragonisten wird umso stärker gemindert, je höher die Konzentration von VPC 23019 ist. Es sind zwei Hypothesen denkbar, warum sich die Aggregationshemmung durch Zugabe des Rezeptorantagonisten nicht gänzlich verhindert wird: Zum Einen handelt es sich bei VPC 23019 um einen kompetitiven Antagonisten. Die Substanz konkurriert also um die Bindungsstelle am Rezeptor mit dem Agonisten. Gibt man Letzteren in hoher Konzentration hinzu, kann die Blockade aufgehoben werden. Zum Zweiten kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass die Wirkung noch zusätzlich über weitere S1P-Rezeptoren oder rezeptorunabhängig vermittelt wird. Eine Abschwächung der S1P-Wirkung ist in diesen Versuchen erkennbar, jedoch statistisch nicht signifikant.

Zur Untersuchung des S1P<sub>4</sub>-Rezeptors werden die Thrombozyten von KO-Mäusen verwendet und mit Wildtyp-Thrombozyten verglichen, wobei beide Gruppen mit FTY 720 bzw. S1P inkubiert werden. Unterschiede im aggregationshemmenden Effekt wären so hinweisend auf eine Beteiligung des Rezeptors. Dies ließ sich in den dargestellten Versuchen nicht nachweisen.

Die Experimente zur Bestimmung der Rolle der Isoenzyme SphK-1 und -2 für die Aggregationshemmung durch FTY 720 und Sphingosin wurden mit SphK-KO-Mäusen durchgeführt. Während die Wirkung von Sphingosin

weitgehend unbeeinflusst bleibt, führt ein Mangel an SphK-2 zu einer signifikanten Reduktion der Aggregationshemmung durch FTY 720. Dies ist dadurch erklärbar, dass nur SphK-2 die Phosphorylierung von FTY 720 katalysiert. Die SphK-1 ist dazu nicht in der Lage. Fehlt SphK-2, kann kein FTY 720-Phosphat entstehen, das an den Rezeptor bindet. Es ist zu beachten, dass FTY 720 dennoch die Aggregation beeinflusst, obwohl theoretisch kein FTY 720-Phosphat gebildet werden kann. Das legt die Vermutung nahe, dass FTY 720 einen Teil seiner aggregationshemmenden Wirkung rezeptorunabhängig vermittelt.

Bei allen aufgeführten Versuchen handelt es sich um in vitro-Experimente. Eine Übertragung der Daten auf die Bedingungen im lebenden Organismus ist nur mit Einschränkungen möglich. Gleiches gilt für die Vergleichbarkeit von Ergebnissen mit murinen Blutplättchen und denen des Menschen.

Da gewaschene Thrombozyten verwendet wurden, sind komplexe Interaktionen mit anderen Zellen oder Serumbestandteilen nicht möglich. Versuche mit Vollblut und in-vivo-Experimente wären eine sinnvolle Fortführung, um den Effekt der Sphingolipide auf Thrombozyten zu erforschen.

Es wurden sehr hohe Konzentrationen von Kollagen und Thrombin verwendet, um eine maximale, irreversible Aggregation zu erreichen und mögliche Hemmeffekte darstellen zu können. Eine Verringerung der Konzentration der eingesetzten Aggregantien auf ein physiologisches Niveau würde möglicherweise einen Hemmeffekt schon bei geringeren Konzentrationen der S1P-Rezeptoragonisten bewirken.

Die Suche nach den S1P-Rezeptoren, die die Aggregationshemmung der Thrombozyten vermitteln, gestaltet sich schwierig. In der vorliegenden Arbeit wurden hierzu verschiedene Methoden verwendet. Zum einen wurden unterschiedliche Inkubationszeiten getestet, um die Relevanz von Rezeptor-unabhängigen Wirkungen auf die Aggregation zu untersuchen. Außerdem wurden S1P-Rezeptorantagonisten eingesetzt. Als dritte Methode wurden S1P<sub>4</sub>-KO-Mäuse verwendet.

Dennoch bleibt es schwierig eine klare Aussage über die wirkungsvermittelnden Rezeptoren zu treffen. Viele spezifische Rezeptoragonisten und -antagonisten

wurden erst in der letzten Zeit entwickelt, oder sind noch nicht erhältlich. Experimente mit dem S1P<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten VPC 44116 wären eine denkbare Erweiterung der Versuche mit VPC 23019, um zwischen den beiden blockierten Rezeptorsubtypen unterscheiden zu können.

Aufgrund der komplexen Interaktionen von S1P und seinen Rezeptoren mit anderen Rezeptoren, wie dem PDGF-Rezeptor, sind genaue Aussagen über den Wirkungsmechanismus und die Interpretation der Ergebnisse schwierig.

## 4.2 Der Effekt von S1P auf die Atherosklerose

Die Atherosklerose spielt eine wichtige Rolle in der modernen Medizin. Sie ist entscheidend beteiligt an der Pathogenese von Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems. Diese Relevanz spiegelt sich auch in der Todesursachenstatistik des Jahres 2009 wider. Die häufigste Todesursache waren wie schon in den Vorjahren kardiovaskuläre Erkrankungen, die bei 42% der Verstorbenen zum Tod führten. Bei genauerer Betrachtung der zehn häufigsten ursächlichen Erkrankungen, die tödlich endeten, finden sich an erster und zweiter Stelle die chronisch ischämische Herzkrankheit und der akute Myokardinfarkt mit anteilig 8,6% respektive 6,6%. Den fünften Rang in der Statistik nimmt mit 3,0% der Schlaganfall ein. [53], [54]

Atherosklerose ist eine systemische Entzündungsreaktion. An Stellen gestörter Integrität des Endothels, z.B. an Stellen mit hohen Scherkräften, durchwandern Lipoproteine wie low-density Lipoprotein (LDL) die innerste Zellschicht der Gefäße. Es kommt zur subendothelialen Akkumulation von Lipiden in den Gefäßwänden von Arterien. Ein Atherom (fatty streak) entsteht. Glatte Muskelzellen proliferieren, bilden extrazelluläre Matrix. Diese fibrinöse Kappe bedeckt das Atherom, eine fibrinöse Plaque entsteht. Im Rahmen der Entzündungsreaktion kommt es zur Einwanderung von Monozyten und Lymphozyten in die Intima von großen Arterien. [32], [37]

An dieser Entzündungsreaktion sind Thrombozyten beteiligt. Sie sind in der Lage an das Endothel zu binden. Hierfür spielen GP Iba und GPIIb/IIIa eine entscheidende Rolle. Diese vermitteln die Bindung zu P-Selektin und vWF, die auf der Oberfläche von aktivierten Endothelzellen zu finden sind. Diese Adhäsion führt zur Freisetzung von zahlreichen proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen wie IL-1 $\beta$ , CD40L und RANTES. Diese führen zu einer verstärkten Expression von

vascular cytosolic adhesion molecule VCAM-1 und monocyte chemoattractant protein MCP-1 auf Endothelzellen, die eine Rekrutierung von Monozyten bewirken. [32], [37]

Die Monozyten migrieren durch das Endothel und differenzieren sich zu Makrophagen. Diese phagozytieren Lipide, vor allem oxidiertes LDL, und werden dadurch zu Schaumzellen (foam cells), die im weiteren Verlauf absterben. Ist die fibrinöse Kappe besonders dünn und sammeln sich viele Entzündungszellen an, handelt es sich um eine vulnerable Plaque, die besonders gefährdet ist, zu rupturieren. Bei einer Ruptur oder Erosion wird subendotheliale Matrix, wie z. B. der tissue factor, freigesetzt. Vorbeifließende Thrombozyten adhären und aggregieren. Das plasmatische Gerinnungssystem wird aktiviert. Ein Thrombus aus Thrombozyten und quervernetztem Fibrin bildet sich. Dieser kann das Lumen einengen oder sogar okkludieren. Klinisch können sich Schlaganfälle, eine periphere arterielle Verschlusskrankheit, eine koronare Herzerkrankung oder Herzinfarkte manifestieren. [32], [37]

Thrombozyten spielen also sowohl in der früheren atherosklerotischen Läsion im Rahmen der Entzündungsreaktion, als auch in späteren Stadien bei der Thrombusbildung eine zentrale Rolle. [32], [37]

Die Rolle von S1P und FTY 720 für die Atherosklerose wurde bereits in verschiedenen Arbeiten untersucht.

S1P ist im Plasma an Lipoproteine, vor allem an high-density Lipoprotein (HDL) gebunden. HDL selbst kann der Atherosklerose entgegenwirken. Das daran gebundene S1P vermittelt zusätzlich anti-entzündliche und anti-atherosklerotische Effekte. Es aktiviert über den S1P<sub>3</sub>-Rezeptor die endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS) und setzt somit Stickstoffmonoxid frei. Dieses bewirkt eine Vasodilatation und wirkt anti-inflammatorisch. [39], [58]

Das Endothel wird auf verschiedenste Weisen von S1P beeinflusst. Das Sphingolipid bewirkt eine Abnahme der Permeabilität der Endothelzellen, die Barrierefunktion des Endothels nimmt zu. Es resultiert ein Rückgang der Diapedese von Zellen wie Monozyten und Lymphozyten, die an der Atherosklerose beteiligt sind. Die Entstehung von atherosklerotischen Läsionen ist behindert. [58], [22]

Außerdem wird die TNF  $\alpha$ -vermittelte Adhäsion von Monozyten an das Endothel durch S1P vermindert. Zusätzlich kann S1P die Sekretion von MCP-1 vermindern.

Die Rekrutierung dieser Zellen zur atherosklerotischen Läsion ist beeinflusst. [9], [58]

Die Adhäsion von Leukozyten wird durch S1P vermindert, indem VCAM-1 reduziert wird. [58]

Endotheliale Dysfunktion und Apoptose von Endothelzellen sind Schlüsselmechanismen, die zu Plaquerosion und intravaskulärer Thrombose führen können. Durch S1P werden zwei entscheidende Mechanismen verstärkt, die der Apoptose von Endothelzellen entgegenwirken. Wie oben erwähnt, führt S1P zur Produktion von NO, das anti-apoptotisch auf Endothelzellen wirkt. Außerdem schützt die Zugabe von S1P die Endothelzellen vor TNF  $\alpha$ -induziertem Zelltod. [58]

Die glatten Muskelzellen in der atherosklerotischen Läsion sind entscheidender Bestandteil der Pathophysiologie. An den Stellen atherosklerotisch veränderter Gefäßwand findet sich eine hohe Expression von S1P<sub>1</sub>-Rezeptoren. Die Migration der glatten Muskelzellen wird durch S1P an eben diesen Rezeptor vermittelt. [30]

S1P kann die Weite von Gefäßen auf verschiedene Arten beeinflussen. Die Applikation von S1P führt zur Konstriktion der Basilararterien, den zerebralen Gefäßen und den Koronarien. Keine bzw. geringe Engstellung geschieht an der Aorta. S1P hat größeren Einfluss auf die kontraktile Funktion von Widerstandgefäßen als auf die von Windkesselgefäßen. Enggestellte Gefäße können sich hingegen unter dem Einfluss von S1P dilatieren. [58]

In den dargestellten Versuchen zeigt sich, dass S1P einen Effekt auf die Funktion von Thrombozyten hat, die ebenfalls an der Atherosklerose beteiligt sind. In vitro bewirkt S1P in einem Konzentrationsbereich ab 50  $\mu$ M eine Aggregationshemmung gewaschener Thrombozyten. Dieser Effekt setzt schon bei kurzer Inkubation der Blutplättchen mit S1P ein. Wird Sphingosin, das erst nach Phosphorylierung an die S1P-Rezeptoren bindet, den Thrombozyten zugesetzt, sind längere Inkubationszeiten nötig.

#### 4.3 Der Effekt von FTY 720 auf die Atherosklerose

FTY 720 kann an die S1P<sub>1</sub>-, -<sub>3</sub>-, -<sub>4</sub>- und -<sub>5</sub>-Rezeptoren binden. Im kardiovaskulären System sind vor allem S1P<sub>1</sub>- und S1P<sub>3</sub>-Rezeptoren von großer Relevanz.

Diese Subtypen sind auf Endothelzellen zu finden. Wie auch S1P selbst, kann der S1P-Rezeptoragonist FTY 720 die endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS) aktivieren. Dies führt zu einer Vasorelaxation der enggestellten Aorta. Dieser Effekt wird über den S1P<sub>3</sub>-Rezeptor vermittelt. [59], [58]

Außerdem ist FTY 720-Phosphat in der Lage, die Migration und das Überleben von Endothelzellen zu erhöhen. [63], [12], [58]

Apolipoprotein E-defizienten Mäuse, die mit einer Cholesterindiät gefüttert werden, stellen ein Modell für die Atherosklerose dar. In Versuchen mit eben diesen Tieren wurden die Mäuse für 20 Wochen mit FTY 720 behandelt. Es zeigte sich, dass das Volumen der atherosklerotischen Läsion um mehr als 50 % abnahm. Die Anzahl von Makrophagen in diesem Bereich reduzierte sich und die Bildung von MCP-1 wurde verringert. [29], [58]

Ein weiterer experimenteller Ansatz verdeutlicht den Effekt von FTY 720 auf die Initiation und Progression von Atherosklerose. Bei Mäusen, die nach einer Herztransplantation FTY 720 erhielten, war das transplantierte Herz länger funktionsfähig (graft survival) und zeigte ein verlangsamtes Fortschreiten von Atherosklerose. Hier sind jedoch die immunsuppressiven Effekte des S1P-Rezeptoragonisten nicht außer Acht zu lassen. [26], [58]

In den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen ließ sich ein hemmender Effekt von FTY 720 auf die Thrombozytenfunktion nachweisen. Ab einer Konzentration von 20 µM wurde die Aggregation beeinflusst. Dieser Effekt wurde durch längere Inkubationszeit noch verstärkt. Die Versuche mit S1P-Rezeptorantagonisten lassen vermuten, dass an der Wirkungsvermittlung von FTY 720 die S1P<sub>1</sub>- und S1P<sub>3</sub>-Rezeptoren beteiligt sind. S1P<sub>2</sub>- und S1P<sub>4</sub>-Rezeptoren scheinen keinen Einfluss zu haben.

#### 4.4 Klinischer Einsatz von FTY 720

Die Wirksamkeit von FTY 720 im klinischen Einsatz wurde in zwei unterschiedlichen Bereichen untersucht.

Mehrere Studien befassten sich mit dem Einsatz von FTY 720 als Immunsuppressivum nach Nierentransplantation. Eine Phase II Studie verglich zwei Patientengruppen nach Transplantation: Eine Gruppe erhielt FTY 720, die andere Mycophenolatmofetil (MMF), beide in Kombination mit Ciclosporin A und

Corticosteroiden. FTY 720 zeigt eine gute Wirksamkeit in einer Dosierung von 2,5 mg und 5 mg bei oraler Gabe. [56], [10], [55]

In der Phase III konnte keine Überlegenheit der FTY 720-Therapie gegenüber dem Standardvorgehen bewiesen werden. Es wurden drei Gruppen verglichen: Eine Gruppe erhielt 2,5 mg FTY 720 mit der üblichen Dosierung von Ciclosporin A, die zweite Gruppe erhielt MMF und dieselbe Dosis von Ciclosporin A. In der dritten Gruppe wurde die Ciclosporin A-Dosis halbiert und 5 mg FTY 720 verabreicht. Die beiden ersteren Gruppen zeigten vergleichbare Ergebnisse bezüglich der Häufigkeit von Abstoßungsreaktionen. Das 5 mg FTY 720-Regime musste abgebrochen werden, da es vermehrt zu akuten Abstoßungsreaktionen kam. Die Behandlung mit dem S1P-Rezeptoragonisten führte zu einer niedrigeren Kreatinin-Clearance und einer höheren Inzidenz von Makulaödemen. [57], [10], [55], [47],

Ein vielversprechender Einsatzbereich von FTY 720 scheint die Multiple Sklerose zu sein. In der Phase II klinischer Studien wurden drei Patientengruppen verglichen, die FTY 720 in einer Dosis von 1,25 mg bzw. 5 mg erhielten gegenüber einer Placebogruppe. In der Magnetresonanztomographie kam es zu signifikanten Reduktion der Anzahl typischer Läsionen im zentralen Nervensystem. Außerdem war die jährliche Rückfallrate niedriger in den FTY 720-Gruppen. Als unerwünschte Wirkungen traten Herpes zoster und Enterocolitis auf. Es kam zu einem kurzfristigen Absinken der Herzfrequenz nach der ersten Gabe, die sich im weiteren Verlauf normalisierte. Der mittlere Blutdruck war dauerhaft um 4-6 mmHg höher als der Ursprungswert. In der 5 mg-Gruppe kam es zusätzlich zu einem Abfall der forcierten Einsekundenkapazität FEV1 und gehäuften Infekten der oberen Atemwege, die sich in der Niedrigdosisgruppe nicht nachweisen ließen. In der Phase III Studie „FTY 720 Research Evaluation Effects of Daily Oral Therapy in Multiple Sclerosis“ (FREEDOMS) werden nur Dosen von 0,5 mg und 1,25 mg untersucht, da die höhere Dosierung von 5 mg in Phase II keine Überlegenheit zeigte. [28], [10], [36]

In der klinischen Anwendung von FTY 720 als anti-thrombotischer und anti-atherosklerotischer Wirkstoff könnte der immunsuppressive Effekt ein Problem darstellen. Ein S1P-Rezeptoragonist, der selektiv Thrombozyten und das Gefäßsystem beeinflusst ohne eine Immunsuppression zu bewirken, wäre eine vielversprechende Entwicklung.

## 5 Zusammenfassung

Sphingosin und Sphingosin-1-Phosphat (S1P) sind wichtige Signalmoleküle in verschiedenen zellulären Prozessen. Thrombozyten spielen eine entscheidende Rolle im Sphingolipid-Metabolismus. Sie tragen zur Entstehung von S1P bei und sind der Hauptort der Phosphorylierung des Rezeptoragonisten FTY 720. Ob Sphingolipide die Thrombozytenfunktion beeinflussen ist jedoch nicht geklärt. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir den direkten Einfluss von Sphingolipiden sowie die Modulation von S1P-Rezeptoren auf die Funktion humaner und muriner Thrombozyten.

Es zeigte sich, dass die gemeinsame Stimulation der S1P-Rezeptoren S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>3</sub>, S1P<sub>4</sub> und S1P<sub>5</sub> durch FTY 720 zu einer signifikanten Hemmung der Aggregation humaner Thrombozyten führt. Dieser Effekt ist abhängig von der Inkubationszeit, vermutlich weil FTY 720 während der Inkubation von Thrombozyten selbst in die phosphorylierte aktive Form umgewandelt wird. Die Phosphorylierung und Aktivierung von FTY 720 wird durch Sphingosinkinasen (SphK) vermittelt. In Untersuchungen an SphK-1- und SphK-2-defizienten Mäusen zeigte sich, dass die Anwesenheit von SphK-2 in Thrombozyten für die Effekte von FTY 720 von wesentlicher Bedeutung ist. Die aggregationshemmende Wirkung von FTY 720 wird durch vorangehende kombinierte Blockade der S1P<sub>1</sub>- und S1P<sub>3</sub>-Rezeptoren konzentrationsabhängig abgeschwächt. Hingegen wurde die Wirkung von FTY 720 nicht beeinflusst durch Antikörperblockade des S1P<sub>2</sub>-Rezeptors, oder durch Abwesenheit des S1P<sub>4</sub>-Rezeptors in KO-Mäusen. Abschließend ließ sich zeigen, dass auch die im menschlichen Organismus und insbesondere in der Blutbahn vorkommenden Sphingolipide, Sphingosin und S1P, die Thrombozytenfunktion hemmen. Im Gegensatz zu Sphingosin und FTY 720 bewirkt die phosphorylierte Form S1P bereits nach kurzer Inkubationszeit eine signifikante Aggregationshemmung.

Zusammenfassend zeigte sich in der vorliegenden Arbeit, dass die Funktion humaner und muriner Thrombozyten durch Stimulation von S1P-Rezeptoren entscheidend beeinflusst und deren Aggregation gehemmt wird. Der Effekt wird im Wesentlichen vermittelt durch die S1P<sub>1</sub>- und S1P<sub>3</sub>-Rezeptoren. Die erhobenen Daten erweitern unser bisheriges Verständnis zur Regulation der Thrombozytenfunktion und könnten auch bei pathologischen Prozessen wie der Atherosklerose eine Rolle spielen.

## 6 Summary

Sphingosine and Sphingosine-1-Phosphate (S1P) are important signalling molecules in various cellular processes. Thrombocytes play an essential role in the metabolism of sphingolipids. They contribute to the S1P supply in the body and they are the main source of FTY 720-phosphate. Yet, it is unresolved whether sphingolipids exert influence on the function of thrombocytes. In the present experiments we analysed the impact of sphingolipids and modulation of S1P-receptors on the function of human and murine thrombocytes.

The results demonstrate that a combined stimulation of S1P-receptors S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>3</sub>, S1P<sub>4</sub> and S1P<sub>5</sub> by FTY 720 causes a significant reduction of aggregation of human thrombocytes. This effect correlates with the duration of incubation. This might be due to the fact that FTY 720 is phosphorylated during incubation by thrombocytes and therefore converted to its active form. Phosphorylation and activation of FTY 720 is mediated by sphingosinekinases (SphK). The experiments on SphK-1- and SphK-2-deficient mice illustrate the crucial role of SphK-2 in thrombocytes for the effects of FTY 720. The inhibition of aggregation by FTY 720 is reduced by previous combined blocking of both S1P<sub>1</sub>- and S1P<sub>3</sub>- receptors. In contrast, a blockade of S1P<sub>2</sub>-receptors or a lack of S1P<sub>4</sub>-receptors in KO-mice did not modify the impact of FTY 720 on thrombocyte function. Finally, the results indicate that the sphingolipids, sphingosine and S1P, which can be found in the human organism, particularly in the blood, impair thrombocyte function. In contrast to sphingosine and FTY 720 the phosphorylated S1P causes a significant inhibition of aggregation already after short incubation.

In summary, we determined that the function of human and murine thrombocytes is influenced by stimulation of S1P-receptors. Aggregation is inhibited. Mainly this effect is mediated by S1P<sub>1</sub>- und S1P<sub>3</sub>- receptors. The compiled data contribute to our understanding of the regulation of thrombocyte function and may in future be important for pathological processes such as atherosclerosis.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

ABC-Transporter	ATP-bindende Cassette-Transporter
ACD	Acid Citrat-Dextrose
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	cluster of differentiation
CSF	colony stimulating factor
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDG	endotheliale Differenzierungsgene
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase
entspr.	entsprechend
GP	Glycoprotein
HDL	high density lipoprotein
IL	Interleukin
KO	knock out
LDL	low density lipoprotein
MCP	monocyte chemoattractant protein
MMF	Mycophenolatmofetil
NF-E2	nuclear factor erythroid derived 2
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
PAR	Protease aktivierter Rezeptor
PDGF	Platelet-derived growth factor
rpm	revolutions per minute
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SPP	S1P-Phosphatasen
SphK	Sphingosinkinase
TNF	Tumor Nekrose Faktor
VCAM	vascular cytosolic adhesion molecule
VEGF	vascular endothelial growth factor
vWF	von-Willebrandt-Faktor

## 8 Abbildungsverzeichnis

*Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Darstellung eines Thrombozyten 24.000 fache Vergrößerung; Darstellung modifiziert nach [64]*

*Abbildung 2: Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten an einer Gefäßläsion; Darstellung modifiziert nach [18]*

*Abbildung 3: Struktur und Synthese der bioaktiven Sphingolipid-Metaboliten; Darstellung aus [46]*

*Abbildung 4: S1P-Rezeptoren: Kopplung an G-Proteine und deren Signalwege [10]*

*Abbildung 5: Sphingolipid-Metabolismus und Entzündungsreaktion; Darstellung modifiziert nach [10]*

*Abbildung 6: Modell zur Regulation der Barrierefunktion des Endothels durch S1P; Darstellung aus [10]*

*Abbildung 7: Internalisierung des S1P1-Rezeptors durch FTY 720 nach dessen Phosphorylierung durch SphK-2; Darstellung modifiziert nach [55]*

*Abbildung 8: Strukturformel von Dimethylsulfoxid*

*Abbildung 9: Strukturformel von D-Sphingosin*

*Abbildung 10: Strukturformel Spingosin-1-Phosphat*

*Abbildung 11: Strukturformel von FTY 720*

*Abbildung 12: Strukturformel von VPC 23019*

*Abbildung 13: Strukturformel von JTE-013*

*Abbildung 14: Schematischer Aufbau eines Aggregometers*

*Abbildung 15: Darstellung der Transmissionsänderung während der Aggregation; Darstellung modifiziert nach [23]*

*Abbildung 16: Beispiel einer Zellzählung muriner gewaschener Thrombozyten durch Sysmex Microcellcounter XE-2100*

*Abbildung 17: Aggregation humaner Thrombozyten mit FTY 720*

*Abbildung 18: Aggregation humaner Thrombozyten mit FTY 720*

*Abbildung 19: Aggregation humaner Thrombozyten mit FTY 720*

*Abbildung 20: Aggregation humaner Thrombozyten mit FTY 720*

*Abbildung 21: Aggregation humaner Thrombozyten mit FTY 720 und unterschiedlichen Inkubationszeiten bis 20 Minuten*

*Abbildung 22: Aggregation humaner Thrombozyten mit FTY 720 und unterschiedlichen Inkubationszeiten bis 60 Minuten*

*Abbildung 23: Zusammenfassung der Aggregationen humaner Thrombozyten mit FTY 720 und unterschiedlichen Inkubationszeiten bis 60 Minuten*

*Abbildung 24: Aggregation humaner Thrombozyten mit JTE-013*

*Abbildung 25: Aggregation humaner Thrombozyten mit JTE-013 und FTY 720*

*Abbildung 26: Aggregation humaner Thrombozyten mit JTE-013 und FTY 720*

*Abbildung 27: Aggregation humaner Thrombozyten mit VPC 23019*

*Abbildung 28: Aggregation humaner Thrombozyten mit VPC 23019 und FTY 720*

*Abbildung 29: Aggregation humaner Thrombozyten mit VPC 23019 und FTY 720*

*Abbildung 30: Aggregation humaner Thrombozyten mit Sphingosin*

*Abbildung 31: Aggregation humaner Thrombozyten mit Sphingosin 5  $\mu\text{M}$*

*Abbildung 32: Aggregation humaner Thrombozyten mit Sphingosin 5  $\mu\text{M}$*

*Abbildung 33: Aggregation humaner Thrombozyten mit S1P*

*Abbildung 34: Aggregation humaner Thrombozyten mit S1P 50  $\mu\text{M}$*

*Abbildung 35: Aggregation humaner Thrombozyten mit S1P 50  $\mu\text{M}$*

*Abbildung 36: Aggregation humaner Thrombozyten mit S1P 50  $\mu\text{M}$  und JTE-013*

*Abbildung 37: Aggregation humaner Thrombozyten mit S1P 100  $\mu\text{M}$  und JTE-013*

*Abbildung 38: Aggregation humaner Thrombozyten mit S1P 50  $\mu\text{M}$  und VPC 23019*

*Abbildung 39: Aggregation humaner Thrombozyten mit S1P 100  $\mu\text{M}$  und VPC 23019*

*Abbildung 40: Aggregation muriner Thrombozyten (BALB/c) mit FTY 720 50  $\mu\text{M}$*

*Abbildung 41: Aggregation muriner Thrombozyten (BALB/c) mit FTY 720 100  $\mu\text{M}$*

*Abbildung 42: Aggregation muriner Thrombozyten (BALB/c) mit FTY 720 [100  $\mu\text{M}$ ]*

*Abbildung 43: Aggregation muriner Thrombozyten (BALB/c) mit FTY 720 100  $\mu\text{M}$*

*Abbildung 44: Aggregation muriner Thrombozyten (C57Bl6) von S1P4-KO und Wildtyp mit FTY 720 100  $\mu\text{M}$*

*Abbildung 45: Aggregation muriner Thrombozyten (C57Bl6) von S1P4-KO und Wildtyp mit FTY 720 50  $\mu\text{M}$*

*Abbildung 46: Aggregation muriner Thrombozyten (C57Bl6) von S1P4-KO und Wildtyp mit S1P 100  $\mu\text{M}$*

*Abbildung 47: Aggregation muriner Thrombozyten (C57Bl6) mit Sphingosin 50  $\mu\text{M}$*

## 9 Tabellenverzeichnis

*Tabelle 1: Ausgewählte Wirkungen von S1P und deren zellulären Ansatzpunkte; Eigene Darstellung der Tabelle aus [10]*

*Tabelle 2: Affinitäten von FTY 720-Phosphat zu den S1P-Rezeptor-Subtypen*

*Tabelle 3: Technische Daten des Gerätes „Platelet Aggregation Profiler PAP-8E“*

*Tabelle 4: Schematischer Versuchsaufbau der Konzentrationsreihe von FTY 720 mit humanen Thrombozyten*

*Tabelle 5: Schematischer Versuchsaufbau des Vergleichs von Kollagen und Thrombin auf die Aggregation humaner Thrombozyten mit FTY 720*

*Tabelle 6: Schematischer Versuchsaufbau der FTY 720-Wirkung auf humane Thrombozyten im 20-minütigen Zeitverlauf*

*Tabelle 7: Schematischer Versuchsaufbau der FTY 720-Wirkung auf humane Thrombozyten im 60-minütigen Zeitverlauf*

*Tabelle 8: Versuchsparameter bei Inkubation humaner Thrombozyten mit JTE-013*

*Tabelle 9: Versuchsparameter der Inkubation humaner Thrombozyten mit JTE-013 und 20  $\mu$ M FTY 720*

*Tabelle 10: Versuchsparameter der Inkubation humaner Thrombozyten mit JTE-013 und 100  $\mu$ M FTY 720*

*Tabelle 11: Versuchsparameter bei Inkubation humaner Thrombozyten mit VPC 23019*

*Tabelle 12: Versuchsparameter der Inkubation humaner Thrombozyten mit VPC 23019 und 20  $\mu$ M FTY 720*

*Tabelle 13: Versuchsparameter der Inkubation humaner Thrombozyten mit VPC 23019 und 100  $\mu$ M FTY 720*

*Tabelle 14: Versuchsparameter der Konzentrationsreihe von Sphingosin und humaner Thrombozyten*

*Tabelle 15: Schematischer Versuchsaufbau der Sphingosin-Wirkung auf humane Thrombozyten im 20-minütigen Zeitverlauf*

*Tabelle 16: Versuchsparameter der Konzentrationsreihe von S1P und humanen Thrombozyten*

*Tabelle 17: Schematischer Versuchsaufbau der S1P-Wirkung auf humane Thrombozyten im 20-minütigen Zeitverlauf*

*Tabelle 18: Versuchsparmeter der Inkubation humaner Thrombozyten mit JTE-013 und 50  $\mu$ M S1P*

*Tabelle 19: Versuchsparmeter der Inkubation humaner Thrombozyten mit JTE-013 und 100  $\mu$ M S1P*

*Tabelle 20: Versuchsparmeter der Inkubation humaner Thrombozyten mit VPC 23019 und 50  $\mu$ M S1P*

*Tabelle 21: Versuchsparmeter der Inkubation humaner Thrombozyten mit VPC 23019 und 100  $\mu$ M S1P*

*Tabelle 22: Versuchsparmeter bei Inkubation der Thrombozyten von SphK-1-KO, SphK-2-KO und SphK-1,2-WT mit FTY 720 50  $\mu$ M*

*Tabelle 23: Versuchsparmeter bei Inkubation der Thrombozyten von SphK-1-KO, SphK-2-KO und SphK-1,2-WT mit FTY 720 100  $\mu$ M*

*Tabelle 24: Versuchsparmeter bei Inkubation von Thrombozyten von SphK-2-KO und SphK-1,2-WT mit FTY 720 über eine Zeit von 0 bis 20 Minuten*

*Tabelle 25: Versuchsparmeter bei Inkubation von Thrombozyten von SphK-1-KO, SphK-2-KO und SphK-1,2-WT mit FTY 720 über eine Zeit von 0 bis 20 Minuten*

*Tabelle 26: Versuchsparmeter bei Inkubation der Thrombozyten von S1P4-KO-Mäusen und dem zugehörigen Wildtyp mit FTY 720 100  $\mu$ M*

*Tabelle 27: Versuchsparmeter bei Inkubation der Thrombozyten von S1P4-KO-Mäusen und dem zugehörigen Wildtyp mit FTY 720 50  $\mu$ M*

*Tabelle 28: Versuchsparmeter bei Inkubation der Thrombozyten von S1P4-KO-Mäusen und dem zugehörigen Wildtyp mit S1P 100  $\mu$ M*

*Tabelle 29: Versuchsparmeter bei Inkubation der Thrombozyten von SphK-1-KO, SphK-2-KO und SphK-1,2-WT mit Sphingosin 50  $\mu$ M*

## 10 Literaturverzeichnis

- [1] Abrams, C. S.; Leung L. L. K. (2010): Platelet biology.  
<http://www.uptodate.com/online/content/topic.do?topicKey=platelet/7540>,  
 Stand: 04.01.2011.
- [2] Aktories, K.; Förstermann, U.; Hofmann, F. B.; Starke, K.: Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 9. Auflage: Urban & Fischer bei Elsevier GmbH. München (2004).
- [3] Albert, R.; Hinterding, K.; Brinkmann, V.; Guerini, D.; Müller-Hartweg, C.; Knecht, H.; Simeon, C.; Streiff, M.; Wagner, T.; Welzenbach, K.; Zécri, F.; Zollinger, M.; Cooke, N.; Francotte, E.: Novel immunomodulator FTY720 is phosphorylated in rats and humans to form a single stereoisomer. Identification, chemical proof, and biological characterization of the biologically active species and its enantiomer. *J. Med. Chem.* 48 (2005) 5373–5377.
- [4] Am Schulte Esch, J.; Bause, H.; Kochs, E.; Scholz, J.; Standl, T.; Werner, C.: Anästhesie. Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie (Duale Reihe). 3. Auflage: Georg Thieme Verlag KG. Stuttgart (2006).
- [5] Anada, Y.; Igarashi, Y.; Kihara, A.: The immunomodulator FTY720 is phosphorylated and released from platelets. *Eur. J. Pharmacol.* 568 (2007) 106–111.
- [6] Ancellin, N.; Colmont, C.; Su, J.; Li, Q.; Mittereder, N.; Chae, S.-S.; Stefansson, S.; Liao, G.; Hla, T.: Extracellular export of sphingosine kinase-1 enzyme. Sphingosine 1-phosphate generation and the induction of angiogenic vascular maturation. *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 6667–6675.
- [7] Ausschuss für Tierschutzbeauftragte in der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS) und Arbeitskreis 4 in der Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz: Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren. Fundstelle: <http://www.tierhyg.vetmed.uni-muenchen.de/tierschutz/tierschutzlinks/hinweise/index.html>.
- [8] Avanti Polar Lipids, I. (2011): VPC 23019.  
[http://www.avantilipids.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=803&Itemid=166&catnumber=857360](http://www.avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=803&Itemid=166&catnumber=857360), Stand: 13.01.2011.

- [9] Bolick, D. T.; Srinivasan, S.; Kim, K. W.; Hatley, M. E.; Clemens, J. J.; Whetzel, A.; Ferger, N.; Macdonald, T. L.; Davis, M. D.; Tsao, P. S.; Lynch, K. R.; Hedrick, C. C.: Sphingosine-1-phosphate prevents tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated monocyte adhesion to aortic endothelium in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 (2005) 976–981.
- [10] Brinkmann, V.: Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. *Pharmacol. Ther.* 115 (2007) 84–105.
- [11] Budde, U.: Diagnose von Funktionsstörungen der Thrombozyten mit Hilfe der Aggregometrie. *J Lab Med* 26 (2002) 564–571.
- [12] Butler, J.; Lana, D.; Round, O.; LaMontagne, K.: Functional characterization of sphingosine 1-phosphate receptor agonist in human endothelial cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 73 (2004) 29–45.
- [13] Cayman Chemical (2007): FTY720.  
<http://www.caymanchem.com/pdfs/10006292.pdf>, Stand: 04. 01.2011.
- [14] Cayman Chemical (2010): JTE-013.  
<http://www.caymanchem.com/pdfs/10009458.pdf>, Stand: 04.01.2011.
- [15] Cayman Chemical (2010): Sphingosine-1-phosphate.  
<http://www.caymanchem.com/pdfs/62570.pdf>, Stand: 04.01.2011.
- [16] Chalfant, C. E.; Spiegel, S.: Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling. *J. Cell. Sci.* 118 (2005) 4605–4612.
- [17] Classen, M.; Diehl, V.; Kochsiek, K.: *Innere Medizin*. München: Urban & Fischer bei Elsevier (2004).
- [18] Coutre S. (2011): Platelet biology. Platelet interactions.  
<http://www.uptodate.com/online/content/image.do?imageKey=HEME%2F9704%20interactions>, Stand: 04.01.2011.
- [19] Da Violante, G.; Zerrouk, N.; Richard, I.; Provot, G.; Chaumeil, J. C.; Arnaud, P.: Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. *Biol. Pharm. Bull.* 25 (2002) 1600–1603.
- [20] Davis, M. D.; Clemens, J. J.; Macdonald, T. L.; Lynch, K. R.: Sphingosine 1-phosphate analogs as receptor antagonists. *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 9833–9841.

- [21] Disanza, A.; Steffen, A.; Hertzog, M.; Frittoli, E.; Rottner, K.; Scita, G.: Actin polymerization machinery: the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement. *Cell. Mol. Life Sci.* 62 (2005) 955–970.
- [22] Garcia, J. G.; Liu, F.; Verin, A. D.; Birukova, A.; Dechert, M. A.; Gerthoffer, W. T.; Bamberg, J. R.; English, D.: Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *J. Clin. Invest.* 108 (2001) 689–701.
- [23] Gawaz, M.: *Das Blutplättchen. Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG (1999).
- [24] Hänel, P.; Andréani, P.; Gräler, M. H.: Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. *FASEB Journal* 21 (2007) 1202–1209.
- [25] Huwiler, A.; Pfeilschifter, J.: New players on the center stage: sphingosine 1-phosphate and its receptors as drug targets. *Biochem. Pharmacol.* 75 (2008) 1893–1900.
- [26] Hwang, M. W.; Matsumori, A.; Furukawa, Y.; Ono, K.; Okada, M.; Iwasaki, A.; Hara, M.; Sasayama, S.: FTY720, a new immunosuppressant, promotes long-term graft survival and inhibits the progression of graft coronary artery disease in a murine model of cardiac transplantation. *Circulation* 100 (1999) 1322–1329.
- [27] Ito, K.; Anada, Y.; Tani, M.; Ikeda, M.; Sano, T.; Kihara, A.; Igarashi, Y.: Lack of sphingosine 1-phosphate-degrading enzymes in erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357 (2007) 212–217.
- [28] Kappos, L.; Antel, J.; Comi, G.; Montalban, X.; O'Connor, P.; Polman, C. H.; Haas, T.; Korn, A. A.; Karlsson, G.; Radue, E. W.: Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 355 (2006) 1124–1140.
- [29] Keul, P.; Tölle, M.; Lucke, S.; Wnuck Lipinski, K. von; Heusch, G.; Schuchardt, M.; van der Giet, M.; Levkau, B.: The sphingosine-1-phosphate analogue FTY720 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27 (2007) 607–613.
- [30] Kluk, M. J.; Hla, T.: Role of the sphingosine 1-phosphate receptor EDG-1 in vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Circ. Res.* 89 (2001) 496–502.

- [31] Le Stunff, H.; Peterson, C.; Liu, H.; Milstien, S.; Spiegel, S.: Sphingosine-1-phosphate and lipid phosphohydrolases. *Biochim. Biophys. Acta* 1582 (2002) 8–17.
- [32] Libby, P.: Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420 (2002) 868–874.
- [33] Lynch, K. R.; Macdonald, T. L.: Sphingosine 1-phosphate chemical biology. *Biochim. Biophys. Acta* 1781 (2008) 508–512.
- [34] Maceyka, M.; Milstien, S.; Spiegel, S.: Sphingosine-1-phosphate: the Swiss army knife of sphingolipid signaling. *J. Lipid Res.* 50 (2009) 272–276.
- [35] Maceyka, M.; Sankala, H.; Hait, N. C.; Le Stunff, H.; Liu, H.; Toman, R.; Collier, C.; Zhang, M.; Satin, L. S.; Merrill, A. H.; Milstien, S.; Spiegel, S.: SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 37118–37129.
- [36] Massberg, S.; Andrian, U. H. von: Fingolimod and sphingosine-1-phosphate--modifiers of lymphocyte migration. *N. Engl. J. Med.* 355 (2006) 1088–1091.
- [37] Massberg, S.; Brand, K.; Grüner, S.; Page, S.; Müller, E.; Müller, I.; Bergmeier, W.; Richter, T.; Lorenz, M.; Konrad, I.; Nieswandt, B.; Gawaz, M.: A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J. Exp. Med.* 196 (2002) 887–896.
- [38] Matloubian, M.; Lo, C. G.; Cinamon, G.; Lesneski, M. J.; Xu, Y.; Brinkmann, V.; Allende, M. L.; Proia, R. L.; Cyster, J. G.: Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 427 (2004) 355–360.
- [39] Nofer, J.-R.; van der Giet, M.; Tölle, M.; Wolinska, I.; Wnuck Lipinski, K. von; Baba, H. A.; Tietge, U. J.; Gödecke, A.; Ishii, I.; Kleuser, B.; Schäfers, M.; Fobker, M.; Zidek, W.; Assmann, G.; Chun, J.; Levkau, B.: HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J. Clin. Invest.* 113 (2004) 569–581.
- [40] Ohmori, T.; Yatomi, Y.; Osada, M.; Kazama, F.; Takafuta, T.; Ikeda, H.; Ozaki, Y.: Sphingosine 1-phosphate induces contraction of coronary artery smooth muscle cells via S1P2. *Cardiovasc. Res.* 58 (2003) 170–177.
- [41] Osada, M.; Yatomi, Y.; Ohmori, T.; Ikeda, H.; Ozaki, Y.: Enhancement of sphingosine 1-phosphate-induced migration of vascular endothelial cells and smooth muscle cells by an EDG-5 antagonist. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299 (2002) 483–487.

- [42] Pappu, R.; Schwab, S. R.; Cornelissen, I.; Pereira, J. P.; Regard, J. B.; Xu, Y.; Camerer, E.; Zheng, Y.-W.; Huang, Y.; Cyster, J. G.; Coughlin, S. R.: Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science* 316 (2007) 295–298.
- [43] Prieschl, E. E.; Csonga, R.; Novotny, V.; Kikuchi, G. E.; Baumruker, T.: The balance between sphingosine and sphingosine-1-phosphate is decisive for mast cell activation after Fc  $\epsilon$  receptor I triggering. *J. Exp. Med.* 190 (1999) 1–8.
- [44] Rand, M. L.; Leung, R.; Packham, M. A.: Platelet function assays. *Transfus Apher Sci* 28 (2003) 307–317.
- [45] Rassow, J.; Netzker, R.; Hauser, K.: *Biochemie. Duale Reihe.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG (2008).
- [46] Rosen, H.; Gonzalez-Cabrera, P. J.; Sanna, M. G.; Brown, S.: Sphingosine 1-phosphate receptor signaling. *Annu. Rev. Biochem.* 78 (2009) 743–768.
- [47] Salvadori, M.; Budde, K.; Charpentier, B.; Klempnauer, J.; Nashan, B.; Pallardo, L. M.; Eris, J.; Schena, F. P.; Eisenberger, U.; Rostaing, L.; Hmissi, A.; Aradhye, S.: FTY720 versus MMF with cyclosporine in de novo renal transplantation: a 1-year, randomized controlled trial in Europe and Australasia. *Am. J. Transplant.* 6 (2006) 2912–2921.
- [48] Sanchez, T.; Skoura, A.; Wu, M. T.; Casserly, B.; Harrington, E. O.; Hla, T.: Induction of vascular permeability by the sphingosine-1-phosphate receptor-2 (S1P2R) and its downstream effectors ROCK and PTEN. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27 (2007) 1312–1318.
- [49] Sigma-Aldrich Chemie GmbH (2010): Dimethyl sulfoxide.  
[http://www.sigmaaldrich.com/catalog/Lookup.do?N5=All&N3=mode+matchpartialmax&N4=dms0&D7=0&D10=dms0&N1=S\\_ID&ST=RS&N25=0&F=PR](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/Lookup.do?N5=All&N3=mode+matchpartialmax&N4=dms0&D7=0&D10=dms0&N1=S_ID&ST=RS&N25=0&F=PR),  
Stand: 04.01.2011.
- [50] Sigma-Aldrich Chemie GmbH (2010): D-Sphingosine.  
[http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=Product%20No.|BRAND\\_KEY&N4=S7049|SIGMA&N25=0&QS=ON&F=SPEC](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=Product%20No.|BRAND_KEY&N4=S7049|SIGMA&N25=0&QS=ON&F=SPEC), Stand: 04.01.2011.
- [51] Spiegel, S.; Milstien, S.: Functions of a new family of sphingosine-1-phosphate receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1484 (2000) 107–116.

- [52] Spiegel, S.; Milstien, S.: Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 (2003) 397–407.
- [53] Statistisches Bundesamt Deutschland (2011): Todesursachen. Sterbefälle insgesamt 2009 nach den 10 häufigsten Todesursachen der International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems.  
<http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Content75/SterbefaelleInsgesamt,templateld=renderPrint.psml>, Stand: 13.01.2011.
- [54] Statistisches Bundesamt Deutschland (2011): Todesursachen. Anzahl der Gestorbenen nach Kapiteln der International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-10).  
<http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Content75/GestorbeneAnzahl,templateld=renderPrint.psml>, Stand: 13.01.2011.
- [55] Takabe, K.; Paugh, S. W.; Milstien, S.; Spiegel, S.: "Inside-out" signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. *Pharmacol. Rev.* 60 (2008) 181–195.
- [56] Tedesco-Silva, H.; Mourad, G.; Kahan, B. D.; Boira, J. G.; Weimar, W.; Mulgaonkar, S.; Nashan, B.; Madsen, S.; Charpentier, B.; Pellet, P.; Vanrenterghem, Y.: FTY720, a novel immunomodulator: efficacy and safety results from the first phase 2A study in de novo renal transplantation. *Transplantation* 79 (2005) 1553–1560.
- [57] Tedesco-Silva, H.; Pescovitz, M. D.; Cibrik, D.; Rees, M. A.; Mulgaonkar, S.; Kahan, B. D.; Gugliuzza, K. K.; Rajagopalan, P. R.; Esmeraldo, R. M. de; Lord, H.; Salvadori, M.; Slade, J. M.: Randomized controlled trial of FTY720 versus MMF in de novo renal transplantation. *Transplantation* 82 (2006) 1689–1697.
- [58] Tölle, M.; Levkau, B.; Kleuser, B.; van der Giet, M.: Sphingosine-1-phosphate and FTY720 as anti-atherosclerotic lipid compounds. *Eur. J. Clin. Invest.* 37 (2007) 171–179.
- [59] Tölle, M.; Levkau, B.; Keul, P.; Brinkmann, V.; Giebing, G.; Schönfelder, G.; Schäfers, M.; Wnuck Lipinski, K. von; Jankowski, J.; Jankowski, V.; Chun, J.; Zidek, W.; van der Giet, M.: Immunomodulator FTY720 Induces eNOS-

dependent arterial vasodilatation via the lysophospholipid receptor S1P3. *Circ. Res.* 96 (2005) 913–920.

- [60] Unterwurzacher, R.: Prostaglandin E1: Von der Vasodilatation zur differenzierten Beeinflussung mikrozirkulatorischer Parameter. *J Kardiol* 11 (2004) 138.
- [61] Varga-Szabo, D.; Pleines, I.; Nieswandt, B.: Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28 (2008) 403–412.
- [62] Venkataraman, K.; Lee, Y.-M.; Michaud, J.; Thangada, S.; Ai, Y.; Bonkovsky, H. L.; Parikh, N. S.; Habrukowich, C.; Hla, T.: Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate. *Circ. Res.* 102 (2008) 669–676.
- [63] Walter, D. H.; Rochwalsky, U.; Reinhold, J.; Seeger, F.; Aicher, A.; Urbich, C.; Spyridopoulos, I.; Chun, J.; Brinkmann, V.; Keul, P.; Levkau, B.; Zeiher, A. M.; Dimmeler, S.; Haendeler, J.: Sphingosine-1-phosphate stimulates the functional capacity of progenitor cells by activation of the CXCR4-dependent signaling pathway via the S1P3 receptor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27 (2007) 275–282.
- [64] Welsch, U.: Sobotta: Lehrbuch Histologie. München: Urban & Fischer bei Elsevier GmbH (2005).
- [65] Yardumian, D. A.; Mackie, I. J.; Machin, S. J.: Laboratory investigation of platelet function: a review of methodology. *J. Clin. Pathol.* 39 (1986) 701–712.
- [66] Zemann, B.; Kinzel, B.; Müller, M.; Reuschel, R.; Mechtcheriakova, D.; Urtz, N.; Bornancin, F.; Baumruker, T.; Billich, A.: Sphingosine kinase type 2 is essential for lymphopenia induced by the immunomodulatory drug FTY720. *Blood* 107 (2006) 1454–1458.

## 11 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Steffen Massberg für die Überlassung des interessanten Themas, seine kompetente und freundliche Führung und seine motivierende und hilfsbereite Betreuung bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Christian Schulz für seine tatkräftige und aufmunternde Betreuung, sowie für die kritische Durchsicht der Ergebnisse.

Für die Hilfestellung bei der statistischen Auswertung danke ich Dr. Tibor Schuster vom Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie am Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, und insbesondere Sandra Kerstan und Michael Lorenz, bedanken, die mich bei den technischen Fragen der Laborarbeit unterstützten.

## 12 Lebenslauf

### Mirjam Keßler

\*22. September 1984 in Dachau

### Familienstand

ledig, keine Kinder

### Schule

September 1991-  
Juli 1995

Besuch der Grundschule Hebertshausen

September 1995-  
Juni 2004

Besuch des Josef-Effner-Gymnasium Dachau  
Abschluss: Abitur;

### Studium

Oktober 2004-  
September 2006

Studium der Humanmedizin; vorklinischer Abschnitt;  
Ludwig-Maximilians- und Technische Universität München

September 2006

Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung;

Oktober 2006-  
Dezember 2010

Studium der Humanmedizin; klinischer Abschnitt;  
Technische Universität München

Dezember 2010

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung;

### Publikation

“Identification of novel downstream targets of platelet glycoprotein VI activation by differential proteome analysis: implications for thrombus formation”  
in „Blood“ (20.5.10; Volume 115; 20)  
Schulz C.; Leuschen N. V.; Fröhlich T.; Lorenz M.; Pfeiler S.; Gleissner C. A.; Kremmer E.; Kessler M.; Khandoga A. G.; Engelmann B.; Ley K.; Massberg S.; Arnold G. J.